

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ESTUDIOS SOBRE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL
DE LA DEGRADACIÓN DE BENZOATO EN "AZOARCUS"
SP CIB**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Andrés Valderrama Traslaviña

Bajo la dirección de los doctores

Eduardo Díaz Fernández
Manuel Carmona Pérez

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



Estudios sobre la regulación transcripcional de la
degradación de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

TESIS DOCTORAL



ANDRÉS VALDERRAMA TRASLAVIÑA

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Estudios sobre la regulación transcripcional de la
degradación de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

TESIS DOCTORAL

ANDRÉS VALDERRAMA TRASLAVIÑA

DIRECTORES

Dr. EDUARDO DÍAZ FERNÁNDEZ Dr. MANUEL CARMONA PÉREZ



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Madrid, 2012

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS | V |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Biodegradación de los compuestos aromáticos | 3 |
| 1.1. Catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos | 5 |
| 1.1.1. Rutas aeróbicas clásicas | 5 |
| 1.1.2. Rutas aeróbicas híbridas | 6 |
| 1.1.2.1. Ruta box de degradación aeróbica de benzoato | 7 |
| 1.2. Catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos | 9 |
| 1.2.1. Rutas periféricas del catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos | 11 |
| 1.2.2. Rutas centrales del catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos | 13 |
| 1.2.3. Bioquímica de la ruta central del benzoil-CoA | 13 |
| 1.2.3.1. Ruta alta del benzoil-CoA | 15 |
| 1.2.3.2. Ruta baja del benzoil-CoA | 15 |
| 2. Genética de la ruta de degradación del benzoato | 17 |
| 3. Regulación de la expresión génica en rutas de degradación de compuestos aromáticos | 20 |
| 3.1. Regulación específica de efector | 25 |
| 3.1.1. Regulación del <i>cluster bad</i> de <i>R. palustris</i> | 25 |
| 3.1.2. Regulación del <i>cluster bzd</i> de <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 27 |
| 3.1.3. Otros reguladores del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos | 30 |
| 3.2. Regulación sobreimpuesta | 32 |
| 3.2.1. Regulación dependiente de oxígeno | 33 |
| 3.2.2. Regulación dependiente de fuentes de carbono alternativas (represión catabólica) | 35 |
| 3.3. Sistemas reguladores de dos componentes | 37 |
| II. OBJETIVOS | 41 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 45 |
| 1. Cepas bacterianas y plásmidos | 47 |
| 2. Medios y condiciones de cultivo | 49 |
| 2.1. Medios de cultivo empleados para <i>Escherichia coli</i> | 49 |
| 2.2. Medios de cultivo empleados para <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 50 |
| 2.3. Antibióticos | 51 |
| 2.4. Obtención de condiciones anaeróbicas en los medios de cultivo | 52 |
| 2.5. Condiciones de cultivo | 52 |
| 2.6. Conservación de las cepas bacterianas | 53 |
| 3. Técnicas de manipulación de DNA y RNA | 53 |
| 3.1. Purificación de DNA | 53 |
| 3.2. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR) | 53 |
| 3.3. Secuenciación de DNA | 57 |
| 3.3.1. Secuenciación automática | 57 |
| 3.3.2. Secuenciación manual | 57 |
| 3.4. Determinación del sitio de inicio de la transcripción | 57 |
| 3.4.1. Extracción de RNA | 57 |
| 3.4.2. Extensión por cebador (primer-extension) | 58 |
| 3.5. Ensayos de retrotranscripción-PCR y (RT-PCR) en tiempo real | 58 |
| 3.6. Mutagénesis dirigida del gen <i>accR</i> | 59 |
| 4. Procedimientos de transferencia genética | 60 |
| 4.1. Transformación de células de <i>E. coli</i> mediante choque térmico y electroporación | 60 |
| 4.2. Transferencia de plásmidos mediante conjugación | 60 |
| 4.2.1. Protocolo de conjugación | 60 |
| 4.2.2. Construcción de mutantes de inserción por recombinación homóloga en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 60 |
| 4.2.3. Construcción de mutantes por delección en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 62 |
| 5. Técnicas de manipulación de proteínas | 64 |
| 5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) | 64 |
| 5.2. Sobreproducción y purificación de proteínas | 64 |
| 5.2.1. Sobreproducción y purificación de las proteínas His ₆ BzdR y His ₆ BoxR | 64 |

| | | |
|------------|---|-----|
| 5.2.2. | Sobreproducción y purificación de las proteínas His ₆ AccR, His ₆ AccRD60E y His ₆ -CAccR | 65 |
| 5.2.3. | Sobreproducción y purificación de las proteínas His ₆ AccS ₂₈₈₋₉₀₃ y His ₆ Acc ₆₅₃₋₉₀₃ | 66 |
| 5.3. | Fosforilación <i>in vitro</i> de la proteína AccR | 67 |
| 5.4. | Ensayos de espectrometría de masas (MALDI-TOFF) | 67 |
| 6. | Ensayos de actividad enzimática | 67 |
| 6.2. | Ensayo de actividad autoquinasa (Autofosforilación) | 68 |
| 6.2. | Ensayo de actividad autofosfatasa | 68 |
| 6.4. | Ensayos de transfosforilación <i>in vitro</i> | 68 |
| 6.5. | Ensayo de actividad fosfatasa de AccR mediado por AccS | 69 |
| 6.6. | Ensayo de transferencia reversa de fosfato | 69 |
| 6.7. | Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad autoquinasa | 69 |
| 7. | Ensayos de unión de proteína a DNA | 70 |
| 7.1. | Marcaje de sondas radiactivas | 70 |
| 7.2. | Ensayos de retardo en gel | 71 |
| 7.3. | Ensayos de protección frente a la digestión con DNasaI (<i>footprinting</i>) | 71 |
| 7.4. | Ensayos de transcripción <i>in vitro</i> | 72 |
| 8. | Ensayos de ultracentrifugación analítica | 73 |
| 9. | Recursos bioinformáticas | 73 |
| 9.1. | Análisis de secuencias | 73 |
| 9.2. | Construcción de árboles filogenéticos | 74 |
| 9.3. | Modelado de la estructura tridimensional de proteínas | 75 |
| IV. | RESULTADOS | 76 |
| 1. | Identificación del <i>cluster</i> génico responsable de la degradación aeróbica del benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 79 |
| 2. | Estudios de la regulación del <i>cluster box</i> de degradación aeróbica de benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 82 |
| 2.1. | Clonación y estudio de los promotores P_D y P_X | 82 |
| 2.2. | Identificación del gen <i>boxR</i> y análisis de la secuencia de su producto génico | 85 |
| 2.3. | El gen <i>boxR</i> codifica el represor transcripcional específico del <i>cluster box</i> | 86 |
| 2.4. | Hiperexpresión de la proteína BoxR | 88 |
| 2.5. | Caracterización <i>in vitro</i> de la interacción específica de la proteína BoxR con los promotores P_D y P_X | 89 |
| 2.6. | Identificación del benzoil-CoA como molécula inductora de los genes <i>box</i> | 90 |
| 2.7. | Identificación de los sitios de unión de la proteína BoxR a los promotores P_D y P_X | 91 |
| 3. | Estudio del papel del oxígeno en la expresión de los genes del <i>cluster box</i> | 93 |
| 3.1. | Expresión de los genes <i>boxR</i> y <i>boxD</i> en presencia o ausencia de oxígeno en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 93 |
| 3.2. | Actividad de los promotores P_X y P_D en condiciones anaeróbicas en <i>E. coli</i> | 94 |
| 3.3. | Efecto del gen <i>bclA</i> en la inducción de la degradación anaeróbica del benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 95 |
| 4. | Regulación cruzada entre la ruta aeróbica <i>box</i> y la ruta anaeróbica <i>bzd</i> de degradación de benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 96 |
| 4.1. | Estudios <i>in vitro</i> de la interacción entre BoxR/ P_N y entre BzdR/ P_X y BzdR/ P_D | 96 |
| 4.2. | Estudios <i>in vivo</i> en <i>E. coli</i> de la interacción entre BoxR/ P_N y entre BzdR/ P_X y BzdR/ P_D | 97 |
| 4.3. | Papel de los reguladores BoxR y BzdR sobre los promotores P_N y P_D/P_X en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 99 |
| 4.4. | Estudio comparativo de la viabilidad de las cepas <i>Azoarcus</i> sp. CIB, CIB <i>dbboxR</i> , CIB <i>dbzdR</i> y CIB <i>dbboxRbzdR</i> en medio no selectivo | 100 |
| 5. | Estudios sobre la regulación sobreimpuesta mediada por fuentes de carbono en la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 102 |
| 5.1. | Identificación del sistema regulador de dos componentes AccSR, presuntamente implicado en la CCR en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 102 |
| 5.2. | Caracterización del regulador de respuesta AccR de <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 103 |
| 5.2.1. | El gen <i>accR</i> está implicado en la represión catabólica de la ruta <i>bzd</i> | 103 |
| 5.2.2. | Hiperexpresión del gen <i>accR</i> y purificación de su producto génico | 104 |
| 5.2.3. | AccR cataliza su autofosforilación <i>in vitro</i> | 105 |
| 5.2.4. | La fosforilación induce un cambio del estado oligomérico de la proteína AccR | 106 |
| 5.2.5. | AccR-P interacciona <i>in vitro</i> con el promotor P_N | 108 |
| 5.2.6. | La proteína AccR-P es un represor transcripcional del promotor P_N | 112 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| 5.2.7. | Estudios de las relaciones estructura y función del regulador AccR | 113 |
| 5.2.7.1. | Análisis de la región N-terminal de AccR | 113 |
| 5.2.7.2. | Análisis funcional de la región C-terminal de la proteína AccR | 116 |
| 5.3. | Caracterización de la proteína histidina quinasa AccS | 118 |
| 5.3.1. | El gen <i>accS</i> está implicado en la represión catabólica de la ruta <i>bzd</i> | 118 |
| 5.3.2. | Análisis de la estructura modular de la proteína AccS | 119 |
| 5.3.3. | Caracterización del dominio autoquinasa de la proteína AccS | 120 |
| 5.3.3.1. | La proteína AccS ₆₅₃₋₉₀₃ cataliza su autofosforilación en el dominio autoquinasa | 121 |
| 5.3.3.2. | Defosforilación de la proteína AccS ₆₅₃₋₉₀₃ | 122 |
| 5.3.3.3. | Defosforilación de la proteína AccS ₆₅₃₋₉₀₃ | 123 |
| 5.3.3.4. | AccS controla la defosforilación de AccR | 124 |
| 5.3.3.5. | Transferencia reversa de fosfato entre AccR y AccS | 125 |
| 5.3.4. | Identificación de algunas señales reconocidas por la HK AccS | 125 |
| 5.3.4.1. | Construcción y estudio de la proteína AccS ₂₈₈₋₉₀₃ | 126 |
| 5.3.4.2. | Efecto del estado redox sobre la actividad del dominio autoquinasa de la HK AccS | 128 |
| V. | DISCUSIÓN | 131 |
| 1. | Identificación del cluster box responsable de la degradación aeróbica del benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 133 |
| 2. | Regulación del <i>cluster box</i> de <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 135 |
| 2.1. | El gen <i>boxR</i> codifica un regulador transcripcional de los genes <i>box</i> | 136 |
| 2.2. | Caracterización molecular de la interacción del regulador BoxR con los promotores P_D y P_X | 139 |
| 3. | Estudio del papel del oxígeno en la expresión de los genes del <i>cluster box</i> | 142 |
| 4. | Regulación cruzada entre las rutas <i>box</i> y <i>bzd</i> de degradación de benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 144 |
| 5. | Aspectos adaptativos y evolutivos de los genes ortólogos <i>boxR</i> y <i>bzdR</i> | 146 |
| 6. | Estudios sobre la regulación sobreimpuesta mediada por fuentes de carbono en la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 149 |
| 6.1. | El regulador de respuesta AccR controla la CCR de la ruta <i>bzd</i> | 150 |
| 6.2. | Estudios de las relaciones estructura/función de la proteína AccR: mecanismos de activación del regulador | 156 |
| 6.3. | Caracterización de la proteína Histidina quinasa AccS | 160 |
| 6.4. | Estudios de las señales reconocidas por AccS: el <i>cluster acc</i> de <i>Azoarcus</i> sp. CIB | 164 |
| VI. | CONCLUSIONES | 173 |
| VII. | BIBLIOGRAFÍA | 175 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------|---|
| 3D | tridimensional |
| A | adenina |
| A_{600} | densidad óptica medida a 600 nm |
| aa | aminoácido(s) |
| ADP | adenosina difosfato |
| Ap^r | resistencia a ampicilina |
| ATP | adenosina 5'-trifosfato |
| b | base (s) |
| BCR | benzoyl-CoA reductasa |
| BSA | seroalbúmina bovina |
| C | citosina |
| °C | grado centígrado |
| CCR | <i>Catabolite Carbon Represion</i> |
| cDNA | DNA complementario |
| Ci | Curio (3.7×10^{10} Bq) |
| Cm^r | resistencia a cloranfenicol |
| CoA | coenzima A |
| CRP | proteína receptora de AMPc |
| Da | Dalton |
| dATP | desoxiadenosina 5'-trifosfato |
| dCTP | desoxicitidina 5'-trifosfato |
| DEPC | dietilpirocarbonato |
| dGTP | desoxiguanosina 5'-trifosfato |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | desoxinucleótido trifosfato |
| DTT | ditiotreitól |
| dTTP | desoxitimidina 5'-trifosfato |
| EDTA | ácido etilendiaminotetracético |
| FAD | dinucleótido de flavina y adenina |
| FADH | dinucleótido de flavina y adenina reducido |
| G | guanina |
| GTP | guanosina 5'-trifosfato |
| Gm^r | resistencia a gentamicina |
| h | hora |
| His₆ | secuencia de aminoácidos compuesta por 6 histidinas |
| HK | Proteína Histidín quinasa |
| HTH | motivo hélice-giro-hélice |
| IPTG | isopropil- β -D-tiogalatopiranosido |
| kb | 1000 pares de bases |

| | |
|------------------------------|---|
| K_d | constante de disociación aparente |
| kDa | 1000 Dalton |
| Km^r | resistencia a kanamicina |
| LB | medio Lysogeny Broth |
| m/v | relación masa/volumen |
| M63 | medio mínimo M63 |
| MA | medio basal para cultivos anaerobios |
| MC | medio MA complementado |
| min | minuto |
| ml | mililitro |
| mM | milimolar |
| NAD | nicotinamida-adenina-dinucleótido |
| NADH(+H⁺) | nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido |
| NADP | fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido |
| NADPH(+H⁺) | fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| nm | nanómetro |
| nt | nucleótido(s) |
| orf | <i>open reading frame</i> |
| PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida |
| pb | pares de bases |
| PCR | reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| RBS | secuencia de unión al ribosoma |
| RNA | ácido ribonucleico |
| mRNA | RNA mensajero |
| RNA^t | RNA de transferencia |
| rpm | revoluciones por minuto |
| RR | regulador de respuesta |
| RT-PCR | reacción de retrotranscripción acoplada a PCR |
| σ | factor sigma de la RNA polimerasa |
| T | timina |
| TAE | tampón Tris-Acetato-EDTA |
| TBE | tampón Tris-Borato-EDTA |
| TE | tampón Tris-EDTA |
| SDS | dodecilsulfato sódico |
| Tris | tri(hidroximetil)aminometano |
| UTP | uridina trifosfato |
| UV | ultravioleta |
| v/v | relación volumen-volumen |
| X-gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido |

I. INTRODUCCIÓN

1. Biodegradación de los compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos son abundantes en la naturaleza y presentan diversidad de estructuras. Así mismo, forman parte de todos los organismos, por ejemplo en los tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) llegando a constituir un cuarto de la composición de la biomasa de las plantas terrestres. Esto no es solo debido a la gran variedad de productos secundarios que las plantas producen, sino principalmente a la estructura del polímero aromático de la lignina, el cual está formado por unidades de fenilpropano (Fuchs *et al.*, 2011). Además, durante el último siglo, se han incrementado de forma considerable la liberación de compuestos aromáticos a la biosfera como consecuencia de la revolución industrial. Muchos de estos compuestos aromáticos pertenecen al grupo de los xenobióticos, compuestos generados como consecuencia de la actividad humana que contienen sustituyentes que no existen o se encuentran raramente en la naturaleza. Esto hace que puedan ser degradados o lo hagan muy lentamente (Pieper y Reineke, 2000).

La gran estabilidad termodinámica del anillo de benceno consecuencia de su estructura resonante, que posibilita su persistencia en el medio ambiente, ha sido la responsable de que muchos compuestos aromáticos constituyan una fuente importante de contaminación ambiental por su elevada toxicidad. Entre los aromáticos contaminantes, cabría destacar especialmente a los que constituyen el grupo denominado BTEX: benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos, debido a su importancia como contaminantes de acuíferos y de sedimentos procedentes de filtraciones o vertidos de petróleo o derivados de éste (Lin *et al.*, 2002).

De igual forma, existen otros compuestos aromáticos contaminantes como son los derivados polihalogenados tales como las dioxinas y los bifenilos (PCBs), los compuestos nitroaromáticos y los derivados fenólicos halogenados (Abraham *et al.*, 2002; Haggblom *et al.*, 2000). Todos estos compuestos poseen diversos índices de toxicidad que pueden llegar a provocar desde leves daños dermatológicos hasta graves afecciones del sistema nervioso central o leucemias (Chee-Sanford *et al.*, 1996).

Los microorganismos juegan un papel crucial en el reciclaje del carbono y el mantenimiento de la biosfera (Dagley, 1978), ya que han desarrollado diversas estrategias para conseguir degradar la mayor parte de los compuestos orgánicos que se encuentran en la biosfera, incluyendo a los aromáticos más recalcitrantes. Además, la

promiscuidad que muestran las enzimas catabólicas codificadas por *clusters* de degradación permite a las bacterias degradar, al menos parcialmente, los compuestos xenobióticos cuyas estructuras se asemejan a compuestos aromáticos naturales (Díaz, 2004; McLeod, 2008).

Los microorganismos han desarrollado dos estrategias principales para degradar compuestos aromáticos dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno. Un principio general en el catabolismo, tanto aeróbico como anaeróbico, de compuestos aromáticos es el hecho de que una gran variedad de rutas periféricas convergen en unas pocas rutas centrales, lo que se ha denominado por algunos autores “embudo catabólico” (Harayama y Timmis, 1989). Las rutas periféricas engloban todas aquellas reacciones enzimáticas que convierten la gran variedad de compuestos aromáticos en unos pocos intermediarios centrales, los cuales suelen estar preparados (activados) para sufrir la pérdida de su carácter aromático (Heider y Fuchs, 1997). Las enzimas que intervienen en las rutas periféricas para la degradación de compuestos aromáticos son más o menos específicas, y generalmente inducidas, por dichos sustratos (Heider *et al.*, 1998).

En el catabolismo aeróbico de aromáticos, el cual ha sido ampliamente estudiado a lo largo de varias décadas, el oxígeno no es la única molécula que puede actuar como aceptor final de electrones, pero es clave como co-sustrato en dos procesos esenciales, como son la hidroxilación y la rotura del anillo aromático, ambos procesos son llevados a cabo por oxigenasas (Parales, 2006; Vaillancourt *et al.*, 2006).

En el catabolismo anaeróbico, los compuestos aromáticos utilizan una estrategia totalmente diferente, basada en reacciones de reducción capaces de hidrolizar el anillo aromático (Fuchs, 2008; Gibson y Harwood, 2002). Para ello pueden utilizar aceptores finales de electrones tales como compuestos inorgánicos como el NO_3^- (que es reducido a NO_2^- o a N_2) (Spormann y Widdel, 2000), el Fe^{3+} (que es reducido a Fe^{2+}) o el SO_4^{2-} (que es reducido a SO_3^{2-} o a SO^{2-}) (Peters *et al.*, 2004; Morasch *et al.*, 2004) o algunos otros menos comunes como el Mn^{4+} , el ClO_4^- , el Cr^{4+} , el V^{4+} , el óxido de trimetilamina, el dimetil sulfóxido (DMSO), etc. (Coates *et al.*, 2002; Coates y Achenbach, 2004; Lovley, 2002; Gibson y Harwood, 2002). Por último, cabría hacer mención de un tercer tipo de catabolismo, la fermentación, donde la fuente de carbono es degradada anaeróbicamente por medio de una serie de reacciones en las cuales ciertos compuestos orgánicos actúan como aceptores de electrones, generando ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato, razón por la cual no se requiere una cadena de transporte de

electrones. Sin embargo, la fermentación no permite la mineralización de compuestos aromáticos, sino que los transforma en ácidos orgánicos de cadena corta que serán posteriormente mineralizados por microorganismos metanógenos que establecen una asociación simbiótica con microorganismos fermentadores (Elshahed y McInerney, 2001; Evans y Fuchs, 1988).

1.1. Catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos

Tanto bacterias como hongos han sido estudiados desde principios del siglo XX por su capacidad para utilizar compuestos aromáticos en presencia de oxígeno. En la actualidad se tiene un gran conocimiento, a nivel molecular, de un considerable número de rutas catabólicas de compuestos aromáticos, especialmente en bacterias del género *Pseudomonas* (Harwood y Parales, 1996; Pieper *et al.*, 2004; van der Meer *et al.*, 1992).

1.1.1. Rutas aeróbicas clásicas

La estrategia clásica de mineralización aeróbica del anillo aromático se basa en la desestabilización del mismo mediante rutas periféricas que incorporan grupos hidroxilo. De esta manera, la estructura resonante del anillo aromático se ve aumentada y es más susceptible a la modificación por oxigenasas de ruptura que catalizan su conversión a un compuesto alifático, el cual será oxidado progresivamente hasta obtener intermediarios del ciclo de Krebs. La incorporación de grupos hidroxilo en el anillo bencénico, es catalizada por oxigenasas, monooxigenasas y/o dioxigenasas según incorporen uno o dos grupos hidroxilo (Gibson y Parales, 2000), dando lugar a derivados aromáticos mono-, di-, o tri-hidroxilados tales como el catecol, gentisato y sus derivados (Fig 1). Una característica frecuente es que un mismo compuesto aromático, puede ser degradado a través de distintas rutas catabólicas, como ocurre, por ejemplo, con el tolueno (Fig. 1).

Los intermediarios centrales sufren, a través de las rutas centrales, la apertura del anillo aromático mediante la acción de dioxigenasas (Harayama *et al.*, 1992; Harayama y Rekik, 1989; Harwood y Parales, 1996; van der Meer *et al.*, 1992). La ruptura del anillo, puede ser producida entre los dos grupos hidroxilo, denominada ruptura orto y catalizada por las intradiol dioxigenasas (dependientes de Fe_{III}). También puede ser producida por una ruptura adyacente a uno de los grupos hidroxilo, denominándose entonces ruptura meta y está catalizada por extradiol dioxigenasas (dependientes de Fe_{II}). Se han descrito también compuestos monohidroxilados como sustrato de las

dioxigenasas de ruptura, como el 2-aminofenol (Takenaka *et al.*, 1997) y el 1-hidroxi-2-naftoato (Iwabuchi y Harayama, 1998), así como trihidroxilados como el hidroxiquinol (Armengaud *et al.*, 1999) y el galato (Nogales *et al.*, 2005).

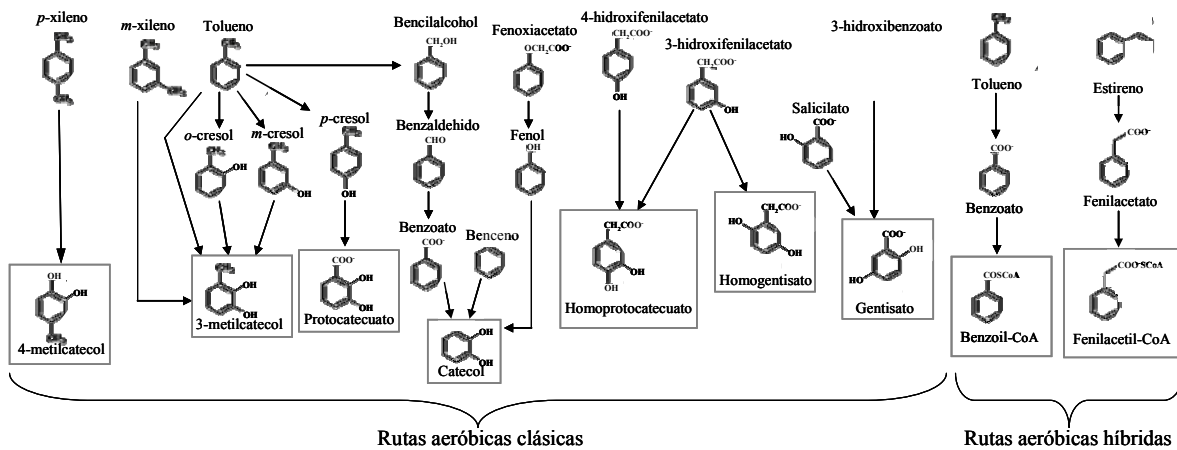


Figura 1. Esquema de algunas de las rutas periféricas e intermediarios centrales del catabolismo aeróbico bacteriano de compuestos aromáticos. La figura muestra algunos de los intermediarios centrales dihidroxilados más frecuentes en las rutas aeróbicas clásicas e híbridas de degradación del benzoato: el catecol y sus derivados (3-metilcatecol, 4-metilcatecol, protocatecuato y homoprotocatecuato), el gentisato y el homogentisato, el benzoil-CoA y el fenilacetil-CoA. Los metabolitos centrales aparecen dentro de un recuadro gris.

1.1.2. Rutas aeróbicas híbridas

Dentro del catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos, se han descrito algunas rutas que combinan características tanto del catabolismo aeróbico como del anaeróbico, estas rutas se denominan rutas híbridas. La principal propiedad de este tipo de rutas, es que los sustratos son transformados en derivados de CoA a través de una tioesterificación mediada por enzimas CoA ligasas. El proceso de tioesterificación es una característica común en las rutas anaerobias de degradación de compuestos aromáticos, ya que facilita la desestabilización del anillo al aumentar su densidad electrónica (Heider y Fuchs, 1997), este proceso es dependiente de CoA, Mg^{2+} y ATP (Boll y Fuchs, 1995). La apertura del anillo aromático y la pérdida de la propiedad aromática del derivado CoA, se realiza mediante reacciones de oxigenación u oxigenación/reducción y una posterior acción de enzimas que atacan el compuesto alicíclico generado (Gescher *et al.*, 2005).

La participación de enzimas CoA ligasas en este tipo de catabolismo, ha sido descrito en la degradación del ácido fenilacético en distintas especies bacterianas (Bartolome-Martin *et al.*, 2004; Luengo *et al.*, 2001); para la degradación del 2-

aminobenzoato en *Azoarcus evansii* (Schühle *et al.*, 2001); y para la degradación del benzoato en *Thauera aromatica* (Schühle *et al.*, 2003), *Burkholderia xenovorans* LB400 (Denef *et al.*, 2004), *Bacillus stearothermophilus* (Zaar *et al.*, 2001) y *Azoarcus evansii* (Bains *et al.*, 2009; Gescher *et al.*, 2005; Gescher *et al.*, 2006; Gescher *et al.*, 2002; Rather *et al.*, 2010a; , 2011a; Rather *et al.*, 2010b; Rather *et al.*, 2011b; Zaar *et al.*, 2004). También se han descrito rutas híbridas en el metabolismo aeróbico de compuestos aromáticos heterocíclicos, que incluye la degradación del ácido isonocotínico por *Mycobacterium* sp. INA1 (Kretzer *et al.*, 1993) y la de los ácidos 2-furano y 2-tiofeno carboxilato en algunas bacterias (Koenig y Andreesen, 1990; Cripps, 1973).

1.1.2.1. Ruta box de degradación aeróbica de benzoato

Uno de los modelos mas importantes para el estudio de las rutas híbridas de degradación de compuestos aromáticos es la ruta aerobia para la oxidación del benzoato (ruta Box), en donde estén implicados tioésteres de CoA y el proceso de epoxidación, ocurre en el 5% de todas las especies bacterianas de las cuales la secuencia de su genoma se encuentra disponible (Bains *et al.*, 2009; Rather *et al.*, 2011b), principalmente en muchas proteobacterias y actinobacterias, ya sea como la única ruta, o como una estrategia adicional, utilizada bajo condiciones de O₂ reducidas (Denef *et al.*, 2006).

Si bien, la ruta box ha sido descrita en diferentes organismos, en *Azoarcus evansii* ha sido en donde se ha llevado a cabo la caracterización genética y bioquímica más amplia de los genes y las enzimas que la constituyen (Fig 2). La ruta box es activada mediante la transformación del benzoato a benzoil-CoA por una benzoato-CoA ligasa en una reacción dependiente de ATP (Mohamed *et al.*, 2001; Zaar *et al.*, 2001). El benzoil-CoA, es posteriormente convertido a un compuesto 2,3-epoxido no aromático, este paso enzimático requiere de NADPH, O₂ y está catalizado por una oxigenasa que posee dos componentes, la benzoil-CoA oxigenasa A (BoxA), una reductasa, y la benzoil-CoA oxigenasa B (BoxB), una monooxigenasa (Rather *et al.*, 2011a; Rather *et al.*, 2010b; Rather *et al.*, 2011b). La apertura del anillo bencénico ocurre anaeróbicamente en una compleja reacción hidrolítica que incluye la adición de dos moléculas de agua al producto epoxido. Esta reacción es catalizada por una dihidrodiol liasa (BoxC) (Zaar *et al.*, 2004), produciendo 3,4-dehidroadipil-CoA semiladehído y formiato (Gescher *et al.*, 2005; Rather *et al.*, 2010b) El semiladehído es oxidado a su

correspondiente ácido, el 3,4-dihidroadiplil-CoA por BoxD, una aldehído deshidrogenasa específica dependiente de NADP^+ (Gescher *et al.*, 2006). La posterior degradación, posiblemente requiera de una β -oxidación para producir β -ketoadiplil-CoA, el intermediario en el cual convergen las rutas convencionales del β -ketoadiplato y de la oxidación del benzoato. Los productos finales de la ruta aeróbica de oxidación del benzoato son el acetil-CoA y el succinil-CoA, estando este último paso bioquímico catalizado por BoxE, una β -ketoadiplil-CoA tiolasa (Fuchs *et al.*, 2011).

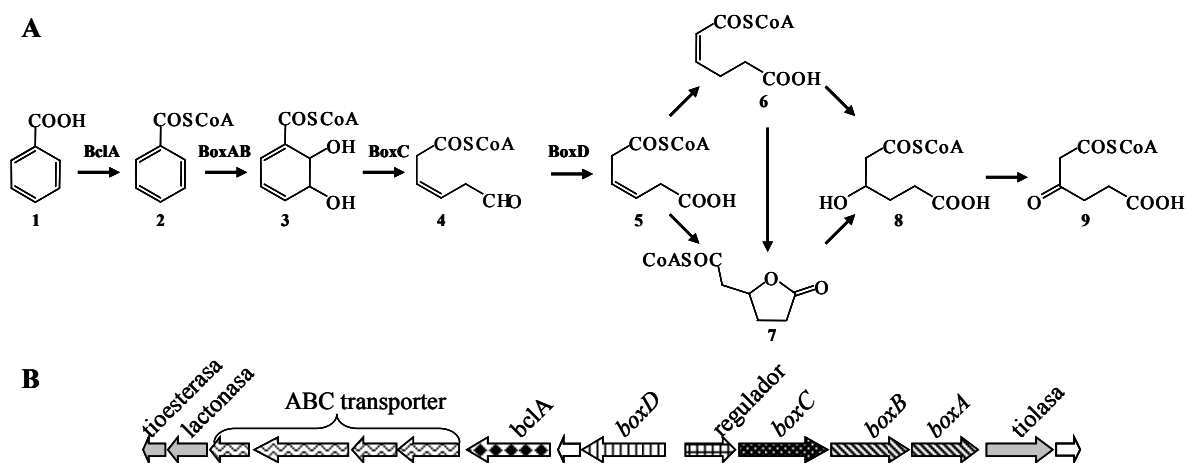


Figura 2. Ruta box de degradación aeróbica de benzoato en *Azoarcus evansii*. A). Se muestran los pasos enzimáticos y los metabolitos de la ruta. Los catabolitos aparecen numerados de la siguiente manera: 1, ácido benzoico; 2, benzoil-CoA, 3, 2,3-dihidroxi-2-3-dihidrobencoil-CoA; 4, 6-hidroxi-3-hexenoil-CoA; 5, 3-4 dehidroadipil-CoA 6, 2,3-dehidroadipil-CoA; 7, 3-hidroxiadipil-CoA 3,6-lactona; 8, β -hidroxiadipil-CoA; y 9, β -ketoadiplil-CoA. Las enzimas descritas que intervienen en la ruta box son: BclA, benzoato-CoA ligasa; BoxA, reductasa dependiente de NADPH; BoxB, benzoil-CoA 2,3-epoxidasa; BoxC, 2,3-epoxibenzoil-CoA hidrolasa; BoxD, aldehído deshidrogenasa. B). **Organización del cluster génico para la degradación aeróbica del benzoato en *Azoarcus evansii*.** Se señalan con flechas cada uno de los genes que compone el *cluster box* de *Azoarcus evansii*, en la parte superior de cada flecha, se indica el nombre del gen correspondiente, en flechas blancas se representan genes con función desconocida; con flechas grises se indican los genes posiblemente implicados en la ruta baja. Los genes *boxA* y *boxB* que codifican una reductasa dependiente de NADPH y una benzoil-CoA 2,3-epoxidasa, respectivamente son representados con flechas rayadas; el gen *boxC* que codifica una 2,3-epoxibenzoil-CoA hidrolasa se representa con una flecha con puntos; el gen *boxD* que codifica una aldehído deshidrogenasa es representado con una flecha con rayas verticales. El gen *bclA* que codifica una benzoato-CoA ligasa es representado con una flecha con rombos negros; los genes que codifican un presunto transportador de tipo ABC son representados con flechas con líneas onduladas.

Cabe destacar el caso de *Burkholderia xenovorans* LB400, en la cual, se ha descrito por medio de análisis genómicos que contiene dos rutas box, localizadas en el cromosoma (Box_C) y en un megaplásmido (Box_M) (Denef *et al.*, 2004). Las enzimas de estas dos rutas, presentan entre si una identidad en su secuencia de aminoácidos de entre el 70 y el 90% y al compararlas con las enzimas Box de *A. evansii*, muestran una identidad entre un 50 y un 80%. En adición a las dos rutas Box, LB400 también

contiene la ruta clásica para la degradación aeróbica de benzoato. Estudios de proteómica, transcriptómica y disrupción de genes, han determinado que LB400 usa las tres vías para catabolizar el benzoato en condiciones aeróbicas, sin embargo, cada ruta es utilizada por la bacteria bajo diferentes condiciones fisiológicas (Denef et al., 2005; 2006)

1.2. Catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos

Los procesos de degradación aeróbica de compuestos aromáticos han sido los más estudiados y de los que más conocimiento se tiene. Sin embargo, su importancia ha sido sobrestimada respecto a los procesos de degradación anaeróbica, ya que muchos de los ambientes susceptibles de sufrir contaminación de compuestos aromáticos suelen ser anóxicos, como por ejemplo determinados acuíferos, sedimentos acuáticos, zonas del subsuelo, el lumen intestinal, o ambientes con elevadas concentraciones de carbono, donde el oxígeno se consume más rápidamente que el tiempo que tarda en reponerse (Lovley, 2003). En los acuíferos contaminados con hidrocarburos se puede apreciar la formación de compartimentos con diferentes potenciales rédox, donde diversas comunidades microbianas son capaces de utilizar localmente los donadores y aceptores de electrones disponibles para llevar a cabo el proceso de biodegradación posible por los parámetros rédox de su entorno (Lovley, 2001; 2003). Se puede observar otro ejemplo en la biodegradación del crudo en los yacimientos de petróleo del subsuelo, llevada a cabo por microorganismos anaerobios por medio de una degradación de hidrocarburos sintrófica asociada a una metanogénesis hidrogenotrófica (Aitken *et al.*, 2004). Estas reacciones dan lugar a una importante alteración del proceso generando un petróleo pesado, cuyas consecuencias económicas son nefastas. Estos y otros ejemplos, demuestran la relevancia de los ambientes anóxicos en la naturaleza y concretamente en zonas contaminadas, lo cual convierte al catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en uno de los ciclos biogeoquímicos cruciales en el desarrollo de una biosfera sostenible (Evans y Fuchs, 1988; Gibson y Harwood, 2002; Lovley, 2001; , 2003; Widdel y Rabus, 2001).

Además, debido a la baja reactividad química de los compuestos aromáticos, su biodegradación anaeróbica requiere reacciones bioquímicas muy atípicas, lo cual es de gran interés, tanto desde el punto de vista bioquímico o evolutivo, como desde el punto de vista biotecnológico. Entre estas reacciones enzimáticas, cabría destacar aquellas implicadas en la reducción anaeróbica del anillo del benceno (reducción de Birch) o la

carboxilación anaeróbica del fenol (carboxilación de Kolbe-Schmitt), las cuales sólo habían sido descritas en el campo de la química orgánica (Fuchs, 2008).

Aunque se han estudiado en profundidad algunos de los procesos bioquímicos de determinadas rutas periféricas y centrales de la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos, las bases genéticas y los mecanismos implicados en su regulación, no se encuentran aún muy bien establecidos, debido principalmente a las dificultades de manipulación genética de los microorganismos degradadores de compuestos aromáticos en condiciones anaeróbicas. Recientes avances en la capacidad de secuenciar genomas, han permitido obtener el perfil genético completo de diferentes especies bacterianas capaces de degradar compuestos aromáticos utilizando diferentes aceptores de electrones y pertenecientes a distintos subgrupos de Proteobacterias: la α -Proteobacteria fotótrofa *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (Larimer *et al.*, 2004), la α -Proteobacteria desnitrificante *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 (Matsunaga *et al.*, 2005), las β -Proteobacterias desnitrificantes *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (Rabus *et al.*, 2005), y *Azoarcus* sp KH32C (Nishizawa *et al.*, 2012), dos δ -Proteobacterias anaerobias estrictas, la reductora de hierro *Geobacter metallireducens* GS-15 (Butler *et al.*, 2007) y la fermentadora *Syntrophus aciditrophicus* SB y una arqueobacteria quimiolitotrofa e hipertermófila *Ferroglobus placidus* AEDII12DO (Anderson *et al.*, 2011).

La identificación de las cepas bacterianas presentes en los ambientes anóxicos, revela la presencia frecuente de microorganismos pertenecientes al género *Azoarcus*. Los primeros análisis fisiológicos de bacterias pertenecientes a este género, los definieron como microorganismos no desnitrificantes (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993) con actividad nitrogenasa (Fries *et al.*, 1994). Estudios posteriores, aumentaron el número de especies aisladas, revelando algunos microorganismos del género *Azoarcus* que también eran capaces de crecer anaeróbicamente en condiciones desnitrificantes en presencia de diversos compuestos aromáticos suministrados como única fuente de carbono. Entre las nuevas especies identificadas se encuentran bacterias anaerobias estrictas tales como *A. anaerobius* (Springer *et al.*, 1998) y anaerobias facultativas, tales como *A. evansii* (Anders *et al.*, 1995) *A. toluyticus* (Zhou *et al.*, 1995), *A. toluvorans* (Fries *et al.*, 1994), *A. toluclasticus* (Song *et al.*, 1999), *A. buckelii*. (Mechichi *et al.*, 2002) y *Azoarcus* sp. KH32C (Nishizawa *et al.*, 2012). La bacteria *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (Rabus y Widdel, 1995), en un principio se clasificó dentro del género *Azoarcus*, pero en la actualidad se clasifica como un miembro del nuevo género

Aromatoleum. Todos los miembros del género *Azoarcus* son móviles, debido en la mayoría de los casos a un flagelo polar (Anders *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1999), y casi todos ellos presentan morfología de diplobacilo, si bien algunas cepas cultivadas en *m*-xileno en condiciones desnitrificantes presentan morfología de tipo coco (Hess *et al.*, 1997).

Para la realización de esta tesis doctoral, se ha utilizado la cepa *Azoarcus* sp. CIB, aislada en nuestro laboratorio a partir de un cultivo obtenido de la colección Alemana de Cultivos Tipo (DSMZ) (López-Barragán *et al.*, 2004). Esta cepa tiene la capacidad de degradar anaeróbicamente una gran batería de compuestos aromáticos tales como *m*-xileno, tolueno, benzoato, fenilacetato, 3-hidroxibenzoato, 3-metilbenzoato, entre otros.

1.2.1. Rutas periféricas del catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos

Como se indicó previamente, la estrategia general que utilizan los microorganismos anaerobios es eliminar los grupos funcionales de los distintos compuestos aromáticos, a través de diferentes rutas periféricas, dando lugar a la formación de unos pocos intermediarios centrales, que a su vez, son posteriormente degradados mediante las rutas centrales. El catabolismo anaeróbico de la mayoría de compuestos aromáticos converge en el intermediario central benzoil-CoA (Carmona *et al.*, 2009; Heider y Fuchs, 1997), si bien se han descrito otros intermediarios (Fig 3). En algunos casos las rutas periféricas son simples, ya que implican una única reacción, de la activación de algunos ácidos aromáticos (benzoato, 3-hidroxibenzoato, 3-metilbenzoato y 2-aminobenzoato) a sus correspondientes ésteres de aril-CoA.

En otros casos, los compuestos aromáticos son transformados en benzoil-CoA a través de rutas periféricas que consisten en múltiples reacciones encadenadas. Los genes que codifican las enzimas implicadas en estas transformaciones no suelen estar ligados al cluster de degradación del benzoil-CoA. Se ha establecido que todo aquel compuesto que sea metabolizado por medio de la ruta del benzoil-CoA debe poseer un grupo carboxilo, o bien un grupo alquilo capaz de oxidarse a su correspondiente carboxilo. En los casos en los que esto no es así, el compuesto ha de ser carboxilado específicamente para generar el correspondiente ácido aromático que será activado como un tioéster de CoA al inicio del metabolismo (Schuhle y Fuchs, 2004; Gibson y Harwood, 2002).

Los ácidos aromáticos que generan benzoil-CoA en su degradación, deben sufrir una activación a tioésteres de CoA mediante la acción de diversas enzimas CoA ligasas, de las cuales, se han identificado y caracterizado un gran número de ellas que están implicadas en el catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos en diversos microorganismos.

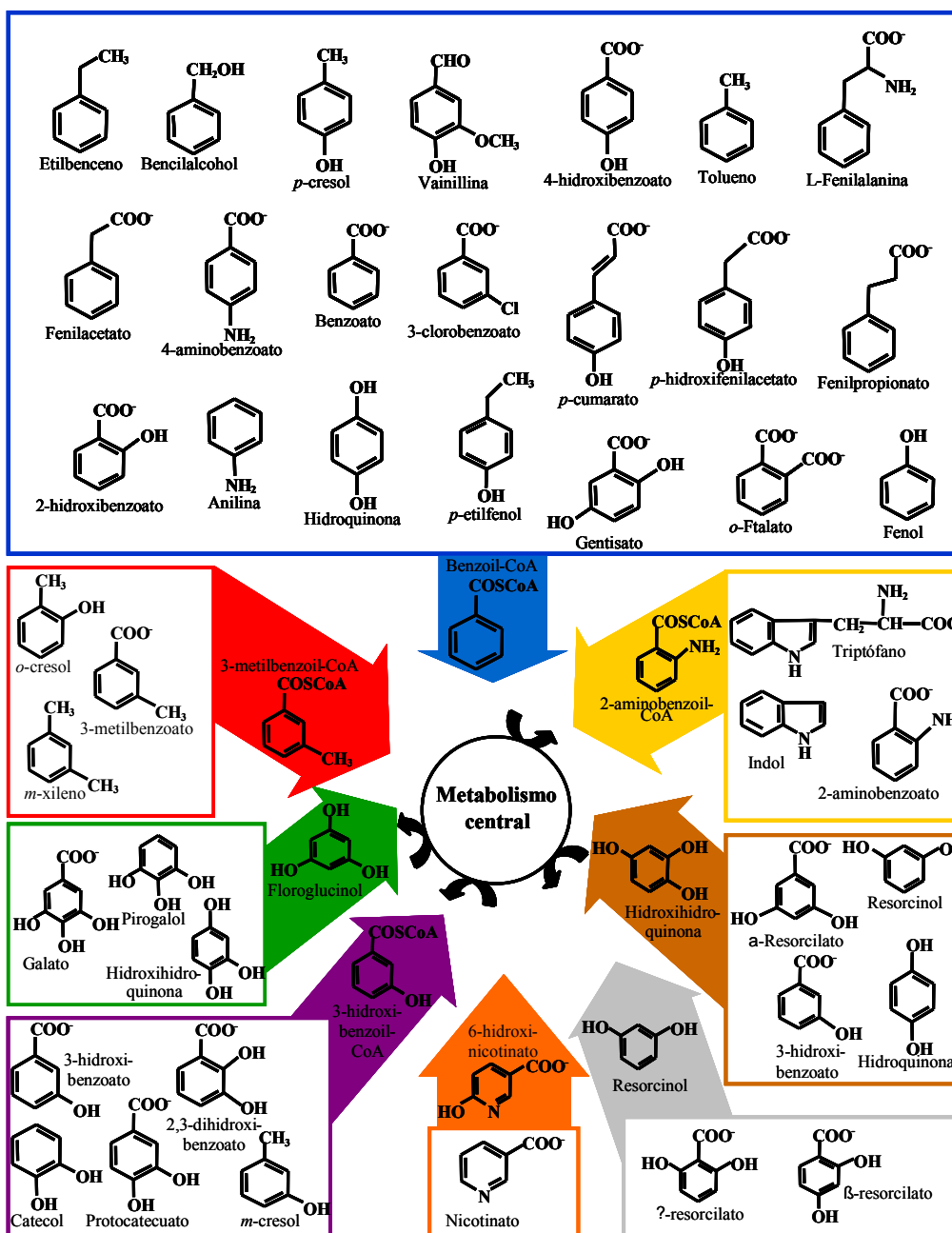


Figura 3. Rutas periféricas del catabolismo anaeróbico de los compuestos monoaromáticos. Un amplio rango de compuestos aromáticos (enmarcados en diferentes recuadros coloreados en la figura) se degrada a través de diferentes rutas periféricas dando lugar a un número limitado de intermediarios centrales (flechas rellenas), tales como benzoil-CoA, 2-aminobenzoil-CoA, 3-hidroxibenzoil-CoA, 3-metilbenzoil-CoA, 6-hidroxinicotinato, resorcinol, floroglucinol e hidroxihidroquinona. Todos estos compuestos son desaromatizados y canalizados al metabolismo central de la célula a través de las denominadas rutas centrales. Como se puede apreciar, algunos de los compuestos aromáticos pueden ser degradados a través de diferentes rutas periféricas y centrales.

Algunos ejemplos representativos de enzimas CoA-ligasas caracterizadas son la benzoato-CoA ligasa de *A. evansii* (Mohamed *et al.*, 2001) *R. palustris* (Egland *et al.*, 1995), *T. aromatica* (Schühle *et al.*, 2003), *Azoarcus* sp. CIB (López-Barragán *et al.*, 2004), *Burkholderia xenovorans* LB400 (Bains y Boulanger, 2007), la 4-hidroxibenzoato-CoA ligasa de *R. palustris* (Biegert *et al.*, 1993), *T. aromatica* (Gibson *et al.*, 1994), y la fenilacetato-CoA ligasa de *A. evansii* (Mohamed y Fuchs, 1993), *P. Putida* (Miñambres *et al.*, 1996) y *E. coli* (Ferrández *et al.*, 1998).

Para que las CoA-ligasas cumplan su función enzimática correspondiente, requieren de Mg^{2+} como cofactor, así como los sustratos ATP y CoA. El CoA es incorporado al compuesto aromático mientras que el ATP es hidrolizado a AMP + 2Pi.

No obstante, como se puede ver en la figura 3, aparte de la esterificación con CoA como mecanismo general de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos, existen algunos compuestos que son transformados a floroglucinol, resorcinol o hidroxihidroquinona, los cuales no requieren activación mediada por CoA ligasas para su posterior degradación (Schink *et al.*, 2000).

1.2.2. Rutas centrales del catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos

Las distintas rutas periféricas, catalizan la degradación de los compuestos aromáticos hacia un número reducido de metabolitos intermediarios (Fig. 3). En base al intermediario central generado, los microorganismos han desarrollado diversas rutas centrales encargadas de la transformación de dichos metabolitos en compuestos que forman parte del metabolismo central de la célula. Entre las rutas centrales mejor caracterizadas, se encuentra la encargada de la degradación del benzoil-CoA, siendo éste, el intermediario más frecuente y mejor estudiado (Breese *et al.*, 1998; Egland *et al.*, 1997; López-Barragán *et al.*, 2004; Shinoda *et al.*, 2005; Wischgoll *et al.*, 2005; Darley *et al.*, 2007). Las rutas centrales de degradación del 3-hidroxibenzoil-CoA, resorcino, floroglucinol, hidroxihidroquinona y 6-hidroxinicotinato también han sido descritas, aunque han sido estudiadas en menor medida (Boll, 2005; Darley *et al.*, 2007; Heider *et al.*, 1998; Laempe *et al.*, 2001; Lochmeyer *et al.*, 1992; Philipp y Schink, 1998; Schink *et al.*, 2000; Wöhlbrand *et al.*, 2007).

1.2.3. Bioquímica de la ruta central del benzoil-CoA

El benzoato ha sido utilizado como compuesto modelo para el estudio de la principal ruta anaeróbica de degradación de compuestos aromáticos, no solo por ser el

más comúnmente degradado por los microorganismos, sino también por su mayor solubilidad y menor toxicidad comparando con otro tipo de compuestos aromáticos. El catabolismo anaeróbico del benzoato ha sido estudiado en algunos microorganismos anaerobios facultativos como *T. aromatica* (Breese *et al.*, 1998), *Azoarcus* spp. (Fuchs, 2008; López-Barragán *et al.*, 2004), *Magnetospirillum* spp (López Barragan *et al.*, 2004), *R. palustris* CGA009 (Egland *et al.*, 1997), *D. multivorans* (Peters *et al.*, 2004), *G. metallireducens* GS-15 (Wischgoll *et al.*, 2005) y *S. aciditrophicus* (McInerney *et al.*, 2007).

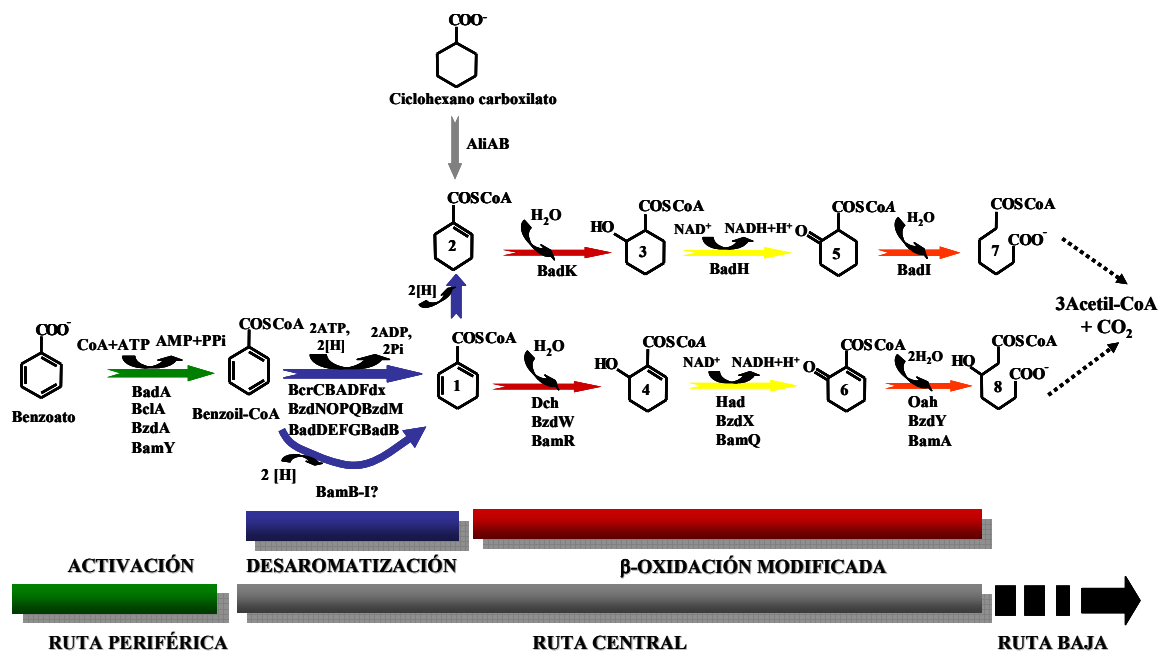


Figura 4. Reacciones enzimática de la ruta del catabolismo anaeróbico del benzoato en diferentes bacterias. En la parte inferior de la figura, se indican las diferentes fases de la degradación anaeróbica del benzoato: (I) Ruta periférica o activación del benzoato a benzoil-CoA (recuadro verde) por medio de la benzoato-CoA ligasa (flecha verde); (II) Ruta central, o alta del benzoil-CoA (recuadro gris), donde tiene lugar la desaromatización o reducción del anillo aromático (recuadro azul) por medio de la benzoil-CoA reductasa (flecha azul) y la β-oxidación modificada (recuadro rojo) mediante procesos de hidratación (flechas rojas), deshidrogenación (flechas amarillas) e hidrólisis (flechas naranjas) del compuesto alicíclico; (III) Ruta baja del benzoil-CoA (flecha negra segmentada) que genera 3 moléculas de acetil-CoA y una de CO₂. También se muestra la ruta convergente del ciclohexanocarboxilato, el cual es activado por una CoA-ligasa (AliA) y seguidamente deshidrogenada por una ciclohexanocarboxil-CoA deshidrogenasa (AliB) (flecha gris). Se indican también las enzimas implicadas en cada una de las etapas señaladas en *R. palustris* (Bad), *Thauera* / *Magnetospirillum* (Bcr), *Azoarcus* (Bzd), *Geobacter* / *Syntrophus* / *Desulfitobacterium* (Bam). Los distintos metabolitos representados en la figura se indican a continuación: (1) ciclohex-1,5-dieno-1-carbonil-CoA; (2) ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA; (3) 6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA; (4) 2-hidroxiciclohex-1-carbonil-CoA; (5) 6-cetociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA; (6) 2-cetociclohexano-1-carbonil-CoA; (7) 3-hidroxipimelil-CoA; (8) pimelil-CoA.. La serie de metabolitos (2, 3, 5, 7), sólo ha sido descrita en *R. palustris*, microorganismo en el que la benzoil-CoA reductasa BadDEFG realiza una reducción extra del anillo aromático, mientras que la serie (1, 4, 6, 8), está presente en bacterias de los géneros *Thauera*, *Azoarcus*, *Magnetospirillum*, *Geobacter* y *Syntrophus*.

En todos los casos citados, la degradación del benzoato tiene lugar a través de una ruta periférica que consiste en una reacción única que activa el benzoato a benzoil-CoA por medio de la enzima benzoato-CoA ligasa. De esta manera, el benzoil-CoA es sucesivamente transformado hasta generar los productos acetyl-CoA y CO₂ mediante una serie de reacciones que forman parte de la ruta central del benzoil-CoA. La ruta central puede ser dividida en dos segmentos catabólicos: la ruta central propiamente dicha o “ruta alta”, que transforma el benzoil-CoA en un compuesto alifático C-7-dicarboxil-CoA, y la “ruta baja”, que convierte el producto de la ruta alta en acetyl-CoA y CO₂ (Fig. 4) (Blázquez *et al.*, 2008; Carmona y Diaz, 2005; Carmona *et al.*, 2009)

1.2.3.1. Ruta alta del benzoil-CoA

La denominada ruta alta del benzoil-CoA, está constituida por dos segmentos metabólicos principales: 1) la reducción del anillo del benzoil-CoA y 2) la β -oxidación modificada del compuesto alicíclico generado, que dará lugar al éster de CoA, sustrato de la ruta baja.

- **Reducción del anillo aromático:** Este segmento metabólico es clave en el proceso de degradación anaeróbica del benzoil-CoA, ya que en él, tiene lugar la eliminación del carácter aromático del anillo. Esta reacción es catalizada por una benzoil-CoA reductasa (BCR), la cual tiene la característica de ser la única enzima de la ruta estrictamente sensible a la presencia de oxígeno. El proceso de reducción del benzoil-CoA, es llevado a cabo mediante un mecanismo similar a la reacción de Birch, de tal forma que se produce una transferencia de protones y electrones a potenciales redox extremadamente bajos (Boll, 2005; Boll y Fuchs, 2005). Esta reducción es facilitada por el grupo tioéster, lo que explica porqué las rutas anaeróbicas suelen implicar tioésteres de CoA (Fuchs, 2008). El proceso de reducción del benzoil-CoA puede agruparse en dos grupos: (a) En *T. aromatica*, *Azoarcus* spp., *G. metallireducens* y *S. acidithrophicus*, en donde el benzoil-CoA es reducido a ciclohex-1,5-dieno-1-carbonil-CoA (dienoil-CoA), (b) en *R. palustris*, se produce una reducción extra que implica la adición de dos electrones que da lugar a ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (enoil-CoA) (Carmona y Diaz, 2005; Egland *et al.*, 1997; Boll, 2005).
- **β -oxidación modificada:** tras la formación del producto alicíclico resultante de la acción de la BCR, experimenta una serie de reacciones en cadena similares a una β -oxidación, mediante las cuales se incorpora una molécula de agua al doble enlace por la acción de una acil-CoA hidratasa, posteriormente se lleva a cabo una deshidrogenación catalizada por una hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y finalmente, la hidrólisis del compuesto alicíclico por medio de una oxoacil-CoA hidrolasa,

generándose un compuesto alifático C7-dicarboxil-CoA. Dependiendo de la naturaleza del producto de la reducción del benzoil-CoA, se han definido dos vías alternativas:

- a) β -oxidación tipo *Thauera*: descrita por primera vez en esta bacteria, emplea como sustrato el dienil-CoA cíclico producto de la acción de la BCR y que genera 3-hidroxi-pimelil-CoA (Laempe *et al.*, 1998; Laempe *et al.*, 1999).
- b) β -oxidación tipo *Rhodopseudomonas*: descrita en *R. palustris*, cataliza la transformación del enoil-CoA cíclico producto de la acción de la BCR, dando lugar a la formación de pimelil-CoA (Pelletier y Harwood, 1998).

El análisis comparativo entre las enzimas implicadas en las dos variantes de la ruta, muestra diferencias significativas, tanto en su estructura primaria como en la especificidad de sustrato de cada una de ellas (Carmona *et al.*, 2009).

1.2.3.2. Ruta baja del benzoil-CoA

La ruta baja, es la responsable de la degradación de los derivados alifáticos dicarboxil-CoA, hasta generar tres moléculas de acetil-CoA (Gallus y Schink, 1994; Harrison y Harwood, 2005). La degradación del pimelil CoA continúa con un proceso β -oxidativo que da lugar a la formación de 3-hidroxi-pimelil-CoA tanto en la ruta tipo *Rhodopseudomonas* como en la tipo *Thauera* (Harrison y Harwood, 2005). Este compuesto sufre una β -oxidación, en la que se termina produciendo glutaril-CoA y liberándose una molécula de acetil-CoA.

En algunos microorganismos como las bacterias fermentadoras o reductoras de sulfato, el glutaril-CoA es oxidado por una glutaril-CoA deshidrogenasa dependiente de NAD^+ y posteriormente descarboxilado por una glutaconil-CoA descarboxilasa anclada a la membrana que es dependiente de sodio y acopla la descarboxilación con el paso de iones de sodio a través de la membrana, dando lugar a la síntesis de ATP (Dimroth y Schink, 1998). Este proceso de transformación de glutaril-CoA a crotonil-CoA acoplado a la síntesis de ATP, permite el mantenimiento de un balance energético positivo durante la degradación de compuestos aromáticos en microorganismos fermentadores y reductores de sulfato (Elshahed y McInerney, 2001; Wischgoll *et al.*, 2005).

Las actividades enzimáticas responsables del metabolismo que transforma el crotonil-CoA en acetil-CoA, como por ejemplo la de la crotonil-CoA hidratasa, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa y acetoacetil-CoA tiolasa, han sido descritas en diversas bacterias, y se trata de actividades implicadas en la ruta general de degradación

de ácidos grasos de cadena corta (Gallus y Schink, 1994; Auburger y Winter, 1996; Elshahed *et al.*, 2001; Elshahed y McInerney, 2001). Se han identificado los presuntos genes codificantes de las enzimas implicadas mediante análisis *in silico* de los genomas de algunas bacterias biodegradadoras anaeróbicas (Harrison y Harwood, 2005; Rabus, 2005)

2. Genética de la ruta de degradación del benzoato

Los genes implicados en la degradación anaeróbica de benzoato fueron estudiados inicialmente en *T. aromatica* (Breese *et al.*, 1998) y en *R. palustris* (Egland *et al.*, 1997). La figura 5, muestra la organización de los genes que constituyen los *clusters* génicos relacionados con la degradación anaeróbica de benzoato en diferentes microorganismos (Carmona *et al.*, 2009).

En *R. palustris*, los genes implicados en la degradación anaeróbica de varios compuestos aromáticos se encuentran agrupados en un mismo *cluster* de 25.4 kb, que incluye los genes *bad* (responsables de la degradación del benzoato), los genes *ali* (responsables de la degradación el ciclohexanocarboxilato) y los genes *hba* (encargados de la degradación de 4-hidroxibenzoato) (Fig. 5). Los genes *badDEFG* constituyen una unidad transcripcional inducible específicamente por benzoato y codifican las cuatro subunidades de la benzoil-CoA reductasa (Egland *et al.*, 1997). El gen *badA* codifica la enzima benzoato-CoA ligasa, responsable de la activación de la ruta mediante la transformación del benzoato a benzoil-CoA, el producto del gen *badB* forma parte de la misma unidad transcripcional que *badA*, y presenta una identidad significativa (50%) con proteínas de tipo ferredoxina, y posiblemente codifique una enzima implicada en la donación de electrones en el proceso de reducción del anillo aromático. Los genes *badH* y *badK*, codifican proteínas del tipo flavín-deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa, respectivamente, implicadas en las reacciones de oxidación del ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA a 2-cetociclohexano-1-carbonil-CoA hidrolasa, catalizando a la apertura del anillo alicíclico (Fig. 4). Los genes *badH*, *badK* y *badI* constituyen, junto con los genes *aliA* y *aliB*, otra unidad transcripcional divergente a la del resto de los genes *bad*. Por otra parte, se ha identificado en *R. palustris* el *cluster pimFABCDE*, cuyos productos podrían estar implicados en la ruta baja del catabolismo de los intermediarios dicarboxílicos. Esta agrupación génica, se encuentra organizada formando un operón cuya expresión es inducida cuando el microorganismo crece anaeróbicamente en benzoato o pimelato y en el que se encontrarían codificadas todas las enzimas

En *T. aromatica*, los genes que codifican las enzimas encargadas de la degradación anaeróbica del benzoato, se agrupan en un *cluster* de 7.9 kb (*cluster bcr*), constituido por al menos ocho genes transcritos en la misma dirección (Fig. 5). El gen *bclA*, que codifica la benzoato-CoA ligasa en *T. aromatica*, no forma parte del *cluster bcr*, sino que se encuentra localizado en el *cluster* génico *box*, implicado en la degradación aeróbica del benzoato (Schühle *et al.*, 2003). El operón divergente de la agrupación génica responsable de la ruta central del benzoil-CoA, agrupa a los genes *korA* y *korB*, que codifican las dos unidades necesarias para la actividad α -cetoglutarato óxido-reductasa, conocida como KGOR, cuya función consiste en regenerar el estado reducido de la ferredoxina que participa en la reacción catalizada por la benzoil-CoA reductasa (Dörner y Boll, 2002).

También se han identificado los genes responsables para la degradación del benzoato en diferentes cepas del género *Magnetospirillum* (López Barragan *et al.*, 2004; Matsunaga *et al.*, 2005; Shinoda *et al.*, 2005; Kawaguchi *et al.*, 2006), los cuales muestran una identidad de secuencia y una organización génica muy similar a la de los genes *bcr* de *T. aromática* (Fig. 5) Además, el gen *bclA* se localiza fuera del *cluster bcr* en las bacterias del género *Magnetospirillum*, como en el caso de *T. aromatica*.

El análisis del genoma de *G. metallireducens*, permitió encontrar tres agrupaciones génicas relacionadas con la degradación anaeróbica del benzoato, las cuales se encuentran localizadas dentro de una posible isla metabólica (Wischgoll *et al.*, 2005) (Fig. 5). El *cluster* IA codifica las diferentes subunidades que componen la benzoil-CoA reductasa (*bam B-I*), característica compartida por otros microorganismos anaerobios estrictos (Kung *et al.*, 2009), así como la actividad hidrolasa del anillo alicíclico, *bamA* (Kuntze *et al.*, 2008). El *cluster* II, está constituido por los genes que codifican la benzoato-CoA ligasa (*bamY*) (Wischgoll *et al.*, 2005), la deshidrogenasa (*bamQ*) (Wischgoll *et al.*, 2005) y la hidratasa (*bamR*) (Peters *et al.*, 2007), enzimas implicadas en la β -oxidación modificada del producto de la reducción del benzoil-CoA. Por otro lado, el *cluster* IB, contiene los genes presuntamente implicados en la ruta baja de degradación del benzoato en este anaerobio estricto (Wischgoll *et al.*, 2005). La diversidad de actividades enzimáticas que podrían estar codificadas dentro del *cluster* IB de *G. metallireducens*, sugiere que en los microorganismos anaerobios estrictos, la ruta baja precisa de sistemas enzimáticos más complejos que los identificados en microorganismos anaerobios facultativos (Carmona *et al.*, 2009).

En *S. aciditrophicus* se ha encontrado un único *cluster* que codifica las enzimas implicadas en la activación del benzoato, además de la reducción y β -oxidación del producto de ruptura (McInerney *et al.*, 2007) (Fig. 5).

En el género *Azoarcus/Aromatoleum*, han sido identificados los genes *bzd* como los responsables de la degradación anaeróbica del benzoato (Fig. 5). El *cluster bzd* está organizado en dos unidades transcripcionales orientadas en la misma dirección, el gen regulador *bzdR* y el operón catabólico *bzdNOPQMSTUVWXYZA* (López-Barragán *et al.*, 2004). Los genes *bzdNOPQ* y *bzdM*, codifican las cuatro subunidades de la benzoil-CoA reductasa y su correspondiente ferredoxina, respectivamente. El gen *bzdV* codifica una presunta oxidoreductasa implicada en la regeneración del estado reducido de la ferredoxina BzdM. Las actividades enzimáticas necesarias para la β -oxidación modificada (hidratasa/deshidrogenasa/hidrolasa) estarían codificadas por los genes *bzdW*, *bzdX* y *bzdY*, respectivamente. Los productos de estos tres últimos genes, muestran una mayor identidad con sus homólogos en *T. aromatica* que con los de *R. palustris*, lo que sugiere que el tipo de β -oxidación que tendría lugar, seguiría el mismo patrón que en *T. aromatica*, lo que resulta en la formación de 3-hidroxi pimelil-CoA como producto final (Fig. 4). Cabe destacar que el gen *bzdA* que codifica para la benzoato-CoA ligasa, responsable de la activación del benzoato a benzoil-CoA (Fig. 4), se encuentra localizado al final del *cluster bzd* (López-Barragán *et al.*, 2004), al contrario de lo que sucede en *T. aromática* en donde su gen ortólogo (*bcrA*), se sitúa fuera del *cluster* de degradación anaeróbica de benzoato. Los productos de los genes *bzdS*, *bzdU* y *bzdZ*, son proteínas con función desconocida hasta la fecha. En la posición 3' del *cluster bzd*, se han localizado seis genes (*bzdB1B2B3B4B5*), cuyos productos génicos presentan una elevada identidad con las cinco subunidades de transportadores de tipo ABC y con un transportador de tipo MFS (*bzdK*), posiblemente implicado en el transporte de benzoato (Rabus, 2005) (Fig. 5).

3. Regulación de la expresión génica en rutas de degradación de compuestos aromáticos

La capacidad de los microorganismos de degradar compuestos aromáticos es dependiente no sólo de la presencia del conjunto de genes catabólicos adecuado que codifique las enzimas necesarias para la degradación de estos compuestos, sino también de la capacidad de expresar estas proteínas en el momento adecuado. El control de la expresión de los genes catabólicos no depende únicamente de la presencia o ausencia de

compuestos aromáticos en el medio, sino también de una amplia variedad de estímulos ambientales, que pueden incluir la tensión de oxígeno, la presencia o ausencia de luz o las variaciones en el pH, entre otros factores (Cases y de Lorenzo, 2005; Lovley, 2003). La regulación puede ser llevada a cabo en diferentes niveles moleculares, como pueden ser la transcripción, la traducción o etapas posteriores a ésta, siendo la regulación transcripcional la más común de todas ellas, o al menos la más estudiada (Shingler, 2003; Carmona *et al.*, 2009; Diaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004; Crosby *et al.*, 2010).

Cuando se lleva a cabo un análisis global de las proteínas reguladoras que controlan el catabolismo de compuestos aromáticos se puede encontrar una gran divergencia en sus correspondientes orígenes evolutivos, lo que sugiere que genes catabólicos y reguladores podrían haber evolucionado independientemente (Cases y de Lorenzo, 2005; de Lorenzo y Perez-Martin, 1996). Uno de los posibles caminos evolutivos que ha permitido obtener reguladores capaces de responder a señales similares de forma diferente, es la combinación de dominios reguladores similares (que presenten motivos de unión a moléculas de estructura química parecida) con diferentes dominios de unión a distintas secuencias de DNA. Otra de las estrategias establecería la diferencia a nivel del promotor, de forma que, aunque los reguladores muestren una arquitectura muy similar, podrían ser responsables de diferentes efectos en la célula dependiendo de la localización de los sitios de unión (regiones operadoras) en un determinado promotor. Esto permitiría que un mismo regulador pueda activar ciertos genes cuando se une en una posición localizada en posición 5' con respecto de la región de unión de la RNA polimerasa, a la vez que puede reprimir otros genes cuando se une en posición 3' respecto de dicha región. Todas estas posibilidades son las responsables del extraordinario grado de plasticidad y adaptabilidad que presenta la evolución de las redes de regulación (Tropel y van der Meer, 2004; Cases y de Lorenzo, 2005; Diaz y Prieto, 2000).

Aunque la mayor parte de la información existente sobre regulación de los genes implicado en el metabolismo de los compuestos aromáticos proviene de las rutas de degradación aeróbicas, de las cuales se ha caracterizado un gran número de reguladores implicados en el control de la expresión de los genes catabólicos (Tabla 1), en los últimos años se ha producido un progreso notable en el estudio y determinación de reguladores en rutas anaeróbicas, obteniéndose múltiples evidencias de que los mismos

principios establecidos para la regulación aeróbica pueden ser aplicables a la regulación de rutas anaeróbicas.

| Regulador | Familia | Microorganismo | Actividad | Ruta | Nº de Acceso |
|-------------------------------|------------------|------------------------------|-----------|------------------------------|------------------------|
| Con efector específico | | | | | |
| CatM | LysR | <i>A. Bayylyi</i> ADP1 | A | Catecol | P07774 |
| AphT | LysR | <i>C.testosterroni</i> T2 | A | Fenol | BAA12810 |
| CdoR | LysR | <i>Comamomonas</i> sp. JS165 | A | Catecol | AAC79916 |
| BoxR _a | BzdR | <i>A. evansii</i> | D | Benzoato | AAN39374 |
| PcaR | IciR | <i>P. putida</i> PRS2000 | D | Protocatecuato | Q5P8R7 |
| TodS/T | TCS _b | <i>P. putida</i> F1 | A | Tolueno | AAC45438/ AAC45439 |
| TutBC | TCS _b | <i>Thauera</i> sp. T1 | A | Tolueno | AAD12185/ AAD13184 |
| BphPQ | TCS _b | <i>Acidovorax</i> sp KKS102 | A | PCB/Bifenilos | BAE94501 / BAE94500 |
| BpdST | TCS _b | <i>Rhodococcus</i> sp. M5 | A | Bifenilos/Policlorobifenilos | AAK50369 / AAK50368 |
| StySR | TCS _b | <i>P. fluorescens</i> ST | A | Estireno | CAI07438 / CAI07439 |
| HmgR | IeIR | <i>P. putida</i> | R | Homogentisato | AA012526 |
| PaaX | GntR | <i>E. coli</i> W | R | Fenilacetato | CAA66101 |
| VanR | GntR | <i>A. bailyi</i> | R | Vainillato | O24839 |
| XylL | XylL/DmpR | <i>P. putida</i> mt-2 (pWW0) | A | Tolueno | AAA26028 |
| PoxR | XylL/DmpR | <i>R. eutropha</i> E2 | A | Fenol | AAC32451 |
| TmbR | XylL/DmpR | <i>P. putida</i> TMB | A | Trimetilbenceno | U41301 |
| HbpR | XylL/DmpR | <i>P. azelaica</i> | A | 2-hidroxibifenilo | AAA84988 |
| PobR | XylS/AraC | <i>A. chroococcum</i> | A | 4-hidroxibenzoato | AAF03756 |
| XylS | XylS/AraC | <i>P. putida</i> mt-2 (pWW0) | A | Tolueno | AAA26029 |
| HpaA | XylS/AraC | <i>E. coli</i> W | A | Tolueno | Z37980 |
| OxoS | XylS/AraC | <i>P. putida</i> 86 | A | Quinolina | CAA73202 |
| HpaR | MarR | <i>E. coli</i> W | R | Homoprotocatecuato | Z37980 |
| CbaR | MarR | <i>C. testosteroni</i> BR60 | R | Clorobenzoato | AAG00065 |
| CymR | TetR | <i>P. putida</i> F1 | R | p-cimeno | ABA62296 |
| HdnoR | TetR | <i>A. nicotinovorans</i> | R | Nicotina | ABA41004 |

Tabla 1. Algunos ejemplos de proteínas implicadas en la regulación transcripcional del catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos. En la tabla, se muestran algunos reguladores transcripcionales que intervienen en la regulación de las rutas aeróbicas de degradación de compuestos aromáticos. También se incluyen algunos sistemas de dos componentes (b), que están implicados en la regulación de estas rutas. Se indica el microorganismo que da origen a dichas proteínas, su actividad represora (R), activadora (A) y su correspondiente número de acceso en el GenBank.

No obstante, aún se desconocen multitud de elementos reguladores responsables del control de dichas rutas metabólicas, y sólo unos pocos han sido caracterizados y relacionados con la regulación transcripcional de este tipo de rutas. Se han caracterizado algunos reguladores específicos de efector y otra serie más amplia, de proteínas potencialmente reguladoras, que pertenecen a diversas familias de reguladores transcripcionales y que podrían controlar la expresión de genes implicados en catabolismo de compuestos aromáticos (Tabla 2) (Carmona *et al.*, 2009).

| Regulador | Familia | Microorganismo | Actividad | Ruta | Nº de Acceso |
|-------------------------------------|------------------|---------------------------------|-----------|---------------------------------------|------------------------|
| Con efector específico | | | | | |
| BzdR | BzdR | <i>Azoarcus</i> sp. CIB | R | Benzoato | AAQ08805 |
| ORF11 _a | XylR/DmpR | <i>T. aromatica</i> K172 | D | Fenol | CAC12685 |
| PdeR _a | XylR/DmpR | <i>A. Aromarticum</i> EbN1 | D | Fenol | Q5P474 |
| Gmet1542 _a | XylR/DmpR | <i>G. metallireducens</i> GS-15 | D | Tolueno | ABB31776 |
| EbA324 | XylR/DmpR | <i>A. Aromarticum</i> EbN1 | D | <i>p</i> -Etilfenol | Q5P8R7 |
| TutC1/B1 | TCS _b | <i>T. aromatica</i> T1 | A | Tolueno | AAD12187 / AAD12186 |
| TdiS/R _a | TCS _b | <i>T. aromatica</i> K172 | A | Tolueno | CAA05048/ CAA05049 |
| TdiS/R _a | TCS _b | <i>A. Aromarticum</i> EbN1 | A | Tolueno | CAI07156 / CAI07155 |
| TdiS/R _a | TCS _b | <i>Azoarcus</i> sp. T | A | Tolueno | AAK50369 / AAK50368 |
| Tcs2/Tcr2 _a | TCS _b | <i>A. Aromarticum</i> EbN1 | A | Etilbenceno | CAI07438 / CAI07439 |
| Tcs1/Tcr1 _a | TCS _b | <i>A. Aromarticum</i> EbN1 | A | Acetofenona | CAI07436 / CAI07437 |
| BamV/BamW | TCS _b | <i>G. metallireducens</i> GS-15 | A | Benzoato | ABB32375/ ABB32374 |
| HbaR | FNR/CRP | <i>R. palustris</i> CGA009 | A | <i>p</i> -hidroxibenzoato | AAF04013 |
| CprK | FNR/CRP | <i>D. hafniese</i> | A | <i>o</i> -clorofenol | AAL8770 |
| GcdR | LysR | <i>Azoarcus</i> sp. CIB | A | Ruta baja del benzoil-CoA | ABM69269 |
| NicRa | LysR | <i>E. barkeri</i> | D | Nicotinato | ABC88392 |
| PadRa | GntR | <i>A. Aromarticum</i> EbN1 | D | Fenilacetato | CAI09182 |
| Rpd1521 _a | GntR | <i>R. palustris</i> BisB5 | D | Fenilacetato | ABE38758 |
| ORF1a | MarR | <i>T. aromatica</i> K172 | D | <i>p</i> -hidroxibenzoato | O33817 |
| PcmQa | MarR | <i>G. metallireducens</i> GS-15 | D | <i>p</i> -hidroxibenzoato | ABB32362 |
| BadR | MarR | <i>R. palustris</i> CGA009 | A | Benzoato | AAC23923 |
| Rpa1794 _a | MarR | <i>R. palustris</i> CGA009 | D | <i>p</i> -cumarato | Q6N8V9 |
| EbA715 _a | TetR | <i>A. Aromarticum</i> EbN1 | D | <i>m</i> -hidroxibenzoato | CAI06487 |
| Gmet1520 _a | TetR | <i>G. metallireducens</i> GS-15 | D | Tolueno | ABB31754 |
| BadM | Rfr2 | <i>R. palustris</i> CGA009 | R | Benzoato | O07465 |
| Dependiente de O₂ | | | | | |
| AadR | FNR/CRP | <i>R. palustris</i> CGA009 | A | Benzoato <i>p</i> -hidroxibenzoato | B43334 |
| AcpR | FNR/CRP | <i>Azoarcus</i> sp. CIB | A | Benzoato | AAy81959 |

Tabla 2. Proteínas implicadas en la regulación transcripcional del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos (Modificado de Carmona et al., 2009). En la tabla, se muestran las proteínas que han sido descritas de intervenir en la regulación de las rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos y las que han sido predichas de intervenir de la misma manera (a), también se incluyen los sistemas de dos componentes (b), que están implicados en la regulación de estas rutas. Se indica el microorganismo que da origen a dichas proteínas, su actividad represora (R), activadora (A) o desconocida (D) y su correspondiente número de acceso en el GenBank.

Adicionalmente, cuando las bacterias se encuentran en su medio natural, se enfrentan a un gran número de señales químicas, físicas y biológicas que necesitan procesar con el fin de dar una respuesta fisiológica. Entre estas señales, cabe destacar las múltiples fuentes de carbono que una bacteria puede encontrar en el medio, por lo que necesita decidir cuál de ellas debe consumir preferentemente, en detrimento de las demás, con el fin de optimizar su metabolismo. Por ello, las bacterias han desarrollado una serie de mecanismos fisiológicos de control que establecen una regulación

sobreimpuesta a la regulación específica de los operones catabólicos en base al estado fisiológico y metabólico de la célula (Cases y de Lorenzo, 2005; Prieto *et al.*, 2004; Shingler, 2003; Silva-Rocha *et al.*, 2011). En la figura 6, se representan los diferentes niveles de regulación que modulan el catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias. En la regulación sobreimpuesta participan reguladores globales, los cuales controlan a su vez complejas redes de regulación constituidas por diferentes reguladores específicos.

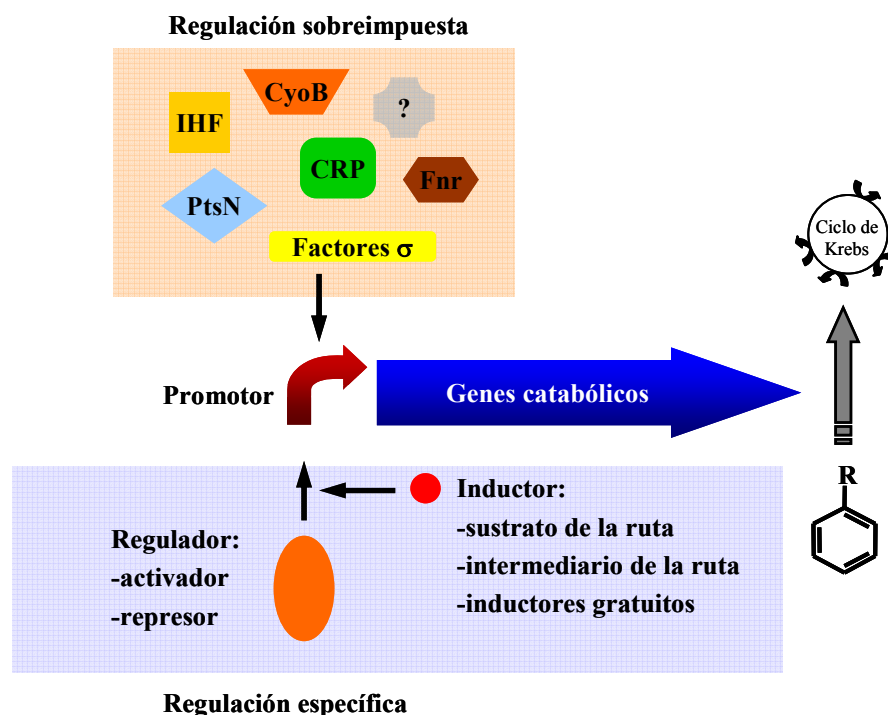


Figura 6. Esquema de los dos niveles de regulación transcripcional del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias. En la degradación de un compuesto aromático, la interacción regulador/promotor es el mecanismo de regulación específico en presencia de la molécula inductora de la ruta (sombreado azul). Un segundo nivel de control está constituido por la regulación global o sobreimpuesta (sombreado naranja), en la que participan reguladores globales como IHF (*Integration Host Factor*), CRP (*cAMP Receptor Protein*), FNR (*Eumarate nitrate reductase regulator*), factores σ alternativos de la RNAP, CyoB (citocromo ó ubiquinol oxidasa), PtsN (proteína IIA_{Ntr}), etc. (Adaptado de Díaz y Prieto, 2000).

El concepto de regulación sobreimpuesta, encaja con la idea de integración de la señal en una red de regulación global, lo que podría explicar que muchos reguladores específicos pueden influir en la expresión de un escaso número de genes, a la vez que unos pocos reguladores globales determinen la expresión de un elevado número de genes (Cases y de Lorenzo, 2005). La gran mayoría de los reguladores implicados en la regulación sobreimpuesta del catabolismo de compuestos aromáticos han sido descritos en rutas aeróbicas (Marqués *et al.*, 2006; Moreno y Rojo, 2008; Prieto *et al.*, 2004; Shingler, 2003), sin embargo, también se han descrito algunos reguladores globales en

rutas de degradación anaeróbicas de aromáticos (Tabla 1), como es el caso de AadR de *R. palustris* (Dispensa *et al.*, 1992; Eglund y Harwood, 1999) y de AcpR de *Azoarcus* sp. CIB (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006), que controlan la expresión génica en condiciones de anaerobiosis (Tabla 2).

3.1. Regulación específica de efector

Tanto en el catabolismo aeróbico, como en el anaeróbico de compuestos aromáticos, tiene lugar un control estricto de la regulación en respuesta a su respectivo sustrato (Tropel y van der Meer, 2004; Wöhlbrand *et al.*, 2007). Entre los circuitos reguladores de rutas de degradación anaeróbica, los mejor estudiados son los responsables de la regulación de la expresión de los genes del catabolismo anaeróbico del benzoato, en dos organismos modelo, la bacteria fototrófica *R. palustris* CGA009 y la bacteria desnitrificante *Azoarcus* sp. CIB.

3.1.1. Regulación del cluster *bad* de *R. palustris*

En *R. palustris* se ha demostrado mediante estudios clásicos de expresión génica (Eglund y Harwood, 1999; Eglund *et al.*, 1997; Pelletier y Harwood, 2000; Peres y Harwood, 2006) y a través de aproximaciones más globales como la proteómica (Pan *et al.*, 2008; VerBerkmoes *et al.*, 2006), que la inducción de los genes *bad* es dependiente de benzoato. El producto del gen *badR*, la proteína BadR (Tabla 2); (Fig. 7), pertenece a la familia MarR de reguladores transcripcionales, pero se comporta como un activador transcripcional, a diferencia de la mayoría de los miembros de esta familia, que suelen ser represores de la expresión génica. MarR es el miembro mejor caracterizado de esta familia y regula negativamente la expresión de los genes de resistencia a antibióticos *marAB*, utilizando el 2-hidroxibenzoato (salicilato) como molécula inductora (Martin y Rosner, 1995). En el caso de BadR, se desconocen los inductores que reconoce, aunque se han sugerido como posibles inductores el benzoato o el benzoil-CoA (Eglund y Harwood, 1999).

En adición a la regulación específica, dependiente de BadR, el promotor *badD*, también está controlado por el regulador AadR (Tabla 2); (Fig. 7) en respuesta a anaerobiosis (regulación sobreimpuesta) (Ver apartado 3.2). Esta proteína reguladora fue la primera cuya función fue relacionada con la regulación del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos (Dispensa *et al.*, 1992; Eglund y Harwood, 1999). Estudios preeliminares realizados con cepas de *R. palustris* defectivas en el gen *aadR*,

demonstraron que su producto génico estaba implicado en la regulación de la expresión de BadA (benzoato-CoA ligasa) y HbaA (4-hidroxibenzoato-CoA ligasa), enzimas responsables de la activación de las rutas de benzoato y 4-hidroxibenzoato, respectivamente (Dispensa *et al.*, 1992). Estudios posteriores, han sugerido que la proteína AadR podría estar involucrada en la regulación de la expresión de rutas del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en respuesta a la disponibilidad de oxígeno (Egland y Harwood, 1999), debido a su elevada identidad con el regulador global FNR de *E. coli* (Unden *et al.*, 2002)

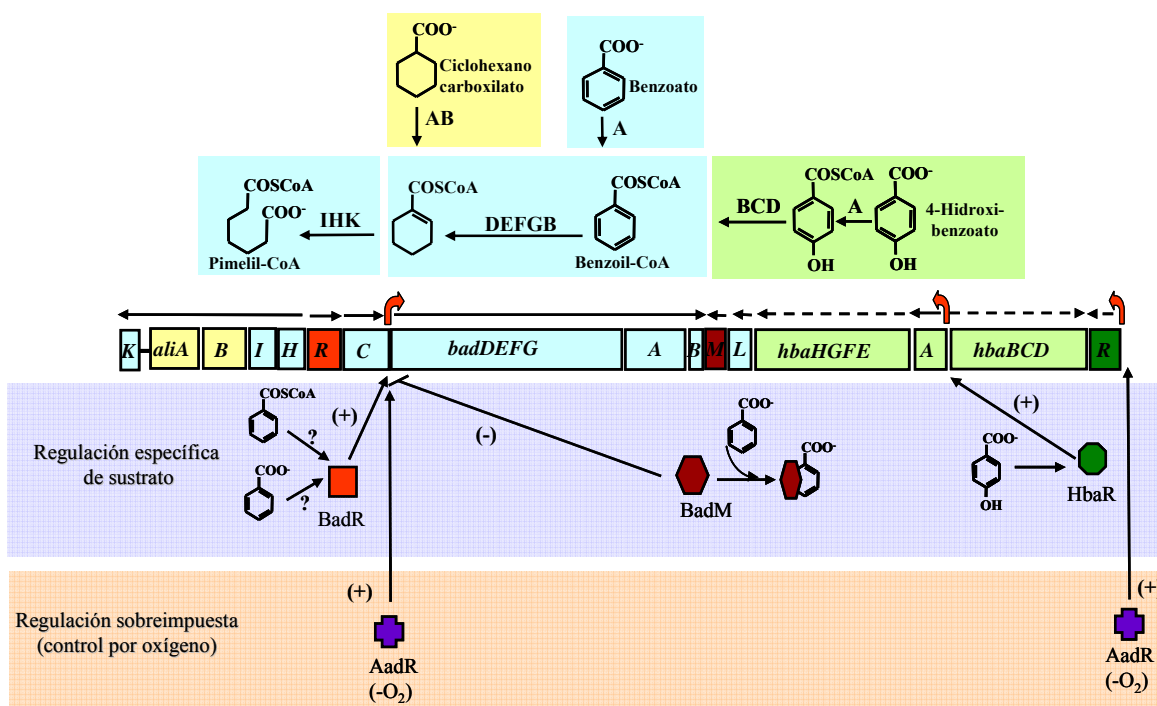


Figura 7. Organización y regulación del cluster *bad-ali-hba* de *R. palustris*. Los genes *ali*, *bad* y *hba*, se muestran en amarillo, azul y verde, respectivamente. Las enzimas codificadas por estos genes, así como las reacciones que catalizan han sido recuadradas en los mismos colores. Los genes reguladores *badR*, *badM* y *hbaR* y sus correspondientes reguladores BadR, BadM y HbaR se muestran en color rojo, rojo oscuro y verde, respectivamente (regulación específica de sustrato). El regulador AadR, que se encuentra codificado fuera de este cluster, se muestra en violeta (regulación dependiente de oxígeno). Las flechas negras localizadas en la parte superior del cluster, indican que los genes que abarcan constituyen un operón (flechas continuas) o un posible operón (flechas discontinuas). Los promotores *badD*, *hbaA* y *hbaR* han sido representados en forma de flechas curvas de color rojo. Los símbolos (-) y (+) indican represión y activación transcripcional, respectivamente.

La acción conjunta de los reguladores AadR y BadR, conlleva al incremento en los niveles de expresión de los promotores catabólicos, indispensables para el crecimiento de la bacteria en benzoato, de tal forma que cepas mutantes de *R. palustris* en los genes *badR* y *aadR* son incapaces de metabolizar anaeróticamente el benzoato (Egland y Harwood, 1999).

Un tercer regulador transcripcional implicado en el control de la actividad del promotor *badD*, es la proteína BadM (Tabla 2), que actúa como represor de la expresión de dicho promotor (Fig.7). Aunque aún no ha sido demostrado experimentalmente, se ha sugerido que el benzoato podría ser el inductor de BadM, impidiendo la interacción de la proteína con el promotor *badD* (Peres y Harwood, 2006).

A pesar de todos los estudios mencionados, quedan muchas incógnitas que resolver en la caracterización del sistema de regulación del catabolismo anaeróbico del benzoato en *R. palustris*, así por ejemplo, se desconoce la regulación del operón *badHI-aliBabadK* (Fig. 7), el cual no parece estar controlado por los reguladores BadR y BadM (Egland y Harwood, 1999; Peres y Harwood, 2006).

3.1.2. Regulación del *cluster bzd* de *Azoarcus* sp. CIB

Los genes *bzd* son los responsables del catabolismo anaeróbico del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB, los cuales son inducidos específicamente cuando las células crecen en presencia de este ácido aromático (López-Barragán *et al.*, 2004). Los genes catabólicos *bzdNOPQMSTUVWXYZA* constituyen un operón que se encuentra regulado por el promotor P_N (Fig. 8)

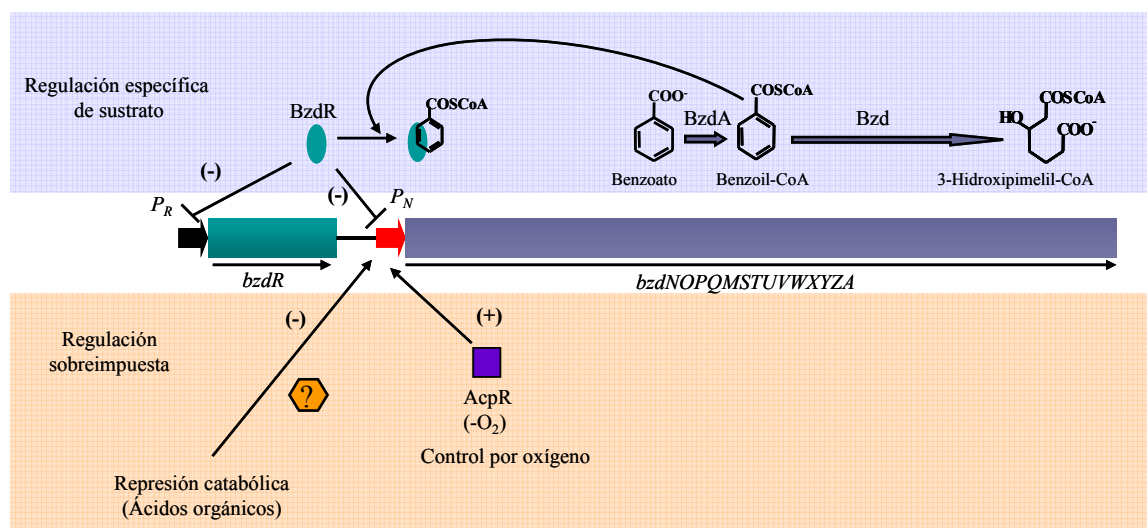


Figura 8. Organización y regulación transcripcional del *cluster bzd* de *Azoarcus* sp. CIB. Los genes se encuentran agrupados en dos operones, el gen regulador *bzdR* (verde), y el operón catabólico *bzdNOPQMSTUVWXYZA* (gris), controlados por los promotores P_R y P_N , los cuales se encuentran reprimidos por la proteína BzdR (óvalo verde). La activación de los promotores, se produce por medio de la molécula inductora, el benzoil-CoA, que se une a BzdR e impide su interacción con los promotores P_N y P_R . Algunas fuentes de carbono, tales como ácidos orgánicos no aromáticos, causan represión catabólica del promotor P_N por medio de un elemento aun desconocido hasta la fecha. La activación del promotor P_N en condiciones de anaerobiosis es dependiente de la proteína AcpR, codificada por un gen que no está localizado en el *cluster bzd*. Los símbolos (-) y (+) indican represión y activación transcripcional, respectivamente.

En posición 5' al operón catabólico, se localiza una unidad transcripcional independiente constituida por el gen *bzdR*, cuyo producto controla la expresión de los genes catabólicos mediante su interacción con el promotor P_N (Fig. 8) (Barragán *et al.*, 2005).

La proteína BzdR (Tabla2), regula negativamente la expresión de los genes catabólicos *bzd*, reprimiendo la expresión del promotor P_N cuando las células de *Azoarcus* sp. CIB crecen anaeróticamente en un medio cuya fuente de carbono no es un compuesto aromático que pueda ser transformado a benzoil-CoA. El benzoato no es el inductor de la ruta *bzd*, ya que estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que el regulador BzdR está implicado específicamente en el control de la degradación anaeróbica del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB mediante el reconocimiento de benzoil-CoA como molécula inductora (Barragán *et al.*, 2005).

El promotor P_N del cluster *bzd* ha sido caracterizado, el sitio de inicio de la transcripción se ha localizado a 75 nt respecto del codón ATG de inicio de la traducción del gen *bzdN*, y se han determinado las posibles cajas -10 y -35 de interacción con la subunidad σ^{70} de la RNAP. Experimentos de protección frente a la digestión con DNAsaI revelaron la presencia de 3 cajas operadoras del promotor P_N a las que BzdR se une: región I (-32 a +31), región II (-83 a -63) y región III (-146 a -126). Las tres regiones contienen repeticiones de la secuencia TGCA incluidas en palíndromos más largos, dos en la región I y uno en cada una de las regiones II y III (Barragán *et al.*, 2005). La unión de BzdR, induce cambios en la estructura del promotor P_N , tal y como reveló la aparición de enlaces fosfodiéster que se resuelven hipersensibles a la digestión con DNAsa I (Barragán *et al.*, 2005). El hecho de que la región operadora I solape tanto con el sitio de inicio de la transcripción, como con la caja -10 que reconoce la subunidad σ^{70} de la RNAP, es compatible con el papel represor de BzdR sobre el promotor P_N (Barragán *et al.*, 2005).

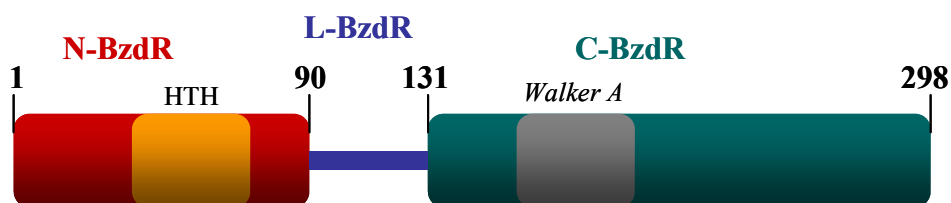


Figura 9. Arquitectura modular de la proteína BzdR. Representación esquemática de los dominios N-terminal (N-BzdR), C-terminal (C-BzdR) y *linker* (L-BzdR) del regulador transcripcional BzdR. Se representan en naranja y gris los motivos HTH y *Walker A*, respectivamente.

El análisis de la estructura primaria del regulador BzdR (298 aa), reveló una arquitectura modular única (Fig. 9), no descrita en otras proteínas reguladoras caracterizadas, lo que convierte a BzdR en el miembro que da nombre a una nueva subfamilia de reguladores transcripcionales (Barragán *et al.*, 2005; Durante-Rodríguez *et al.*, 2010). La proteína BzdR está constituida por dos dominios, el dominio N-BzdR (residuos 1-90) y el dominio C-BzdR (residuos 131-298), ambos dominios conectados por una región *linker* (residuos 91-130) (Fig. 9). El dominio amino-terminal de BzdR es muy similar al de los reguladores transcripcionales de la familia HTH-XRE, que se define por la presencia de un característico motivo hélice-giro-hélice (HTH) de unión a DNA equivalente a los que poseen las proteínas Cro y CI del fago λ (Sauer *et al.*, 1982). El dominio carboxilo-terminal presenta una alta identidad con enzimas que poseen actividad siquimato quinasa, las cuales catalizan la fosforilación de siquimato a 3P-siquimato, utilizando ATP como sustrato en la ruta central de biosíntesis de compuestos aromáticos (Vogels y Van der Drift, 1976). Cabe destacar en el dominio C-BzdR la presencia de un motivo *Walker-A* o *P-loop* de unión de fosfato, así como también una serie de residuos de glicina conservados en un motivo *Walker-B* de unión a purinas (Saraste *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1982).

Estudios recientes han permitido definir la funcionalidad independiente de cada uno de los dominios de BzdR (Durante-Rodríguez, Tesis Doctoral), también se ha demostrado la cooperatividad de unión de BzdR con el promotor P_N y su activación en presencia de la molécula inductora benzoil-CoA. Se ha determinado que el *linker* de BzdR está implicado en la transmisión de información desde el dominio CBzdR, que sufre un cambio conformacional y modifica su interacción con el promotor P_N permitiendo su activación. Además determinadas mutaciones en la región *linker* impiden la conformación dimérica de BzdR y su interacción efectiva con el promotor P_N (Durante-Rodríguez *et al.*, 2010).

Un análisis de las secuencias de proteínas depositadas en las bases de datos revela un aumento constante en el número de miembros de la subfamilia BzdR de reguladores transcripcionales, identificándose diversos ortólogos asociados a *clusters* de degradación de benzoato en más de 30 proteobacterias desnitrificantes de los subgrupos α y β . En la gran mayoría de los casos, estos genes reguladores se encuentran ligados a la ruta aeróbica híbrida Box de degradación de benzoato vía benzoil-CoA (Denef *et al.*, 2006; Gescher *et al.*, 2006; Gescher *et al.*, 2002), por lo que probablemente sus

productos génicos sean los responsables de regular la expresión de dichas rutas aeróbicas. Sin embargo, hasta la fecha solo han identificado tres genes *bzdR* asociados a la ruta anaeróbica de degradación de benzoato, uno de ellos en la cepa *Azoarcus* sp. CIB, otro en la cepa *Aromatoleum aromaticum* EbN1 y otro muy reciente en la cepa *Azoarcus* sp. KH32C.

Además de la proteína BzdR, *Azoarcus* sp. CIB contiene en su genoma un gen *acpR*, cuyo producto muestra una elevada identidad de secuencia con la proteína FNR de *E. coli*, un regulador global que controla la expresión génica en respuesta a limitaciones en la disponibilidad de oxígeno (Unden *et al.*, 2002; Unden *et al.*, 1995) y también es requerida para el control de la expresión del promotor P_N . La proteína AcpR de *Azoarcus* sp. CIB (Tabla 2), es un activador de la clase II estrictamente necesario para la actividad de P_N , teniendo en cuenta que un mutante de *Azoarcus* sp. CIB defectivo para el gen *acpR* es incapaz de crecer anaeróbicamente en benzoato, dicho crecimiento es restaurado mediante la complementación con el gen *fnr* de *E. coli*, lo que de muestra que AcpR es un ortólogo de FNR (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006). AcpR participa en la regulación sobreimpuesta del *cluster bzd* y es responsable del control mediado por la disponibilidad de oxígeno (Fig. 8) (ver apartado 3.2.1).

3.1.3. Otros reguladores del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos

Los únicos estudios de expresión de los genes de la ruta baja del benzoil-CoA han sido llevados a cabo en el gen *gcdH* que codifica la proteína glutaril-CoA deshidrogenasa en *Azoarcus* sp. CIB (Blázquez *et al.*, 2008). La inducción de la expresión de dicho gen se realiza cuando la bacteria se cultiva en presencia de compuestos tales como benzoato o pimelato, cuya degradación genera el intermediario glutaril-CoA. El análisis de la región del genoma que incluye al gen *gcdH*, permitió la identificación de otro gen orientado en sentido divergente y denominado *gcdR*, cuyo producto es un activador transcripcional perteneciente a la familia LysR, encargado de la activación del promotor P_g del gen *gcdH*. Se ha conseguido identificar al glutarato y al glutaconato (2,3-dihidroglutarato) como los inductores específicos de la proteína GcdR (Tabla2) (Blázquez *et al.*, 2008).

En *R. palustris*, la proteína HbaR (Tabla 2) reconoce y une 4-hidroxibenzoato como molécula efectora, y actúa como activador del gen *hbaA*, pero no parece controlar la expresión de los genes responsables de la degradación aeróbica de 4-HBA (Egland y Harwood, 2000). La proteína HbaR pertenece a la superfamilia de reguladores

transcripcionales FNR/Crp, concretamente, al grupo Dnr, en el cual se incluyen proteínas que no poseen los residuos de cisteína imprescindibles en la coordinación de los clusters Fe-S para la detección de oxígeno (Korner *et al.*, 2003). Exceptuado a HbaR, todos los miembros del grupo Dnr son reguladores globales que controlan la expresión de genes implicados en el proceso de desnitrificación (Egland y Harwood, 2000). El hecho de que la expresión del gen *hbaA*, no se active en condiciones aeróbicas sugiere la presencia de un regulador capaz de responder a la anaerobiosis (Egland y Harwood, 2000). Se ha detectado una posible caja de interacción para la proteína FNR de *E. coli* en el promotor que controla la expresión del gen *hbaR*, lo que supondría la activación de la transcripción de *hbaR* en ausencia de oxígeno, mediada por un ortólogo de FNR (Egland y Harwood, 2000). El principal candidato homólogo de la proteína FNR en *R. palustris* es el regulador AadR, ya que además de pertenecer a la superfamilia de reguladores transcripcionales FNR/Crp, es indispensable para la expresión del gen *hbaA* (Dispensa *et al.*, 1992). De esta manera, la expresión del gen *hbaA* dependería de una cascada de regulación en la que la proteína AadR actuaría como un sensor de oxígeno activando la expresión del regulador HbaR, responsable de la expresión del gen *hbaA* en respuesta a 4-HBA (Fig. 7) (Egland y Harwood, 2000). Esta estrategia de control del gen *hbaA* basada en dos reguladores diferentes permitiría conseguir una regulación más específica en condiciones de ausencia de oxígeno, evitando fenómenos de regulación cruzada (Egland y Harwood, 2000).

En la mayoría de bacterias desnitrificantes, la inducción de los genes encargados del metabolismo del tolueno parece estar controlada por los productos de los genes *tdiSR* (Tabla 2), los cuales se encuentran localizados en posición 5' respecto a los genes *bss* y codifican un presunto sistema regulador de dos componentes. En *Azoarcus* sp. T, estos dos genes constituyen un operón y se transcriben divergentemente con respecto al operón *bss* en todas las cepas de *Azoarcus* estudiadas hasta la fecha (Achong *et al.*, 2001). Por el contrario, en *T. aromatica* K172, los genes *tdiSR* se transcriben en el mismo sentido que los genes *bss*. En esta cepa, el producto del gen *tdiR* es capaz de unirse *in vitro* a una sonda de DNA que incluye la región 5' del operón *bss* (Leuthner *et al.*, 1998). En la cepa *T. aromatica* T1, una mutación puntual en el gen *tutBI* (*tdiR*) impedía tanto el crecimiento anaeróbico en tolueno como la expresión del gen *tutE* (*bssD*), lo cual está de acuerdo con el papel de activador de este regulador sobre los promotores catabólicos *bss* (Tabla1) (Coschigano, 2000; Coschigano y Bishop, 2004).

En el sistema regulatorio TdiSR, el componente sensor TdiS, está organizado en dos dominios sensores PAS y un dominio C-terminal histidina quinasa, el cual contiene el residuo His, sitio de la autofosforilación de la proteína (Leuthner *et al.*, 1998). Aunque no se ha demostrado experimentalmente, los dominios PAS de TdiS podrían estar implicados en el reconocimiento de la molécula inductora. Por su parte, el regulador de respuesta TdiR consiste en un dominio N-terminal que contiene el residuo Asp para la fosforilación y un dominio C-terminal con un motivo HTH que permitiría su unión a los correspondientes promotores, y que permite clasificar a esta proteína como un miembro de la familia de reguladores de respuesta FixJ/NarL (Leuthner *et al.*, 1998). Tanto TdiS como TdiR, muestran una significativa identidad con sus correspondientes homólogos de las rutas del catabolismo aeróbico del tolueno (TodST) y del estireno (StySR), por lo que todos ellos, podrían agruparse en una nueva subfamilia de sistemas reguladores de dos componentes relacionados con el control de rutas catabólicas de compuestos aromáticos (Tabla 2)(Busch *et al.*, 2007).

Al contrario de lo que ha sido descrito hasta la fecha en relación con las bacterias desnitrificantes degradadoras de tolueno, no se han hallado ortólogos de *tdiSR* en organismos reductores de hierro como *G. metallireducens*, en donde podría existir un sistema de regulación diferente. De hecho, se ha observado que los clusters *bss* y *bbs* de este organismo, se encuentran flanquados por dos genes que codifican presuntas proteínas cuya secuencia presenta una identidad significativa a la de los reguladores XylR y TetR. Teniendo en cuenta que XylR es una proteína reguladora que detecta tolueno y que controla la expresión σ^{54} -dependiente de los genes *xyl* implicados en el catabolismo aeróbico del tolueno en diferentes cepas de *Pseudomonas* (Tabla 2) (Cases *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 1997), cabe suponer que un sistema regulador σ^{54} -dependiente también controlaría la expresión del cluster de degradación anaeróbica del tolueno en *G. metallireducens* (Carmona *et al.*, 2009). Otros estudios realizados con *G. metallireducens*, han permitido identificar el sistema de dos componentes BamVW como el responsable de la expresión del gen que codifica la benzoato-CoA ligasa que cataliza la activación anaeróbica de benzoato en este microorganismo anaerobio estricto (Juárez *et al.*, 2010).

3.2. Regulación sobreimpuesta

Entre las señales ambientales capaces de afectar la expresión génica de los microorganismos, cabe destacar la influencia del oxígeno y la disponibilidad de fuentes

de carbono. Estas señales son capaces de modificar la expresión de los *clusters* implicados en el catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos a través de reguladores globales que actúan sobre la expresión de los propios reguladores específicos o regulando directamente los promotores catabólicos.

3.2.1. Regulación dependiente de oxígeno

Una de las señales medioambientales de mayor importancia en el control de la expresión de los genes implicados en las rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos es el oxígeno. Por ejemplo, los niveles de expresión de los genes *badDEFG* y *badA* de *R. palustris*, que codifican las cuatro subunidades de la enzima BCR y la benzoato-CoA ligasa, respectivamente, disminuyen bajo condiciones aeróbicas (Egland *et al.*, 1997; Peres y Harwood, 2006). En el caso de *T. aromatica*, se pudo observar una fuerte disminución de la expresión de la enzima BCR cuando las células crecían en un medio aeróbico (Heider *et al.*, 1998). Los genes *bss* que codifican la bencilsuccinato sintasa implicada en la degradación de tolueno en *M. magnetotacticum* TS-6 únicamente se transcriben si las células son cultivadas anaeróticamente en presencia de tolueno (Shinoda *et al.*, 2005). Estudios de proteómica realizados en *A. aromaticum* EbN1, mostraron la inducción de un bajo número de proteínas implicadas en la degradación aeróbica de benzoato cuando las células fueron cultivadas anaeróticamente en presencia de benzoato (Wöhlbrand *et al.*, 2007).

No obstante, también se han descrito algunos casos en los que los genes que codifican determinadas enzimas sensibles a la presencia de oxígeno, se transcriben tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, como por ejemplo en el caso de los genes *bcr* que codifican la BCR de *M. magnetotacticum* TS-6 (Shinoda *et al.*, 2005) o en los genes *bss* que codifican la bencilsuccinato sintasa de *Thauera* sp. DNT-1 (Shinoda *et al.*, 2004). Por lo tanto, todo parece indicar que cada organismo ha desarrollado una estrategia reguladora distinta para la expresión dependiente de oxígeno de los clusters catabólicos de compuestos aromáticos. La expresión de los genes aeróbicos en condiciones anaeróbicas y la de los genes anaeróbicos en condiciones aeróbicas, puede ser el resultado del escape ocasionado por la regulación específica o por un mecanismo adoptado por los microorganismos anaerobios facultativos para mantener un nivel basal enzimático que facilite una respuesta inmediata ante repentinas fluctuaciones en los niveles de oxígeno en un medio determinado (Fuchs, 2008). Ejemplos que justifiquen una regulación independiente de oxígeno son los casos de *T. aromatica* y

Magnetospirillum spp, en donde una única benzoato-CoA ligasa activa tanto el catabolismo aeróbico como el anaeróbico del benzoato (Kawaguchi *et al.*, 2006; Schühle *et al.*, 2003).

Como se ha indicado anteriormente, en *R. palustris*, el promotor *badD* está controlado por los reguladores específicos BadR y BadM y adicionalmente por la proteína AadR en respuesta a condiciones de anaerobiosis (Fig. 6) (Egland y Harwood, 1999). La proteína AadR, cuyo gen codificante se localiza fuera de los *clusters ali-bad-hba*, pertenece a la familia de reguladores transcripcionales FNR/Crp, con lo que conserva aquellas regiones características de esta superfamilia, entre las que cabe destacar cuatro residuos de cisterna altamente conservados que coordinan un grupo 4Fe-4S responsable de la inactivación de la proteína en presencia de oxígeno. Este hecho, junto con la localización en la región promotora del operón *badDEFG* de una secuencia consenso de unión a FNR (TTGAT-N4-ATCAA) centrada en la posición -39.5 respecto del sitio de inicio de la transcripción, apoya la hipótesis de que AadR responde a la anaerobiosis adoptando una conformación activa que le permite unirse al promotor *badD* y activar su transcripción (Egland y Harwood, 1999).

Un estudio mas detallado con respecto a la base molecular del control génico dependiente de oxígeno implicado en el catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos ha sido llevado a cabo en el cluster *bzd* de *Azoarcus* sp. CIB. El análisis del promotor catabólico P_N , reveló la presencia de una secuencia casi idéntica a la secuencia consenso de unión de FNR, centrada en la posición -41.5 con respecto al sitio de inicio de la transcripción del promotor catabólico *bzd* (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la inactivación del gen *fnr*, inhibe la inducción en anaerobiosis del promotor P_N en *E. coli*. También se ha comprobado que la proteína FNR*, una variante mutante constitutiva, la cual contiene una sustitución D154A, que es capaz de dimerizar y de unirse al DNA en presencia de oxígeno (Ziegelhoffer y Kiley, 1995; Kiley y Reznikoff, 1991), es capaz de unirse al promotor P_N y proteger la secuencia consenso de unión de FNR (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006). El gen que codifica la proteína AcpR, un ortólogo del gen *fnr* ha sido identificado en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB, así como también en otras cepas del género *Azoarcus/Aromatoleum*. Una cepa mutante de *Azoarcus* sp. CIB, portadora de una disrupción en el gen *acpR*, fue incapaz de crecer anaeróbicamente cuando las células fueron cultivadas en diferentes compuestos aromáticos. Sin embargo su crecimiento en condiciones aeróbicas utilizando compuestos aromáticos como fuente de carbono no se vio afectado. Además, la

expresión de la fusión traduccional $P_N::lacZ$ fue dependiente de la presencia del gen *acpR*, lo cual indica que la proteína AcpR es esencial para la expresión anaeróbica del cluster *bzd*, y que desarrolla una función de activador transcripcional, requerido para la actividad del promotor P_N cuando las células de *Azoarcus* sp. CIB crecen en benzoato bajo condiciones anóxicas (Fig. 8) (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006).

A pesar de la similitud existente entre FNR, AadR y AcpR, a nivel de sus secuencias de aminoácidos y su mecanismo de acción, todo parece indicar que las tres proteínas no juegan el mismo papel en los correspondientes microorganismos hospedadores. La ausencia de FNR en *E. coli*, se caracteriza por generar efectos pleiotrópicos en la expresión de un cierto número de genes, que da lugar por ejemplo, a la incapacidad de la cepa mutante de crecer utilizando nitrato o fumarato como aceptores finales de electrones (Unden *et al.*, 1995). Sin embargo, la ausencia de las proteínas AadR y AcpR en *R. palustris* y *Azoarcus* sp. CIB, respectivamente, no parece repercutir en el crecimiento anaeróbico en fuentes de carbono no aromáticas. Esta observación, podría indicar que AadR y AcpR son reguladores dependientes de oxígeno especializados en el control de la expresión de los genes responsables del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos, a diferencia de otros miembros de la familia FNR que funcionan como reguladores globales controlando la expresión de diferentes circuitos de regulación (Tabla 1) (Korner *et al.*, 2003; Rabus, 2005).

3.2.2. Regulación dependiente de fuentes de carbono alternativas (represión catabólica)

El control del catabolismo dependiente de la disponibilidad de fuentes de carbono es uno de los mecanismos fundamentales de regulación en bacterias y confieren una ventaja adaptativa al establecer prioridades en el metabolismo del carbono. El termino represión catabólica describe un número de procesos de regulación que garantizan la máxima eficiencia cuando la célula es expuesta a una gran cantidad de fuentes de carbono, de modo que en presencia de fuentes de carbono preferenciales, no se inducen rutas de degradación de fuentes de carbono no preferentes, incluso estando presentes los correspondientes inductores de éstas en el medio (Magasanik, 1990). La represión catabólica por carbono en el catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos, ha sido ampliamente estudiada y algunos de los elementos reguladores implicados han sido caracterizados en diferentes bacterias (Collier *et al.*, 1996; Marqués *et al.*, 2006; Moreno y Rojo, 2008; Ohtsubo *et al.*, 2006; Rojo, 2010; Shingler, 2003). Además, el

control mediado por la represión catabólica también parece ser una característica de los organismos que crecen en condiciones anaeróbicas, sin embargo su estudio ha sido mucho menor en comparación con los que se han llevado a cabo en el catabolismo aeróbico. Hasta la fecha se han descrito un par de ejemplos de represión catabólica sobre rutas de degradación de compuestos aromáticos en *T. aromatica* (Heider *et al.*, 1998) y en *Azoarcus* sp. CIB (López-Barragán *et al.*, 2004). En este último organismo, la represión catabólica sobre la ruta anaeróbica de degradación de benzoato es ejercida por determinados ácidos orgánicos no aromáticos, tales como succinato, malato o acetato (López-Barragán *et al.*, 2004).

Los mecanismos moleculares que controlan la represión catabólica de las rutas aeróbicas de degradación de compuestos aromáticos han sido estudiados en algunos microorganismos. De esta manera, en *E. coli*, el principal responsable en el control de la represión catabólica es el regulador transcripcional CRP, el cual actúa como un activador global en presencia de AMPc (Prieto *et al.*, 2004). Aunque la glucosa es la fuente de carbono preferente en *E. coli* y muchos otros microorganismos, otras bacterias como las pertenecientes al género *Pseudomonas*, metabolizan preferentemente ácidos orgánicos o aminoácidos que azúcares (Collier *et al.*, 1996). No obstante, no todos los ácidos orgánicos causan represión catabólica ni todos ellos muestran el mismo efecto en otros microorganismos (Rojo y Dinamarca., 2004).

La represión de las rutas catabólicas es el resultado de la integración de diferentes señales y no suele producirse exclusivamente por la presencia de un determinado compuesto en el medio. Han sido identificadas una serie de proteínas implicadas en la represión catabólica de diversas rutas aeróbicas de degradación de compuestos aromáticos en bacterias no entéricas, como Crc, un regulador global de *P. putida*, el cual se une a las regiones 5' de los mRNAs que codifican los respectivos reguladores de cada ruta. Por lo tanto, en estas bacterias, la represión catabólica parece estar controlada por una proteína de unión a RNA a un nivel de control post-transcripcional (Morales *et al.*, 2004; Moreno y Rojo, 2008; Rojo, 2010).

Entre otras proteínas descritas en el control de la represión catabólica en rutas de degradación de aromáticos se encuentran PtsN y PtsO (sistema de transporte nitrógeno fosfotransferasa) (Pflüger y de Lorenzo, 2008), ciertas oxidasas terminales tipo *o* (CyoB) capaces de sensar el estado redox de la célula (Morales *et al.*, 2006; Petruschka *et al.*, 2001) y el regulador de respuesta BphQ (Ohtsubo *et al.*, 2006). Todos estos reguladores globales contribuyen a modular la expresión de rutas de acumulación de

carbono y nitrógeno en la célula (Daniels *et al.*, 2010). Sin embargo diferentes cepas de la misma especie pueden usar el mismo factor transcripcional para el control de variadas funciones celulares, lo que refleja que los sistemas reguladores han evolucionado independientemente de las funciones que regulan (Milanesio *et al.*, 2011).

Aunque se han encontrado genes ortólogos en distintas cepas de *Azoarcus*, que codificarían algunas de las proteínas descritas previamente en el control de la represión catabólica en rutas aeróbicas, la implicación de algunas de estas proteínas en el control de la represión catabólica que sufren las rutas anaerobias de degradación de compuestos aromáticos como la ruta *bzd* de *Azoarcus* sp. CIB, necesita ser explorada, y forma parte de estudios futuros que incluyen algunas aproximaciones llevadas a cabo en esta tesis.

3.3. Sistemas reguladores de dos componentes

Uno de los mecanismos moleculares mediante el cual los microorganismos reconocen y dan respuesta a diferentes estímulos medioambientales son los sistemas de regulación de dos componentes (TCS), los cuales pueden intervenir tanto a nivel de la regulación específica, reconociendo un amplio número de efectores, como también a nivel de la regulación sobreimpresa, reconociendo cualquier tipo de señal que pueda dar lugar a la alteración en la expresión génica de los organismos.

Un típico TCS consiste en una proteína histidina quinasa (PHK), generalmente anclada a la membrana y un regulador de respuesta (RR) localizado en el citoplasma (Fig. 10). Cuando una señal o un estímulo, es percibida por la PHK, es propagada al RR a través de residuos conservados para la transferencia de fosfato (Fig. 10), provocando una respuesta, que se da generalmente en forma de alteración de la expresión génica (Buelow y Raivio, 2010).

La señalización en los TCS, es iniciada mediante el reconocimiento de la señal por parte del dominio sensor de la PHK. En la mayoría de los casos, los dominios sensores están localizados en el periplasma o en la superficie extracelular mediante dos dominios transmembrana, aunque algunas PHKs se localizan en la membrana conteniendo dos o más dominios transmembrana y carecen de dominios en el periplasma, otras tantas son completamente citoplasmáticas. Los dominios sensores normalmente carecen de homología con otras PHKs, lo cual es un reflejo de la variedad de señales ambientales detectadas por diferentes PHKs. Aunque cada dominio sensor es único, algunos análisis han sugerido que estos pueden agruparse de acuerdo con los

motivos estructurales implicados en la percepción de las señales (Wolanin *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2006; Szurmant *et al.*, 2007).

Una particularidad común en los dominios sensores son los dominios PAS, un motivo estructural asociado con interacciones proteína-proteína y unión de ligandos en muchas proteínas, incluidas PHK's (Taylor y Zhulin, 1999; Mascher *et al.*, 2006; Krell *et al.*, 2010). Estudios estructurales, han determinado la presencia de motivos PAS en el dominio sensor periplásmico de algunas PHK's implicados en la interacción con diferentes ligandos (Szurmant *et al.*, 2007). Los dominios PAS también se encuentran localizados en regiones citoplasmáticas o tanto en membrana como en citoplasma en algunas PHK's. Además, se pueden encontrar múltiples motivos PAS en una única PHK, lo que sugiere que una PHK puede estar implicada en el reconocimiento de más de una señal (Mascher *et al.*, 2006).

Una vez detectada, la señal es propagada a través de la membrana hasta el dominio C-terminal (dominio *transmitter*). Este dominio enzimático está compuesto por un motivo de dimerización que contiene una histidina conservada (dominio DHp), el sitio de fosforilación y un dominio catalítico (DC) de unión de ATP/Mg²⁺ (Galperin *et al.*, 2001; Gao y Stock, 2009). Dos monómeros de la PHK dimerizan y cada uno de ellos es fosforilado en el residuo histidina altamente conservado usando ATP y Mg²⁺ (Galperin *et al.*, 2001; Gao y Stock, 2009). Posteriormente, el fosfato es transferido a un residuo aspartato, el cual se encuentra en el dominio *receiver* del RR (Fig. 10) (Bourret, 2010; Foussard *et al.*, 2001). La reacción de transfosforilación es catalizada por el dominio N-terminal (dominio *receiver*), el cual, a la vez controla los cambios conformacionales que repercuten en la actividad del dominio C-terminal del RR que da respuesta al estímulo, generalmente mediante interacción con el DNA (Galperin, 2010; Gao y Stock, 2009; West y Stock, 2001). La vida media de la fosforilación en los RR es limitada, ya sea por su actividad autofosfatasa, o por la acción de las PHK's, las cuales pueden tener la propiedad de desfosforilar los RR, en adición a su actividad autoquinasa (Galperin, 2010; Gao y Stock, 2010). Las señales reconocidas por las PHK's determinan su actividad enzimática, finalmente afectando el nivel de fosforilación del RR y su respuesta generada.

Algunas variaciones en los dominios *transmitter* de las PHK's y en los dominios *receiver* de los RR pueden ser combinadas en cascadas de fosforilación más complejas, en las cuales, el fosfato es transferido siguiendo una ruta His-Asp-His-Asp (Foussard *et al.*, 2001; Galperin *et al.*, 2001; Krell *et al.*, 2010; West y Stock, 2001). En este tipo de

señalización, el fosfato es transferido inicialmente desde la His de la PHK hasta un dominio *receiver* que es desacoplado desde un dominio de respuesta al estímulo. En muchos casos, este dominio es fusionado a la HK y esta arquitectura es conocida como quinasa híbrida.

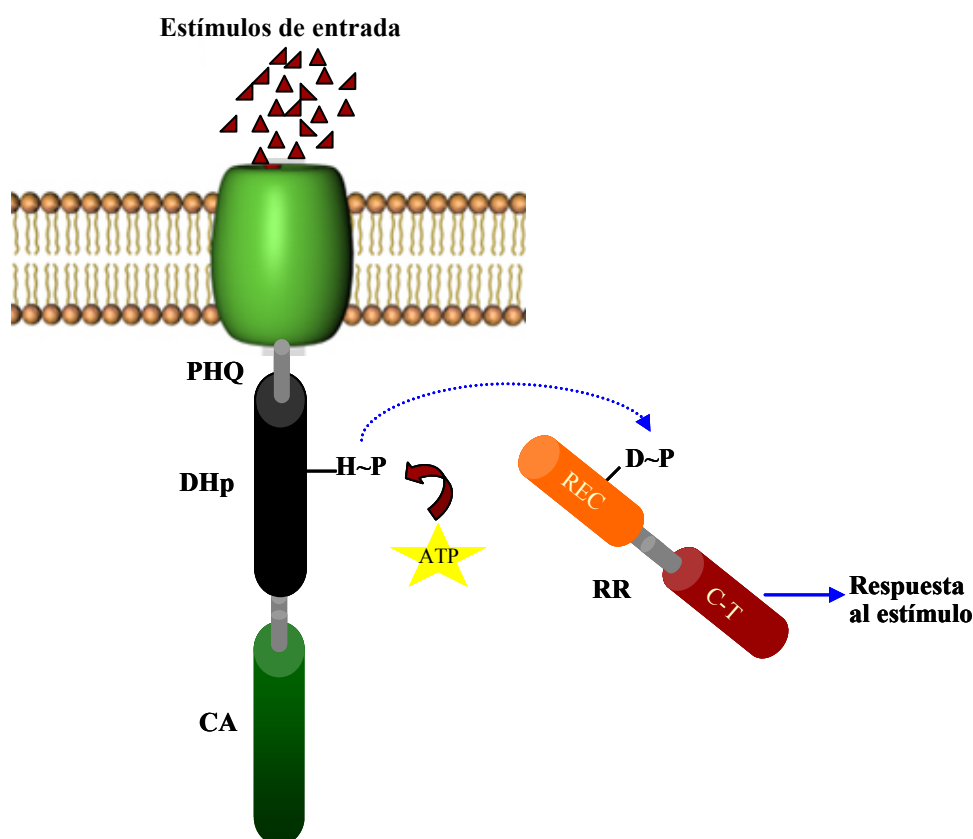


Figura 10. Representación esquemática de los sistemas de dos componentes. Las diferentes señales son reconocidas por las proteínas histidina quinasa (PHK's), estimulando su actividad autoquinasa. La región citoplasmática de la mayoría de PHK's, está constituida por un dominio DHp (cilindro negro), que contiene el sitio de fosforilación, y un dominio catalítico (CA) (cilindro verde) de unión de ATP y Mg^{2+} . En presencia de ATP (amarillo), la PHK se fosforila en el residuo histidina (H), posteriormente, el fosfato es transferido al residuo Aspártico (D) conservado en el dominio *receiver* (REC) del regulador de respuesta (RR). Finalmente se genera una respuesta al estímulo a través del dominio C-terminal (C-T) del RR.

Una vez fosforilado el dominio *receiver*, el fosfato es transferido a un dominio fosfotransferasa (dominio HPT), muy similar al dominio DhP. Finalmente el dominio HPT fosforilado, actúa como un donador de fosfato al correspondiente RR (Foussard *et al.*, 2001; Galperin *et al.*, 2001; Gao y Stock, 2009; , 2010; West y Stock, 2001). Esta última cascada de fosforilación ha sido propuesta de generar vías adicionales de entrada de las diferentes señales medioambientales reconocidas por las PHK's y se han descrito algunos reguladores auxiliares que afectan dicha cascada a diferentes niveles, alterando

la señalización y los niveles de fosforilación tanto de las PHK's como de los RR (Buelow y Raivio, 2010). Recientemente, también se han identificado reguladores auxiliares que afectan la actividad de TCS simples. Entre éstos, se ha demostrado que muchos afectan la actividad de los RR alterando su estado de fosforilación, interacción con el DNA, reclutamiento de la RNA polimerasa o mediante interacción proteína-proteína que conduce a su secuestro (Mitrophanov y Groisman, 2008). Mediante experimentos genéticos y bioquímicos, se ha comprobado que otras proteínas auxiliares interactúan con PHK's influyendo tanto en la percepción de las señales como en su transducción (Buelow y Raivio, 2010).

Dado que se conocen muy pocos aspectos relacionados con la regulación en el catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos, y teniendo en cuenta todos precedentes anteriormente citados, se planteó en esta tesis el estudio de los factores moleculares que intervienen tanto en la regulación específica como en la regulación sobreimpuesta, utilizando el modelo de partida de la regulación de los genes *bzd* (Fig 8) que codifican las enzimas necesarias para la degradación anaeróbica del benzoato en la β -proteobacteria *Azoarcus* sp. CIB, cuyo genoma ha sido secuenciado y ensamblado recientemente en nuestro laboratorio.

II. OBJETIVOS

Como se ha indicado en la Introducción, la β -Proteobacteria *Azoarcus* sp. CIB se ha utilizado como modelo para el estudio de la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos. Concretamente, se conocen muchos aspectos relacionados con la regulación específica y el control por oxígeno de los genes *bzd* implicados en la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB. Sin embargo, al inicio de esta tesis se desconocían los mecanismos moleculares que controlan la represión catabólica de los genes *bzd* cuando la bacteria se cultiva en benzoato y otras fuentes de carbono preferentes tales como ciertos ácidos orgánicos. Por otro lado, aunque se conocía que *Azoarcus* sp. CIB es capaz de degradar benzoato también en presencia de oxígeno, se desconocían los genes implicados en el catabolismo aeróbico del benzoato a través de la ampliamente extendida ruta híbrida *box*, además su regulación no se había estudiado hasta la fecha en ningún microorganismo. *Azoarcus* sp. CIB representa pues un sistema modelo para el estudio de las posibles relaciones existentes entre los mecanismos de regulación que controlan la degradación de un compuesto aromático como el benzoato a través de dos rutas catabólicas, una aeróbica y otra anaeróbica, con estrategias bioquímicas claramente diferentes pero que comparten el primer intermediario metabólico (benzoil-CoA).

En base a estos precedentes, en esta tesis se propuso profundizar en el estudio de los mecanismos de regulación transcripcional implicados en el control de la degradación de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB. Los objetivos propuestos se enumeran a continuación:

- **Objetivo 1:** Identificación del *cluster* génico *box*, responsable de la degradación aeróbica del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB, y caracterización de su regulación transcripcional.
- **Objetivo 2.** Estudio del papel del oxígeno sobre los elementos reguladores del *cluster box*, y la relación de éstos con el sistema regulador de la ruta *bzd* de degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB.
- **Objetivo 3.** Identificación del sistema regulador de dos componentes AccSR implicado en la represión catabólica de los genes *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB
- **Objetivo 4.** Caracterización del mecanismo de acción del regulador de respuesta AccR, y la histidina-quinasa AccS.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas y plásmidos

La Tabla 3 muestra las diferentes cepas de *E.coli* y *Azoarcus* sp. CIB empleadas en este trabajo, junto con sus genotipos y características más relevantes.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 4 donde se muestra el nombre de cada plásmido y sus características más relevantes.

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas.

| Cepa | Genotipo/fenotipo | Referencia |
|--------------------------------|---|---------------------------------------|
| <i>E.coli</i> | | |
| CC118 | $\Delta(\text{ara-leu}) \text{ araD } \Delta\text{lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE (Sp}^f) \text{ rpoB (Rf}^f) \text{ argE (Am) recA1}$ | (Herrero <i>et al.</i> , 1990) |
| DH10B | $F', \text{ mcrA } \Delta(\text{mrr hsdRMS-mcrBC}) \phi 80\text{dlac}\Delta\text{M15 } \Delta\text{lacX74 deoR recA1 araD139 } \Delta(\text{ara-leu})7697 \text{ galU galK rpsL (Sm}^f) \text{ endA1 nupG}$ | Life Technologies |
| M15 | Cepa de expresión de vectores pQE | Qiagen |
| MC4100 | $\text{araD139 } \Delta(\text{argF-lac})\text{U169 rpsL150 (Sm}^f) \text{ relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR}$ | (Casadaban, 1976) |
| AFMCP _N | Km ^r Rf ^r , MC4100 mutante espontáneo rifampicina resistente, portadora en el cromosoma de la fusión traduccional $P_N::\text{lacZ}$. | (Barragán <i>et al.</i> , 2005) |
| Sm10 λpir | Km ^r <i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu</i> , λpir lisogénico | (Miller y Mekalanos, 1988) |
| S17-1 λpir | Tp ^f Sm ^r <i>recA thi hsdRM^r RP4::2-Tc::Mu::Km</i> , Tn7, λpir lisogénico | (de Lorenzo y Timmis, 1994) |
| XLI-Bue MRA (P2) | $\Delta(\text{mcrA})183, \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173, \text{ endA1, gyrA96, supE44, relA1, thi-1, lac}$, P2 lisogénico | Stratagene |
| <i>Azoarcus</i> sp. CIB | | |
| CIB | Cepa silvestre degradadora de compuestos aromáticos | (López-Barragán <i>et al.</i> , 2004) |
| CIBdbzdR | Km ^r , Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>bzdR</i> | Este trabajo |
| CIBdboxR | Sm ^r , Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>boxR</i> | Este trabajo |
| CIBdboxRdbzdR | Km ^r , Sm ^r , CepaCIB doble mutante por inserción en los genes <i>bzdR</i> y <i>boxR</i> . | Este trabajo |
| CIBdbclA | Km ^r , Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>bclA</i> | Este trabajo |
| CIB ΔaccR | Cepa CIB mutante por delección en el gen <i>accR</i> | Este trabajo |
| CIB ΔaccS | Cepa CIB mutante por delección en el gen <i>accS</i> | Este trabajo |

Tabla 4. Plásmidos empleados en este trabajo

| Plásmido | Descripción | Referencia |
|--|---|---------------------------------------|
| pQE32 | Ap ^r , <i>oriColE1</i> , promotor T5, operador <i>lac</i> operator, terminadores λ <i>t</i> / <i>E. coli rrnB T1</i> , N-terminal His ₆ | Qiagen |
| pQE32-His ₆ BzdR | Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>bzdR</i> | (Barragán <i>et al.</i> , 2005) |
| pQE32-His ₆ BoxR | Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>boxR</i> | Este trabajo |
| pQE32-His ₆ AccR | Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>accR</i> | Este trabajo |
| pQE32-His ₆ CAccR | Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>CaccR</i> | Este trabajo |
| pQE32-His ₆ AccRD60E | Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>accRD60E</i> | Este trabajo |
| pQE32-His ₆ AccS ₂₈₈₋₉₀₃ | Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>accS</i> ₂₈₈₋₉₀₃ | Este trabajo |
| pQE32-His ₆ AccS ₆₅₃₋₉₀₃ | Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>accS</i> ₆₅₃₋₉₀₃ | Este trabajo |
| pK18mob | Km ^r , <i>oriColE1</i> , Mob ⁺ , <i>lacZα</i> , vector suicida para la construcción de mutantes por inserción mediante recombinación homóloga | (Schafer <i>et al.</i> , 1994) |
| pK18mob bzdR | Km ^r , derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>SmaI</i> de 499 pb (fragmento interno del gen <i>bzdR</i>) | Este trabajo |
| pK18mob bclA | Km ^r , derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>EcoRI</i> de 577 pb (fragmento interno del gen <i>bclA</i>) | Este trabajo |
| pK18mob sacB | Derivado de pK18mob que contiene el gen <i>sacB</i> . Utilizado para la construcción de mutantes por delección mediante doble recombinación homóloga. | (Schafer <i>et al.</i> , 1994) |
| pK18mob sacBaccS | Derivado de pK18mob sacB que contiene un fragmento <i>BamHI/SpeI</i> de 1653 pb de dos regiones adyacentes a la histidina catalítica de <i>AccS</i> | Este trabajo |
| pECOR7 | Ap ^r , derivado de pUC19 <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i> que contiene un fragmento <i>EcoRI</i> de 7,1 kb que contiene los genes <i>bzdRNO</i> | (López-Barragán <i>et al.</i> , 2004) |
| pREP4 | Km ^r , <i>ori</i> p15A; plásmido que expresa el represor <i>lacI</i> | Qiagen |
| pSJ3 | Ap ^r , <i>oriColE1</i> , <i>lacZ</i> , vector para la búsqueda de promotores con el gen testigo <i>lacZ</i> flanqueado con dianas de restricción <i>NotI</i> | (Ferrández <i>et al.</i> , 1998) |
| pSJ3P _D | Ap ^r , derivado de pSJ3 que contiene una fusión traduccional del promotor <i>P_D</i> con el gen <i>lacZ</i> | Este trabajo |
| pSJ3P _X | Ap ^r , derivado de pSJ3 que contiene una fusión traduccional del promotor <i>P_D</i> con el gen <i>lacZ</i> | Este trabajo |
| pIZ1016 | Gm ^r , derivado del vector de clonación y expresión de amplio espectro de hospedador pBBR1MCS-5 con el promotor <i>P_{tac}</i> y el gen <i>lacI^q</i> de pMM40 | (Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003) |
| pIZAccSR | Gm ^r , derivado de pIZ1016 que contiene los genes <i>accSR</i> bajo el control de promotor <i>P_{tac}</i> | Este trabajo |
| pIZAccRD60E | Gm ^r , derivado de pIZ1016 que contiene un fragmento <i>EcoRI/BamHI</i> | Este trabajo |

| Plásmido | Descripción | Referencia |
|------------------------|---|--|
| pCK01 | Cm ^r , <i>ori</i> pSC101, vector de clonación de bajo número de copias con <i>polylinker</i> flanqueado por dianas <i>NotI</i> | (Fernández <i>et al.</i> , 1995) |
| pCKBzdR | Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene el gen <i>bzdR</i> bajo el control del promotor <i>Plac</i> | (Barragán <i>et al.</i> , 2005) |
| pCK01BoxR | Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/PstI</i> procedente de pQE32-His ₆ BoxR | Este trabajo |
| pJCD01 | Ap ^r , <i>ori</i> ColE1; <i>polylinker</i> de pUC19 flanqueado por los terminadores <i>rpoC</i> y <i>rrnBT1T2</i> | (Marschall <i>et al.</i> , 1998) |
| pJCDP _N | Ap ^r , derivado de pJCD01 que contiene un fragmento <i>EcoRI</i> de 585 pb que incluye al promotor <i>P_N</i> | (Durante-Rodríguez <i>et al.</i> , 2006) |
| pKNG101 | Sm ^r , <i>ori</i> R6K, Mob ⁺ , <i>sacB</i> . Vector suicida para la construcción de mutantes por inserción y por delección mediante recombinación homóloga. | (Kaniga <i>et al.</i> , 1991) |
| pKNG101 <i>boxR</i> | Sm ^r , derivado de pKNG101 que contiene un fragmento <i>BamHI/SpeI</i> de 525 pb (fragmento interno del gen <i>boxR</i>) | Este trabajo |
| pKNG101 <i>accR</i> | Derivado de pKNG101 que contiene un fragmento <i>BamHI/SpeI</i> de 1404 pb de dos regiones flanqueantes al gen <i>accR</i> | Este trabajo |
| pBBR1MC-5 | Gm ^r , <i>ori</i> pBBR1MCS, Mob ⁺ , <i>lacZα</i> , vector de clonación y expresión de amplio espectro de huéspedes. | (Kovach <i>et al.</i> , 1995) |
| pBBR1MC-5- <i>AccR</i> | Derivado de pBBR1MC-5 que contiene un fragmento <i>BamHI/XbaI</i> que incluye el gen <i>accR</i> bajo el control del promotor <i>P_{tac}</i> | Este trabajo |

2. Medios y condiciones de cultivo

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0.2 µm de diámetro. Para los crecimientos de *E. coli* y *Azoarcus* sp. CIB se utilizaron diferentes medios de cultivo cuya composición aparece reseñada a continuación.

2.1. Medios de cultivo empleados para *Escherichia coli*

El medio rico empleado fue *Lysogeny Broth* (LB) (Sambrook y Rusell, 2001). Los cultivos de *E. coli* en medio sólido se realizaron con medio LB complementado con

agar al 1.5% (masa/volumen). En los casos en los que se consideró necesario, se añadió 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) a una concentración de 0.08 mM, así como isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.5 mM.

El medio mínimo empleado para *E. coli* fue M63 (Miller, 1972), al que se añadió agar al 1.5% (masa/volumen) para los crecimientos en medio sólido. El medio mínimo se complementó con glicerol (30 mM) como fuente de carbono, así como con las vitaminas y aminoácidos necesarios para cada cepa a las concentraciones recomendadas por Gerhardt *et al.* (1994). Para los cultivos en condiciones anóxicas se añadió KNO₃ 10 mM como aceptor final de electrones. Cuando fueron requeridos, los antibióticos se utilizaron a las concentraciones que se indican en el apartado 2.3.

2.2. Medios de cultivo empleados para *Azoarcus* sp. CIB

El medio mínimo empleado en este trabajo para cultivar las cepas de *Azoarcus* sp. CIB está basado en el medio basal MA (pH 7.5), cuya composición se detalla a continuación:

- KH₂PO₄ 0.33 g
- Na₂HPO₄ 1.2 g
- NH₄Cl 0.11 g
- MgSO₄·7H₂O 0.1 g
- CaCl₂ 0.04 g
- H₂O destilada (hasta 1 l)

Este medio basal fue suplementado con una solución de elementos traza (pH 6.5), cuya composición (1000x) se detalla a continuación:

- Ácido nitrilotriacético (NTA) 1.5 g
- MgSO₄·7H₂O 3.0 g
- MnSO₄·2H₂O 0.5 g
- NaCl 1.0 g
- FeSO₄·7H₂O 0.1 g
- CoSO₄·7H₂O 0.18 g
- NaSeO₃·5H₂O 0.3 g
- ZnSO₄·7H₂O 0.18g

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g
- $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g
- H_3BO_3 0.01 g
- $\text{Na}_2\text{MoO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g
- $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g
- H_2O destilada (hasta 1 l)

También se suplementó el medio MA con una solución de vitaminas cuya composición (1000x) es la siguiente:

- Biotina 20 mg
- Piridoxina-HCl 10 mg
- Riboflavina 50 mg
- D-pantotenato cálcico 50 mg
- Ácido *p*-aminobenzoico 50 mg
- Ácido fólico 20 mg
- Tiamina-HCl $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mg
- Ácido nicotínico 50 mg
- Vitamina B_{12} 50 mg
- H_2O destilada (hasta 1 l)

Para el crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB se añadió KNO_3 10 mM, como aceptor final de electrones, al medio MC (medio basal complementado con vitaminas y elementos traza). Además, para asegurar el ambiente reductor, se añadió al medio MC una solución de sulfuro ferroso a una concentración final de 0.044 mg/ml.

2.3. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en soluciones 1000 veces concentradas en agua, excepto el cloranfenicol y la rifampicina que se disolvieron en etanol 100% y en DMSO 100%, respectivamente. Estas soluciones se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20 °C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales que se indican:

- Ampicilina (Ap) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Cloranfenicol (Cm) 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Kanamicina (Km) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Gentamicina (Gm) 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

2.4. Obtención de condiciones anaeróbicas en los medios de cultivo

Para obtener condiciones de anaerobiosis, el medio de cultivo así como las soluciones de elementos traza, nitrato potásico, sulfuro ferroso y todos los compuestos que fueron utilizados como fuente de carbono, se dispensaron en frascos de vidrio, los cuales se taparon con tapones de goma y se sellaron con arandelas de aluminio. A través del tapón de goma se inyectó una aguja conectada a un depósito de nitrógeno (Air Liquide), permitiendo pasar un flujo de este gas al medio líquido durante varios minutos con el objeto de eliminar el oxígeno. Finalmente, todos los frascos fueron autoclavados. Para obtener una solución anaeróbica y estéril de vitaminas (las cuales son sensibles al calor) se realizó la misma operación descrita anteriormente pero con frascos de vidrio vacíos en los que, después de ser esterilizados por autoclave, se inyectó la solución de vitaminas mediante una jeringa conectada a un filtro estéril Millipore (de 0.2 μm de diámetro de poro). Una vez preparadas estas soluciones, fueron añadidas al medio basal MA para obtener así el medio MC complementado con las correspondientes fuentes de carbono. Tanto la filtración de las soluciones de vitaminas como la inoculación de los medios de cultivo con las distintas cepas bacterianas, se realizaron en una cámara de anaerobiosis (Forma Scientific).

2.5. Condiciones de cultivo

Para los cultivos aeróbicos las cepas de *E. coli* y *Azoarcus* sp. CIB se cultivaron a 37 y 30 °C, respectivamente, con una agitación de 250 rpm. Ambas estirpes bacterianas fueron incubadas a 30 °C sin agitación para su crecimiento anaeróbico. Cuando se utilizaron compuestos aromáticos como fuente de carbono, éstos fueron añadidos al medio MC a una concentración de 3 mM, si no se especifica otra concentración. Las fuentes de carbono no aromáticas, como por ejemplo sales de ácidos orgánicos (succinato, glutarato, etc.) y casaminoácidos, fueron añadidos a los medios de cultivo en una relación 0.4% (m/v) salvo que se indique lo contrario.

El crecimiento de los cultivos fue monitorizado midiendo la absorbancia a 600 nm (A_{600}) empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-260. La morfología celular se analizó con un microscopio de contraste de fase Nikon OPTIPHOT-2. La desnitrificación en cultivos anaeróbicos fue monitorizada midiendo los niveles de NO_3^- y NO_2^- con el Test Nitrates (Merck). El consumo de benzoato en el medio de cultivo fue monitorizado espectrofotométricamente a 273 nm tras la acidificación del medio con HCl.

2.6. Conservación de las cepas bacterianas

Durante cortos períodos de tiempo (inferiores a un mes) *E. coli* se conservó a 4 °C en placas de medio LB o de medio mínimo. Los cultivos anaeróbicos de *Azoarcus* sp. CIB se conservaron adecuadamente durante un periodo aproximado de un mes a 4 °C en viales de vidrio. Para su conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 15% (v/v) y se mantuvieron a -80 °C.

3. Técnicas de manipulación de DNA y RNA

La manipulación del DNA así como la mayor parte de las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo fueron aplicadas esencialmente tal y como describen Sambrook y Rusell (2001). Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs y Takara. La DNA ligasa T4 y la RNA polimerasa utilizada en los ensayos de transcripción *in vitro* (*E. coli* RNA Polymerase Holoenzyme 1 U/ μ l) fueron suministradas por USB. La DNA polimerasa I y la *Pfu* polimerasa fueron suministradas por Biotools B. M. Labs. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de las diferentes casas comerciales.

3.1. Purificación de DNA

La purificación de DNA plasmídico se realizó mediante el uso de *High Pure Plasmid Purification Kit* (Roche). Para obtener mayores volúmenes de preparaciones plasmídicas, se utilizó el *Plasmid Midi Kit* (Qiagen). El DNA cromosómico se extrajo empleando el procedimiento descrito por Wilson (1997).

3.2. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR)

La amplificación del DNA se realizó en un equipo *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) y las enzimas que se emplearon fueron la DNA polimerasa I y la polimerasa *Pfu*, ambas proporcionadas por Biotools B. M. Labs. Las mezclas de reacción contenían MgCl₂ 1.5 mM, oligonucleótidos 0.5 μ M y dNTPs 0.25 mM. Los productos amplificados se purificaron con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Los distintos oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se indican en la Tabla 5. Los oligonucleótidos fueron proporcionados por Sigma-Genosys. En la tabla 5 se detalla la secuencia y ubicación de cada uno de ellos, así como las dianas de restricción correspondientes en cada caso.

TABLA 5. Oligonucleótidos utilizados. Las regiones subrayadas pertenecen a la diana de restricción que se indica al final de la secuencia

| Nombre | Secuencia (5'-3')/Diana de restricción | Localización relativa y utilización |
|--------------|--|--|
| 5' Hisbox | CGGGATCCTTAGCCTCGAACCCACCACCG (<i>Bam</i> HI) | Extremo 5' del gen <i>boxR</i> (903pb) para generar el plásmido pQE32-His ₆ BoxR |
| 3' Hisbox | AACTGCAGTCAGCCCAGTACGAGCTGGCG (<i>Pst</i> I) | Extremo 3' del gen <i>boxR</i> (903pb) para generar el plásmido pQE32-His ₆ BoxR |
| 5' pboxD | GGGGTACCAGCGGCATCAGGAAGTGCTG (<i>Kpn</i> I) | Extremo 5' de un fragmento de 775 pb que se corresponde con la región intergénica <i>boxDR</i> , para generar el plásmido pSJ3P _D |
| 3'pboxD | GCTCTAGAGGGAGGCTCATCTGGGTTCTTTCTTG (<i>Xba</i> I) | Extremo 3' de un fragmento de 775 pb que se corresponde con la región intergénica <i>boxDR</i> , para generar el plásmido pSJ3P _D |
| 5'pboxR | GCTCTAGAGGCAGCGGCATCAGGAAGTGCTG (<i>Xba</i> I) | Extremo 5' de un fragmento de 775 pb que se corresponde con la región intergénica <i>boxDR</i> , para generar el plásmido pSJ3P _x |
| 3'pboxR | CCGGTACCGAGGCTCATCTGGGTTCTTTCTTG (<i>Kpn</i> I) | Extremo 3' de un fragmento de 775 pb que se corresponde con la región intergénica <i>boxDR</i> , para generar el plásmido pSJ3P _x |
| FPAdh 5' | CGGAATTCGCACCTTCGATCCATTGCC (<i>Eco</i> RI) | Extremo 5' de un fragmento de 234 pb de la región intergénica <i>boxDR</i> para ensayos de retardo en gel y footprinting |
| FPAdh 3' bis | AAAAGTACTCGGTTGCTGTGATGCTGTGTC (<i>Sca</i> I) | Extremo 3' de un fragmento de 234 pb de la región intergénica <i>boxDR</i> para ensayos de retardo en gel y footprinting |
| 5'FPAdhRev | AAAAGTACTAATACACGCGCAAATTCCTC (<i>Sca</i> I) | Extremo 5' de un fragmento de 266 pb de la región intergénica <i>boxDR</i> para ensayos de retardo en gel y footprinting |
| 3'FPAdhRev | CGGAATTCGCTGCGGTTGCGGTGGTG (<i>Eco</i> RI) | Extremo 3' de un fragmento de 266 pb de la región intergénica <i>boxDR</i> para ensayos de retardo en gel y footprinting |
| 5'boxRMut | CGGGATCCGCAACGTGCCATCGTCTGC (<i>Bam</i> HI) | Extremo 5' de un fragmento interno de 525 pb del gen <i>boxR</i> para generar el plásmido pKNG101 <i>boxR</i> |
| 3'boxRMut | GGACTAGIGCCATGTGTTCTTCCGGCTGC (<i>Spe</i> I) | Extremo 3' de un fragmento interno de 525 pb del gen <i>boxR</i> para generar el plásmido pKNG101 <i>boxR</i> |
| 5'boxRq | ACTTCGGCCACGAGGAAGCTG | Extremo 5' de un fragmento interno de 152 pb del gen <i>boxR</i> para ensayos de RT-PCR |
| 3'boxRq | GATGCCGGTTTCTTCTCGATC | Extremo 3' de un fragmento interno de 152 pb del gen <i>boxR</i> para ensayos de RT-PCR |
| 5' bzdRq | CGATGAGAACTCATCACGGCTC | Extremo 5' de un fragmento interno de 152 pb del gen <i>bzdR</i> para ensayos de RT-PCR |
| 3'bzdRq | CAGCATCTTGCGGTCATTC | Extremo 3' de un fragmento interno de 124 pb del gen <i>bzdR</i> para ensayos de RT-PCR |
| 5'pboxdQ | CAACTCCAGTGCCTGTGCG | Extremo 5' de un fragmento de 153 pb del promotor P _D para ensayos de RT-PCR |
| 3'pboxdQ | GAGAGGAGACAATCAGGTGAAGC | Extremo 3' de un fragmento de 153 pb del promotor P _D para ensayos de RT-PCR |
| 5'RTpN1 | GCAACACATCAGAGGAGATAG | Extremo 5' de un fragmento de 141 pb del promotor P _N para ensayos de RT-PCR |

| Nombre | Secuencia (5'-3')/Diana de restricción | Localización relativa y utilización |
|-------------------|--|---|
| 3'RTpN2 | GTGTAGGTACACATCGTTGC | Extremo 3' de un fragmento de 141 pb del promotor P_N para ensayos de RT-PCR |
| Lac 57 | CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG | Localizado 57 pb en posición 3' al codón de inicio del gen <i>lacZ</i> , utilizado para ensayos de <i>primer extensión</i> de P_x |
| 5'boxDext | TGCGACGTCGATACCGTGGGA | Localizado 100 pb en posición 3' al codón de inicio del gen <i>boxD</i> , utilizado para ensayos de <i>primer extensión</i> de P_D |
| F pKNG101 | GTCGCCGCCCGTAACCTGTGC | Utilizado para analizar por PCR interrupciones insercionales con el plásmido pKNG101 |
| R pKNG101 | CGGGCCTCTTGCGGGATAACTGC | Utilizado para analizar por PCR interrupciones insercionales con el plásmido pKNG101 |
| 5'POLIIIHK | CGAAACGTCGGATGCACGC | Extremo 5' de un fragmento interno de 166 pb del gen <i>dnaE</i> (codifica la subunidad α de la DNA polimerasa III), utilizado como control interno en ensayos de RT-PCR |
| 3'POLIIIHK | GCGCAGGCCTAGGAAGTCGAAC | Extremo 3' de un fragmento interno de 166 pb del gen <i>dnaE</i> (codifica la subunidad α de la DNA polimerasa III), utilizado como control interno en ensayos de RT-PCR |
| 5'LigO21055 | GCGAATTCGAAATGCTGCTGCACATCTTCTGTGC (<i>EcoRI</i>) | Extremo 5' de un fragmento interno de 578 pb del gen <i>bzdA</i> para generar el plásmido pK18 <i>mobblA</i> . |
| 3'LigO221633 | GCCCCGGGTTGAAGCGCTGGATCTTGCC (<i>SmaI</i>) | Extremo 3' de un fragmento interno de 578 pb del gen <i>bzdA</i> para generar el plásmido pK18 <i>mobblA</i> . |
| 5'HisaccR | CGGGATCCTTACCGCACCGTCCGCCGTA (<i>BamHI</i>) | Extremo 5' del gen <i>accR</i> , para generar los plásmidos pQE32-His ₆ AccR y pQE32-His ₆ AccRD60E |
| 3'HisaccR | AACTGCAGTCAGCACGTTCTGCACGAGTTTCG (<i>PstI</i>) | Extremo 3' del gen <i>accR</i> , para generar los plásmidos pQE32-His ₆ AccR, pQE32-His ₆ CAccR y His ₆ AccRD60E |
| 5'6HisCAccR | CGGGATCCTTCCGGCAGCTCGAGGCGGAGA (<i>BamHI</i>) | Extremo 5' del dominio C-AccR para generar el plásmido pQE32-His ₆ CAccR |
| 5'AccRD60E | CTCGTGCTCGAAGTGCATG | Extremo 5' de una región intergénica de <i>accR</i> para la obtención del mutante AccRD60E |
| 3'AccRD60E | CATGCGCACTTCGAGCACGAG | Extremo 3' de una región intergénica de <i>accR</i> para la obtención del mutante AccRD60E |
| 5'6HisC-AccS | CGGGATCCTTCCGGAGGTCTCGGCCAGCA (<i>BamHI</i>) | Extremo 5' de una región intergénica de <i>accS</i> que coincide con el extremo 5' del dominio autoquinsasa de la proteína AccS para generar el plásmido pQE32-His ₆ AccS ₆₅₃₋₉₀₃ |
| 3'6HisC-AccS | CCCAAGCTTTCAGGTACGGCGGACGGTGCG (<i>HindIII</i>) | Extremo 3' del gen <i>accS</i> para generar los plásmidos pQE32His ₆ AccS ₆₅₃₋₉₀₃ y pQE32-His ₆ AccS ₂₈₈₋₉₀₃ |
| 5'6HisAccSSPAS1+2 | CGGGATCCTTAAGGAGCGGACCGGCTTTTC (<i>BamHI</i>) | Extremo 5' de una región intergénica de <i>accS</i> que coincide con el extremo 5' del dominio sensora de la proteína AccS para generar el plásmido pQE32-His ₆ AccS ₂₈₈₋₉₀₃ |
| 5'AccSR | ACGCGTCGACTGACCTAAGGAGGTAATAATGTCCGACTCTGCCGAATCCG (<i>SalI</i>) | Extremo 5' del gen <i>accS</i> para generar el plásmido pIZAccSR |

| Nombre | Secuencia (5'-3')/Diana de restricción | Localización relativa y utilización |
|-----------------------------|---|---|
| 3'AccSR | GGACTAGTTCAGCGGCCGCCACCTCC (<i>SpeI</i>) | Extremo 3' del gen <i>accR</i> para generar el plásmido pIZAccSR |
| 5'AccRext | CGGGATCCTAGTTAACTAGGAAGGGGTACCATCTTCTC (<i>BamHI</i>) | Extremo 5' de un fragmento externo al gen <i>accR</i> para generar el plásmido pBBR1MC-5-AccR |
| 3'AccRext | GCTCTAGACAGGCCGGCACATCCGTCAGCG (<i>XbaI</i>) | Extremo 3' de un fragmento externo al gen <i>accR</i> para generar el plásmido pBBR1MC-5-AccR |
| 5'AccRmut (<i>BamHI</i>) | CGGGATCCGCGGAGGTCTCGCGCCAGC (<i>BamHI</i>) | Extremo 5' de un fragmento externo localizado en posición 5' al gen <i>accR</i> para generar un fragmento de 762 pb incluido en el plásmido pKNG101 <i>accR</i> |
| 3'AccRmut (<i>XbaI</i>) | GCTCTAGACATTGTTACAGGTACGGCGGACG (<i>XbaI</i>) | Extremo 3' de un fragmento interno localizado en posición 5' del gen <i>accR</i> para generar un fragmento de 762 pb incluido en el plásmido pKNG101 <i>accR</i> |
| 5'AccRmut (<i>XbaI</i>) | GCTCTAGAGCGGCCGCTGACGGATG (<i>XbaI</i>) | Extremo 5' de un fragmento interno localizado en posición 3' del gen <i>accR</i> para generar un fragmento de 642 pb incluido en el plásmido pKNG101 <i>accR</i> |
| 3'AccRmut (<i>SpeI</i>) | CCACTAGTCCATTACGCTGAGGAACCTTGCG (<i>SpeI</i>) | Extremo 3' de un fragmento externo localizado en posición 3' al gen <i>accR</i> para generar un fragmento de 642 pb incluido en el plásmido pKNG101 <i>accR</i> |
| 5'AccS mut (<i>BamHI</i>) | CGGGATCCTTGCGCGGACCCGTCTGTACT (<i>BamHI</i>) | Extremo 5' de un fragmento interno del gen <i>accS</i> localizado en posición 5' del sitio de fosforilación para generar un fragmento de 761 pb incluido en el plásmido pKNG101 <i>accS</i> |
| 3' AccS mut (<i>XbaI</i>) | GCTCTAGACAGCTGGCTTGCGGTGCGG (<i>XbaI</i>) | Extremo 3' de un fragmento interno del gen <i>accS</i> localizado en posición 5' del sitio de fosforilación para generar un fragmento de 761 pb incluido en el plásmido pKNG101 <i>accS</i> |
| 5'AccS mut (<i>XbaI</i>) | GCTCTAGAAATTACTGCATGGGCTGCGTGA (<i>XbaI</i>) | Extremo 5' de un fragmento interno del gen <i>accS</i> localizado en posición 3' del sitio de fosforilación para generar un fragmento de 892 pb incluido en el plásmido pKNG101 <i>accS</i> |
| 3'AccS mut (<i>SpeI</i>) | CGACTAGTACCGCCGATACTGCCATCGG (<i>SpeI</i>) | Extremo 3' de un fragmento interno del gen <i>accS</i> localizado en posición 3' del sitio de fosforilación para generar un fragmento de 892 pb incluido en el plásmido pKNG101 <i>accS</i> |
| 5IVTPN | CGGAATTCCGTGCATCAATGATCCGGCAAG/ <i>EcoRI</i> | Extremo 5' de un fragmento que incluye el promotor P_N (sonda P_N) |
| 3IVTPN | CGGAATTCATCGAACTATCTCCTCTGATG/ <i>EcoRI</i> | Extremo 3' de un fragmento que incluye el promotor P_N (sondas P_N y P_{Nmut} y P_{N2}) |
| 5'PN mut3 | AAACCCCTGATCAAGTGCATGCA | Extremo 5' de un fragmento interno del promotor P_N que incluye sustituciones en 6 bases para generar la sonda P_{Nmut} |
| 5'PN3 | TTTCCGCTCGCGTTCGCTCTC | Extremo 5' de un fragmento del promotor P_N (sonda P_{N3}) |
| 3'PN3 | AATCTTCTTGCCGCAACGC | Extremo 3' de un fragmento del promotor P_N (sonda P_{N3}) |
| 5'PN2 | AATGCAATCAAGTGCATGCAAAGC | Extremo 5' de un fragmento del promotor P_N (sonda P_{N2}) |

3.3. Secuenciación de DNA

3.3.1. Secuenciación automática

La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo *ABI Prism 37 automated DNA sequencer* (Applied Biosystems Inc), en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA gestionado por la empresa Secugen S. L. en el Centro de Investigaciones Biológicas. Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems), y la DNA polimerasa AmpliTaq FS, siguiendo las recomendaciones de los proveedores. Las reacciones se llevaron a cabo con un termociclador *Gene Amp PCR System 2400* (Perkin-Elmer).

3.3.2. Secuenciación manual

En el caso concreto de los experimentos de extensión por cebador (*primer extension*), la secuenciación del DNA patrón se llevó a cabo según el método de terminación de la polimerización por didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) utilizando el *T7 Sequencing Kit* (Amersham Pharmacia Biotech), y [α - 32 P]dATP (6000 Ci/mmol 20mCi/ml; Perkin-Elmer) como desoxinucleótido trifosfato marcado radiactivamente, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

3.4. Determinación del sitio de inicio de la transcripción

3.4.1. Extracción de RNA

Durante el transcurso de esta Tesis Doctoral se determinó el punto de inicio de la transcripción (+1) de los promotores P_D y P_X . Para ello se empleó la técnica de extensión por cebador o *primer extension*. La extensión se realiza mediante un cebador que hibrida con el mRNA en una posición cercana al supuesto punto de inicio de la transcripción. En la Tabla 5 se indica la secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Para la determinación del punto de inicio de la transcripción de los promotores P_x y P_D se empleó la cepa *E. coli* CC118 que incorporaba los plásmidos pSJ3P $_X$ y pSJ3P $_D$, respectivamente (Tabla 4). Las cepas se cultivaron anaeróticamente en medio LB, hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Las células fueron lavadas, resuspendidas en tampón TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA), finalmente fueron incubadas con lisozima (50mg/ml; Sigma). A continuación se aisló el RNA total del cultivo mediante el *RNeasy Mini kit* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del proveedor.

3.4.2. Extensión por cebador (primer-extension)

Las reacciones de extensión se llevaron a cabo con la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV 10U/ μ l; Promega) y 15 μ g de RNA total, tal y como se ha descrito previamente (Martín *et al.*, 1995). Los oligonucleótidos 5'boxDext y Lac57 (Tabla 5) se marcaron con 32 P en su extremo 3' con la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (New England Biolabs 10 U/ μ l) empleando como donador del grupo fosfato [γ - 32 P] ATP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml; Perkin-Elmer). Con el fin de determinar el tamaño de los productos obtenidos en la reacción de extensión, se llevaron a cabo en paralelo reacciones de secuenciación de los plásmidos pSJ3P_D, pSJ3P_X, tal y como se describe en el apartado 3.4.2. Los productos obtenidos en las reacciones se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 6% - urea 8 M. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham GE) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

3.5. Ensayos de retrotranscripción-PCR y (RT-PCR) en tiempo real

Una vez purificado el RNA y eliminado el DNA contaminante, se obtuvo el DNA complementario (cDNA) mediante una reacción de retrotranscripción mediada por la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). Cada reacción de retrotranscripción (20 μ l) contenía 1 μ g de RNA, 200 U de transcriptasa reversa, ditiotreitól (DTT) 10 mM, dNTPs 0.5 mM y 5 mM de pd(N)₆ *random hexamer 5' phosphate* (Amersham Biosciences). Los hexámeros se emplearon como cebadores para poder utilizar las mismas alícuotas de cDNA como molde para reacciones de PCR en las que se emplean diversos pares de oligonucleótidos. El RNA y los hexámeros se incubaron a 65 °C durante 5 minutos para la hibridación, y tras enfriar en hielo se añadieron los restantes componentes de la reacción, que se incubó a 42 °C durante 2 h. La reacción finalizó con una incubación de 15 min a 70 °C. Se empleó 1 μ l del cDNA así obtenido como molde para la PCR posterior. El cDNA se amplificó utilizando los oligonucleótidos requeridos en cada caso a concentración final 0,5 μ M y 1 U de la DNA polimerasa I (Biotools). En cada una de las reacciones de PCR se incluyó un control con 1 μ l de la reacción de RT en la que no se empleó la transcriptasa reversa. Con este control se corroboró que no existía ninguna banda de amplificación indicativa de que la preparación de RNA contuviera DNA contaminante. El volumen total de la reacción de PCR fue de 50 μ l y 30 fueron los ciclos de amplificación.

Cuando se llevaron a cabo experimentos de PCR a tiempo real, el cDNA fue purificado usando el *Gene clean Turbo kit* (MP Biomedicals) y la concentración del cDNA se midió usando un ND100 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies). Para la PCR a tiempo real, se utilizó un termociclador IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). El volumen de cada reacción fue de 25 μ l, que contenían 10 μ l de cDNA diluido (5 ng en cada reacción), 0.2 μ M de los oligonucleótidos 5' y 3' y 12.5 μ l de SYBR Green Mix (Applied Biosystems). Las parejas de oligonucleótidos utilizadas para amplificar los mRNA de los promotores P_D (*boxD*) y P_N (*bzdN*) y de los genes *boxR* y *bzdR*, fueron 5'pboxdQ / 3'pboxdQ, 5'RTpN1 / 3'RTpN2, 5'boxRq / 3'boxRq, 5'bzdRq / 3'bzdRq, respectivamente (Tabla 5).

El gen *DNAE* que codifica la subunidad α de la DNA polimerasa III cuya expresión se ha demostrado constitutiva a lo largo del ciclo celular (Noller *et al.*, 2003), fue utilizado como control interno en las reacciones de PCR a tiempo real, utilizando la pareja de oligonucleótidos 5' POL III HK / 3' POL III HK (Tabla 5). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo de la siguiente forma: 1 ciclo inicial de desnaturalización (95°C, 4 minutos), seguido de 40 ciclos de amplificación (95°C, 1 minuto; hibridación, 60°C, 1 minuto; elongación y medida de la señal, 72°C, 30 segundos). Para la cuantificación relativa de los valores de fluorescencia obtenidos, se realizó una curva de calibrado con diluciones seriadas de DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB.

3.6. Mutagénesis dirigida del gen *accR*

La construcción del gen *accR* mutante (*accRD60E*), se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida en dos etapas sucesivas de PCR. En una primera etapa, se amplificó el gen dividido en dos fragmentos, utilizando DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB como molde. El primero de ellos, comprende desde la secuencia que hibrida con el oligonucleótido 5'His₆-AccR (Tabla 5), hasta la secuencia que contiene el codón donde se inserta la mutación, y es reconocida por el oligonucleótido 3'AccRD60E (Tabla 5). El segundo fragmento comprende el resto del gen, desde la mutación, donde hibridan los oligonucleótidos 5'AccRD60E (Tabla 5), hasta el codón *stop*, que hibrida con el oligonucleótido 3'AccRD60E (Tabla 5). En la segunda etapa de PCR, se utilizaron como molde los dos fragmentos obtenidos anteriormente, que solapan en la región de la mutación, para ser amplificados con los oligonucleótidos 5'His₆-AccR y 3'His₆-AccR, que hibridan al inicio y al final del gen *accR*, regenerando así, un gen completo que

incluye la sustitución Glu por Asp en el residuo número 60 de la proteína AccR. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados y se clonaron en el vector pQE32 (Tabla 4) empleando las dianas de restricción *Bam*HI y *Pst*I, para su posterior sobreexpresión y purificación. El plásmido obtenido se denominó pQE32AccRD60E (Tabla 4). La incorporación de la mutación fue comprobada mediante secuenciación.

4. Procedimientos de transferencia genética

4.1. Transformación de células de *E. coli* mediante choque térmico y electroporación

Las células de *E. coli* se transformaron utilizando dos procedimientos distintos: choque térmico y electroporación. La transformación por choque térmico requiere la preparación previa de células competentes con RbCl (Sambrook y Rusell, 2001). La transformación por electroporación (Wirth *et al.*, 1989) se llevó a cabo en un equipo Gene Pulser/Pulse Controller (Bio-Rad), según las recomendaciones del fabricante.

4.2. Transferencia de plásmidos mediante conjugación

4.2.1. Protocolo de conjugación

Los plásmidos se movilizaron a *Azoarcus* sp. CIB y sus derivados por conjugación biparental utilizando las cepas *E. coli* S17-1 λ pir o *E. coli* Sm10 λ pir como donadoras, siguiendo el protocolo establecido por de Lorenzo y Timmis (1994) con algunas modificaciones. Se utilizó una cantidad de células de la cepa donadora correspondiente a una A_{600} de 5, y de la cepa receptora (*Azoarcus* sp. CIB) cultivada en medio mínimo MC con succinato 0.2% se empleó una cantidad de células correspondiente a una A_{600} de 35. Los exconjugantes fueron seleccionados aeróbicamente en placas de medio mínimo MC con glutámico 10 mM (contraselección de la cepa donadora) y el correspondiente antibiótico cuyo gen de resistencia se encuentra en el plásmido y, en su caso, el de la cepa receptora (cuando se emplearon derivados de *Azoarcus* sp. CIB). Este protocolo de conjugación se empleó tanto para la transferencia de plásmidos replicativos como de plásmidos suicidas.

4.2.2. Construcción de mutantes de inserción por recombinación homóloga en *Azoarcus* sp. CIB

Para la construcción de las cepas mutantes *Azoarcus* sp. CIBdbzdR, *Azoarcus* sp. CIBdboxR y *Azoarcus* sp. CIBdbclA, se procedió a la interrupción insercional de los

genes *bzdR*, *boxR* y *bclA* respectivamente, por recombinación homóloga (Fig. 11). En el caso de la interrupción insercional del gen *bzdR* se utilizó el plásmido pK18*mobbzdR* (Tabla 5) construido por Barragán et al., 2005. Para la interrupción insercional de los genes *boxR* y *bclA*, se amplificaron fragmentos internos de los mismos (499 pb y 578 pb, respectivamente), utilizando las parejas de oligonucleótidos 5'boxRmut/3'boxRmut y 5'LigO21053/3'LigO21633 (Tabla 5), respectivamente, y se clonaron entre las dianas *Bam*HI/*Spe*I y *Eco*RI/*Sma*I, del *polylinker* de los plásmidos pKNG101 y pK18*mob*, (plásmidos suicidas que no replican en *Azoarcus*), respectivamente.

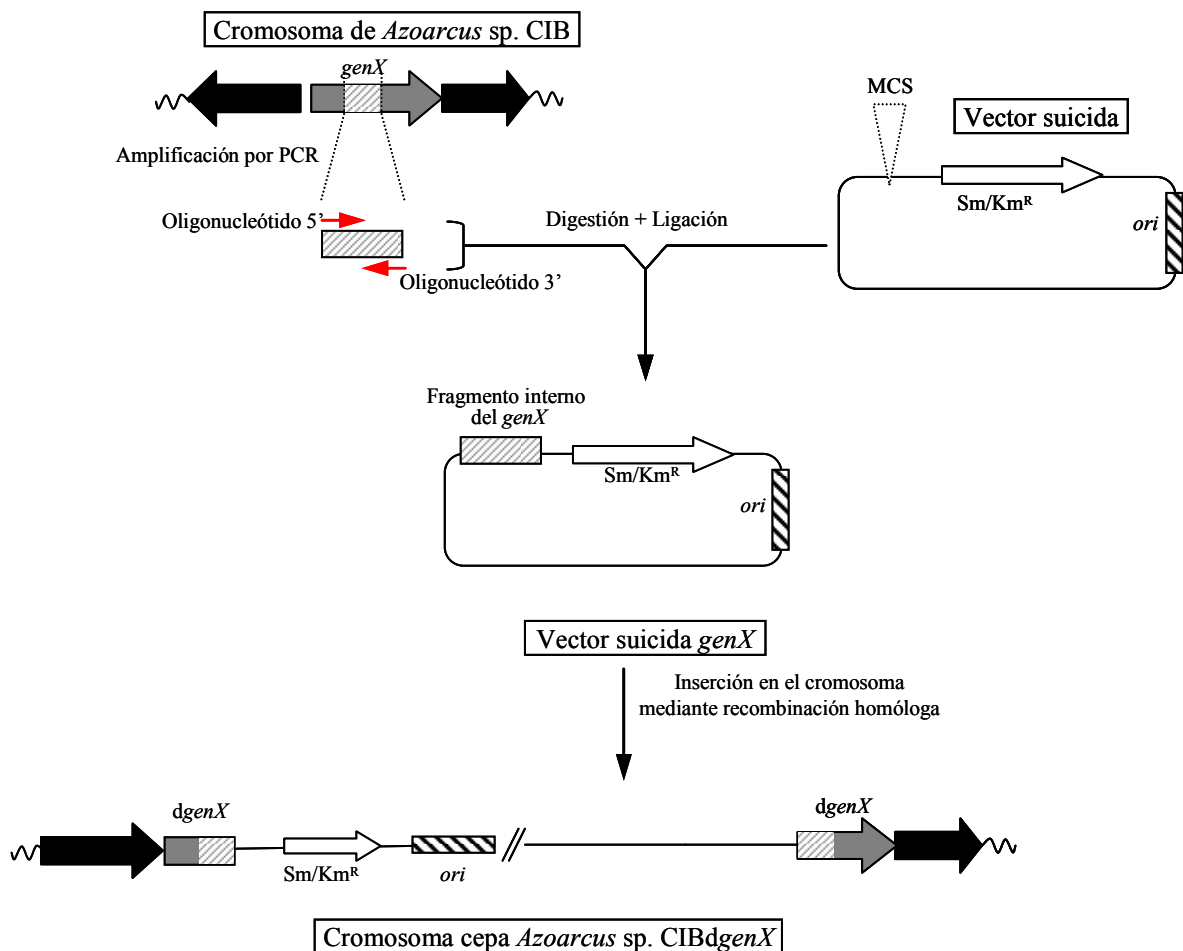


Figura 11. Estrategia seguida para la construcción de los mutantes de inserción por recombinación homóloga en *Azoarcus* sp. CIB. En la parte superior de la figura se esquematiza el cromosoma de *Azoarcus* sp. CIB, incluyendo al gen que va a ser mutado (*genX*) (representado en gris). Las flechas rojas representan las parejas de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR del fragmento interno del *genX*. Los plásmidos suicidas que contenían el fragmento interno del *genX* fueron transferidos a *Azoarcus* sp. CIB mediante conjugación biparental tal y como se indica en el apartado 4.2.1 de esta sección. La recombinación homóloga subsiguiente originó la interrupción de los genes correspondientes y las cepas mutantes *Azoarcus* sp. CIB*dboxR*, *Azoarcus* sp. CIB*dbzdR*, *Azoarcus* sp. CIB*dbclA* y *Azoarcus* sp. CIB*dboxRdbzdR* (Tabla 3). Se representan los orígenes de replicación (*ori*), *Sm/Km^R* representan los genes que codifican las resistencias a estreptomicina y kanamicina, contenidos en los vectores suicidas utilizados en este trabajo, pKNG101 y pK18*mob*, respectivamente. MCS (*Multiple Cloning Site* del vector suicida); d indica gen truncado.

El plásmido pK18*mobbzdR* y las construcciones resultantes pKNG*boxR* y pK18*mobbclA* (Tabla 4) fueron transferidas de la cepas donadoras, *E. coli* S17-1 λ *pir* (para derivados del vector pK18*mob*) y *E. coli* SM10-1 λ *pir* (para derivados del vector pKNG101), a la cepa receptora *Azoarcus* sp. CIB, mediante conjugación biparental tal y como se indica en el apartado 4.2.1 de esta sección. Los transconjugantes presentaban una disrupción génica por inserción, mediante recombinación homóloga.

Los respectivos derivados de los plásmidos suicidas pK18*mob* y pKNG101 fueron seleccionados aeróbicamente en medio MC suplementado con kanamicina (50 μ g/ml) y estreptomycinina (50 μ g/ml), respectivamente, y con ácido glutárico 10 mM como fuente de carbono para la contra-selección de la cepa donadora. Los mutantes *Azoarcus* sp. CIB*dboxR*, *Azoarcus* sp. CIB*dbzdR* y *Azoarcus* sp. CIB*dbclA* fueron analizados por PCR para confirmar la disrupción de los respectivos genes truncados.

La construcción de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dboxRdbzdR*, se llevó a cabo mediante conjugación biparental tal y como se detalla en el apartado 4.2.1 de esta sección, usando como cepa donadora *E. coli* S17-1 λ *pir* (pK18*mobbzdR*) y como cepa receptora *Azoarcus* sp. CIB*dboxR*. Los transconjugantes fueron seleccionados aeróbicamente en medio MA suplementado con ácido glutárico 10 mM y con kanamicina (50 μ g/ml) y estreptomycinina (50 μ g/ml). La confirmación de la disrupción de los genes truncados en la cepa *Azoarcus* sp. CIB*dboxRdbzdR* fue hecha por PCR.

4.2.3. Construcción de mutantes por delección en *Azoarcus* sp. CIB

Para la construcción de los mutantes de *Azoarcus* sp. CIB mediante delección (*Azoarcus* sp. CIB Δ *accR* y *Azoarcus* sp. CIB Δ *accS*, se clonaron en los vectores pKNG101 y pK18*mobsacB* (Tabla 4), respectivamente dos fragmentos de DNA adyacentes a las regiones a mutar (Fig. 12).

Para generar el mutante *Azoarcus* sp. CIB Δ *accR* se clonó una región de DNA en posición 5' al gen *accR* (fragmento de 762 pb), utilizando los oligonucleótidos 5'AccRmut (BamHI) y 3'AccRmut (XbaI) (Tabla 5) y otra región en posición 3' al gen *accR* (fragmento de 642 pb), utilizando los oligonucleótidos 5'AccRmut (XbaI) y 3'AccRmut (SpeI) (Tabla 5), dando lugar al plásmido pKNG101*accR* (Tabla 4).

Para generar el mutante *Azoarcus* sp. CIB Δ *accS* se clonó una región de DNA en posición 5' al sitio de fosforilación de la proteína AccS (fragmento de 761 pb), utilizando los oligonucleótidos 5'AccSmut (BamHI) y 3'AccSmut (XbaI) (Tabla 5) y otra región en posición 3' al sitio de fosforilación de la proteína AccS (fragmento de

892 pb), utilizando los oligonucleótidos 5' AccSmut (XbaI) y 3' AccSmut (SpeI) (Tabla 5), dando lugar al plásmido pK18mobsacBaccS (Tabla 4).

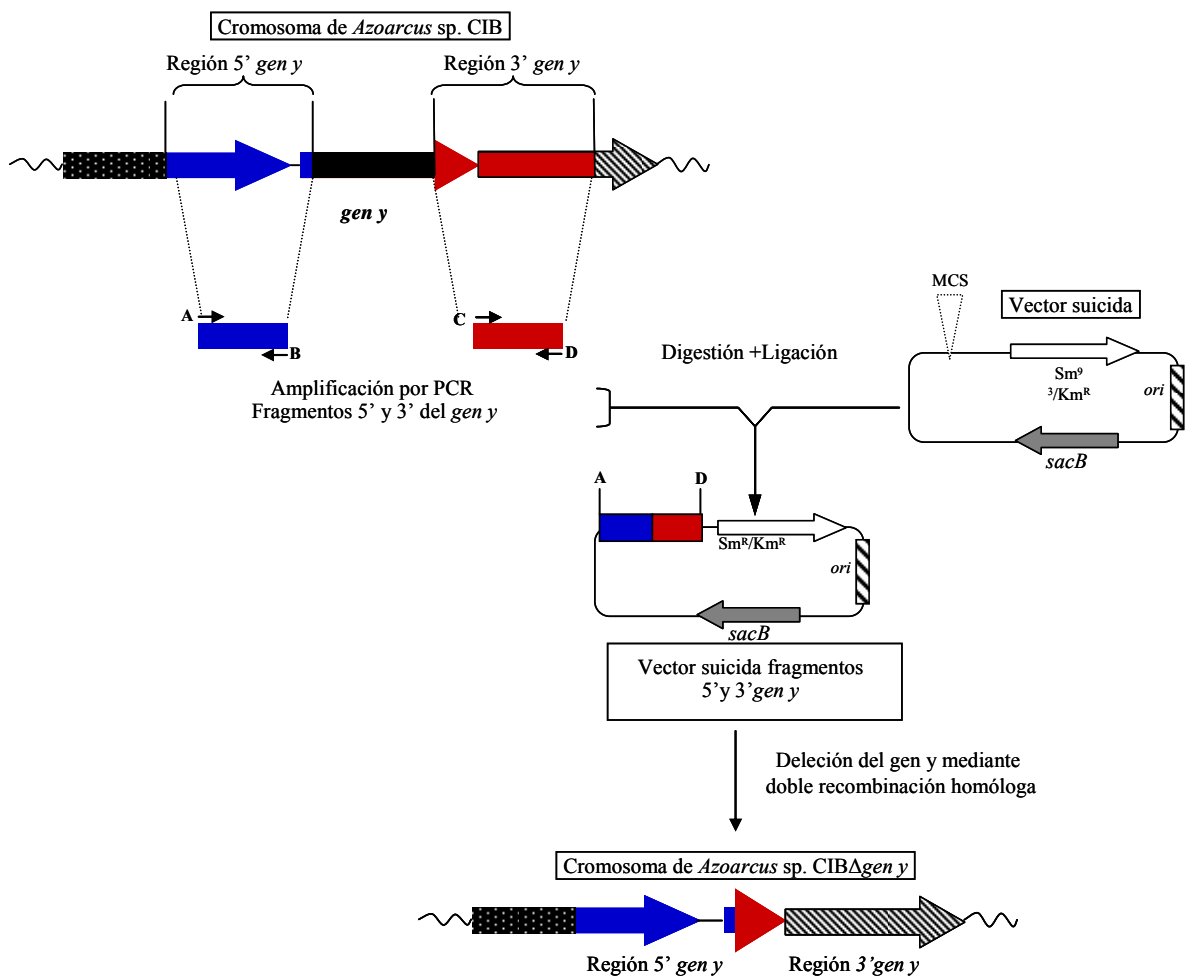


Figura 12. Estrategia seguida para la construcción de los mutantes mediante deleción en *Azoarcus sp. CIB*. En la parte superior de la figura se representa el cromosoma de *Azoarcus sp. CIB*. Se toma como ejemplo para mutar el *gen y* (Negro). En azul y en rojo se representan las regiones localizadas en posición 5' y 3', respectivamente al *gen y*. Tras amplificar por PCR los productos de dichas regiones con las parejas de oligonucleótidos A/B y C/D, son clonados en un vector suicida. Tras dos sucesos de recombinación homóloga, se seleccionan los exconjugantes resistentes a sacarosa y sensibles al antibiótico correspondiente del plásmido y son analizadas por PCR para confirmar la cepa mutante (*Azoarcus sp. CIBΔgen y*) que porta una deleción del *gen y* en su cromosoma. Las abreviaturas usadas en esta figura son MCS, *Multi Cloning Site*; *Sm^R* y *Km^R*, genes que codifican la resistencia a estreptomicina y kanamicina, respectivamente; *ori*, origen de replicación del vector suicida; *sacB*, gen que codifica la resistencia a estreptomicina.

Las construcciones resultantes pKNG101*accR* y pK18mobsacBaccS fueron transferidas de la cepas donadoras *E.coli Sm10 λpir* y *E.coli S17-1 λpir* (Tabla 3), respectivamente a la cepa receptora *Azoarcus sp. CIB*, mediante conjugación biparental tal y como se indica en el apartado 4.2.1 de esta sección. Los respectivos derivados de los plásmidos suicidas, pKNG101 y pK18mobsacB, fueron seleccionados aeróbicamente en medio MC suplementado con estreptomicina (50 µg/ml) y kanamicina

(50 µg/ml), respectivamente y con ácido glutámico 10 mM como fuente de carbono para la contra-selección de la cepa donadora.

Las colonias obtenidas sufrieron una recombinación simple que integra los plásmidos suicidas dentro del cromosoma. Posteriormente fueron crecidas en medio líquido MA con ácido glutámico 10 mM y seleccionadas en placas de MA con ácido glutámico 10 mM y sacarosa 5 mM. Estos nuevos exconjugantes que crecieron en sacarosa se replicaron en placas de MA con ácido glutámico 10 mM y con los correspondientes antibióticos (estreptomomicina o kanamicina) o sacarosa 5 mM. Aquellos que fueron sensibles a los correspondientes antibióticos de los plásmidos pKNG101 y pK18*mobsacB* y que eran resistentes a sacarosa eran mutantes por recombinación doble. Los mutantes obtenidos de esta manera, fueron analizados por PCR para confirmar la delección de las regiones de DNA de los genes *accR* y *accS*

5. Técnicas de manipulación de proteínas

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

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). La técnica utilizada fue la descrita por Laemmli (1970) utilizando geles de poliacrilamida en placa (PAGE) a una concentración del 10-15%. Las muestras se hirvieron a 100 °C durante 10 min en presencia del tampón de ruptura TR (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.005%). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a 50 MA (corriente constante), utilizando un electrolito que contenía Tris-HCl 25 mM pH 8.8, glicina 192 mM y SDS 0.1%. Las proteínas de los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Swank y Munkres, 1971). Las proteínas empleadas como marcadores de masa molecular (fosforilasa B, 97.4 kDa; BSA, 66.2 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 31 kDa; inhibidor de tripsina, 21.5 kDa) se adquirieron en Bio-Rad.

5.2. Sobreproducción y purificación de proteínas

5.2.1. Sobreproducción y purificación de las proteínas His₆BzdR y His₆BoxR

Las células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BzdR) y *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BoxR) se emplearon para la sobreexpresión de las proteínas His₆BzdR y His₆BoxR, respectivamente. Los cultivos fueron incubados a 37°C en 100 ml de LB en presencia de ampicilina y kanamicina hasta que alcanzaron una *A*₆₀₀ de 0.5

(aproximadamente 2 horas), momento en el cual se indujo la sobreexpresión de las fusiones His₆-BzdR o His₆BoxR mediante la adición de IPTG a una concentración de 0.5 mM. Las células fueron incubadas a 37°C durante 5 horas más y posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 minutos. El sedimento celular fue resuspendido en 10 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, KCl 300 mM, imidazol 100 mM, pH 8) y se procedió a la rotura de las células mediante tratamiento en la prensa de French (Aminco Corp.) a una presión de 20000 psi. El lisado celular fue centrifugado a 15000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue cuidadosamente decantado y se hizo pasar 5 ml a través de columnas de afinidad (Ni-NTA Spin kit, QIAGEN). A continuación se realizaron cuatro lavados con 600 µl cada uno de tampón de lisis. Finalmente las proteínas His₆BzdR o His₆BoxR fueron eluidas con un tampón de elución de composición idéntica al tampón de lisis, pero con imidazol a una concentración de 1 M. Dependiendo de la utilización que se le fuera a dar a las proteínas, ésta podía ser dializada. En dicho caso, la muestra eluida era dializada a 4°C en tampón FP (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 2 mM y KCl 50 mM), repartida en alícuotas y almacenada a -20° C. Si la muestra no era dializada, era almacenada a 4°C. La concentración de las proteínas puras se estimó mediante espectrofotometría a 280 nm, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar teórico de cada una de ellas. Se obtuvieron concentraciones máximas de 1mg/ml de proteína purificada, a homogeneidad electroforética.

5.2.2. Sobreproducción y purificación de las proteínas His₆AccR, His₆AccRD60E y His₆-CAccR

Las cepas *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆AccR), *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆AccRD60E) y *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆-CAccR) fueron empleadas para la sobreexpresión de las proteínas His₆AccR, His₆AccRD60E y His₆-CAccR, respectivamente. La hiperproducción de las proteínas se realizó en las mismas condiciones utilizadas en la sobreexpresión de las proteínas His₆BzdR y His₆BoxR (ver apartado 5.2.1. de esta sección), a diferencia del volumen de los cultivos, que para este caso fue de 1 l.

La preparación de los extractos celulares parte de la resuspensión de las células en 25 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, KCl 300 mM, imidazol 20 mM pH 8). Las células se rompieron realizando dos pases sucesivos a través de una prensa de French (20000 psi; Amino Corp). El extracto obtenido se centrifugó a 4°C y 15000 rpm durante

45 minutos. Tras recuperar el sobrenadante como la fracción de extracto celular, éste fue centrifugado a 26000 rpm durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante fue cuidadosamente decantado y se hizo pasar a través de columnas de agarosa-níquel-ácido nitrilotriacético, Ni-NTA, (QIAGEN). Las columnas se lavaron con 50 volúmenes de tampón de lisis y finalmente las proteínas fueron eluidas con un tampón de elución de composición idéntica al tampón de lisis, con imidazol a una concentración de 75 mM. Las proteínas His₆AccR, His₆AccRD60E y His₆-CAccR fueron dializadas a 4°C en tampón FP (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, glicerol 5% y KCl 50 mM). La concentración de las fracciones de proteína pura se estimó mediante espectrofotometría a 280 nm teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar teórico de las proteínas. Posteriormente, las proteínas fueron repartidas en alícuotas y almacenadas a -20° C durante mas de 3 meses sin observar pérdida de su actividad.

5.2.3. Sobreproducción y purificación de las proteínas His₆AccS₂₈₈₋₉₀₃ y His₆Acc₆₅₃₋₉₀₃.

Las cepas *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆AccS₂₈₈₋₉₀₃) y *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃) fueron empleadas para la sobreexpresión de las proteínas His₆AccS₂₈₈₋₉₀₃ y His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃, respectivamente. La hiperproducción de las proteínas se realizó en las mismas condiciones utilizadas en la sobreexpresión de las proteínas His₆BzdR y His₆BoxR (ver apartado 5.2.1. de esta sección), a diferencia del volumen de los cultivos, que para este caso fue de 1 l.

La preparación de los extractos celulares parte de la resuspensión de las células en 25 ml de tampón A (Tris-HCl pH 8, EDTA 0.1 mM, NaCl 500 mM imidazol 20 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, Glicerol 5%). Las células se rompieron realizando dos pases sucesivos a través de una prensa de French (20000 psi; Amino Corp). El extracto obtenido se centrifugó a 4°C y 15000 rpm durante 45 minutos. El sobrenadante fue cuidadosamente decantado y se hizo pasar a través de columnas de agarosa-níquel-ácido nitrilotriacético, Ni-NTA, (QIAGEN). Las columnas se lavaron con 50 volúmenes de tampón A y finalmente las proteínas fueron eluidas con en un tampón idéntico al tampón A incrementando la concentración de imidazol a 75 mM. Las proteínas fueron dializadas a 4°C en el tampón de análisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, KCl 200 mM, MgCl₂ 2 mM, EDTA 0.1 mM, glycerol 10% y DTT 2 mM), repartidas en alícuotas y conservadas a -20°C durante más de 3 meses sin observarse pérdida de su actividad.

5.3. Fosforilación *in vitro* de la proteína AccR

Para la fosforilación *in vitro* de la proteína His₆AccR se utilizaron diferentes concentraciones de proteína según el experimento y 20 mM de carbamoil fosfato. Para los experimentos de retardo en gel y footprinting que requirieron proteína His₆AccR fosforilada se utilizó el tampón de fosforilación (PIPES 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, KCl 10 mM, NaCl 170 mM y 5% (vol/vol), pH 7.5. En el caso de los experimentos de transcripción *in vitro* que requirieron proteína His₆AccR fosforilada, las reacciones de fosforilación se hicieron en tampón IVT (Ver apartado 7.4. de esta sección). Las reacciones de fosforilación se llevaron a cabo a 28°C durante 90 minutos.

5.4. Ensayos de espectrometría de masas (MALDI-TOFF)

Los experimentos de espectrometría de masas se realizaron para analizar las proteínas purificadas AccR y AccR-P (20 μM) en un espectrómetro de masas Autoflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics) equipado con un láser Smartbeam. La adquisición de los espectros se realizó con el software flexControl (Bruker-Daltonics) usando una potencia de láser justo por encima del umbral de ionización operando en modo positivo y lineal. Sistemáticamente se acumularon 1000 espectros individuales en un único espectro de masas. La calibración externa se realizó con albúmina bovina (Sigma) que cubre el rango de 16000 a 60000 Da. La matriz utilizada fue la 2,5-dihidroxiacetofenona (Bruker-Daltonics). Para la preparación de la matriz se disolvieron 7,6 mg de esta en 375 ul de Etanol (Merck) seguido de la adición de 125 ul de una disolución de citrato diamónico 80 mM. Se diluyeron 2 ul de cada muestra con 2 ul de ácido trifluoroacético al 2% (v/v) (Sigma) y 2 ul de disolución de la matriz. La mezcla (1ul) se depositó en un portamuestras del MALDI (placa de acero inoxidable MTP384 800 um AnchorChip, Bruker-Daltonics) y se dejó cristalizar a temperatura ambiente. El análisis de los espectros se realizó con el software flexAnalysis (Bruker-Daltonics).

6. Ensayos de actividad enzimática

6.1. Ensayo de Actividad β-galactosidasa

Para los ensayos de actividad β-galactosidasa se emplearon células de *E. coli* como de portadoras de las fusiones traduccionales $P_N::lacZ$, $P_D::lacZ$ o $P_X::lacZ$. Las células se cultivaron a 30 °C en medio rico LB o en medio mínimo M63 con glicerol (20mM) hasta alcanzar la densidad óptica deseada en cada caso (mitad de la fase exponencial de crecimiento). La actividad β-galactosidasa se analizó permeabilizando

las células, y las unidades de actividad enzimática (Unidades Miller) se determinaron según el método descrito por Miller (1972).

6.2. Ensayo de actividad autoquinasa (Autofosforilación)

Los ensayos de actividad autoquinasa de las proteínas His₆AccS₂₈₈₋₉₀₃ y His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃, fueron llevados a cabo siguiendo el protocolo descrito por Lacal et al., 2006 con algunas modificaciones en el tampón de análisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, KCl 200 mM, MgCl₂ 2 mM, EDTA 0.1 mM, glicerol 10% (vol/vol) y DTT 10 mM). El ensayo de autofosforilación fue llevado a cabo a 24°C en presencia de 1 y 5 μM de las proteínas purificadas His₆AccS₂₈₈₋₉₀₃ o His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃, respectivamente, en un volumen final de 200 μl de reacción tras la adición de ATP marcado radiactivamente (50 μM de ATP que contenían 5 μCi [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol, Perkin-Elmer Life Sciences)). Se tomaron muestras (12,5 μl) a diferentes tiempos de incubación y se frenó la reacción mediante la adición de tampón TR (Ver apartado 5.1 de esta sección). Una vez frenada la reacción, las muestras fueron refrigeradas en hielo y finalmente se cargaron en geles SDS-PAGE del 12.5 o del 15%. Los geles se lavaron con H₂O destilada y se secaron sobre papel Whatman 3MM. Los productos de la reacción se detectaron tras la exposición de los geles a una pantalla Imagine Plate BAS-MS 2340 (FUJIFILM), fueron analizados y cuantificados con el phosphorimayer FUJIFILM FLA-3000 y el programa MultiGauge V3.0.

6.3. Ensayo de actividad autofosfatasa

La proteína purificada His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ fue autofosforilada tal y como se describió en el apartado anterior durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionó un exceso molar de ATP (500 veces) no marcado radiactivamente y se tomaron muestras (12,5 μl) a diferentes tiempos de incubación. Las reacciones se pararon con tampón TR (Ver apartado 5.1 de esta sección) y se cargaron en geles SDS-PAGE del 12.5%. Los geles se lavaron con H₂O destilada y se secaron sobre papel Whatman 3MM. Los productos de la reacción se detectaron tras la exposición de los geles a una pantalla Imagine Plate BAS-MS 2340 (FUJIFILM), fueron analizados y cuantificados con el phosphorimager FUJIFILM FLA-3000 y el programa MultiGauge V3.0.

6.4. Ensayos de transfosforilación *in vitro*

La proteína purificada His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ fue autofosforilada tal y como se describió en el apartado 6.2 de esta sección durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se

añadió al ensayo la misma concentración molar de proteína purificada His₆AccR o His₆AccRD60E. En paralelo, se llevaron controles de reacciones que solo contenían proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ o His₆AccR. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de ensayo y se analizaron de la misma manera que se describe en los apartados 6.2 y 6.3 de esta sección. Estos ensayos se llevaron a cabo en base a la metodología descrita por Lacal et al., 2006, con algunas modificaciones.

6.5. Ensayo de actividad fosfatasa de AccR mediado por AccS

Inicialmente se llevó a cabo un ensayo de transfosforilación *in vitro* entre las proteínas purificadas His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ y His₆AccR, de la misma manera que se ha indicado en el apartado anterior. Una vez fosforilada la proteína His₆AccR, se eliminó el ATP libre del ensayo mediante exclusión por peso molecular, utilizando columnas Sephadex PD SpinTrapTMG-25 GE Healthcare y se añadieron relaciones molares 1:1 y 1:6 entre las proteínas purificadas His₆AccR y His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación y se analizaron de la misma manera que se describe en el apartado 6.2 de esta sección.

6.6. Ensayo de transferencia reversa de fosfato

Inicialmente se llevó a cabo un ensayo de transfosforilación *in vitro* entre las proteínas purificadas His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ y His₆AccR, de la misma manera que se ha indicado en el 6.4 de esta sección. Una vez fosforilada la proteína His₆AccR, se eliminó el ATP libre del ensayo mediante exclusión por peso molecular, utilizando las columnas de cromatografía Sephadex PD SpinTrapTMG-25 GE Healthcare y se añadió EDTA a una concentración final de 50 mM. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación y se analizaron de la misma manera que se describe en el apartado 6.2 de esta sección.

6.7. Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad autoquinasa

Las proteínas purificadas His₆AccS₂₈₈₋₉₀₃ o His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ fueron autofosforiladas tal y como se indica en el apartado 6.2 de este apartado, en un volumen final de 20 μ l y sin añadir DTT en el tampón de ensayo. Antes del inicio de las reacciones de autofosforilación mediante la adición de ATP marcado radiactivamente (50 μ M de ATP que contenían 5 μ Ci [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol, Perkin-Elmer Life Sciences)), las proteínas fueron incubadas a 24°C durante 10 minutos con diferentes compuestos (NAD⁺, NADP⁺, DTT, FAD⁺, FMN⁺, D-lactato, acetato, succinato, ditionito, NADH,

NADPH, DTT, ubiquinona0 o menadiona) a diferentes concentraciones, tal y como se indica en cada experimento. Todos los compuestos fueron disueltos en agua excepto la ubiquinona0 y la menadiona que fueron disueltos en etanol 50% y DMSO, respectivamente, a una concentración 100x. Se tomaron muestras a los diferentes tiempos de incubación detallados y se analizaron de la misma manera que se describe en el apartado 6.2 de esta sección.

7. Ensayos de unión de proteína a DNA

7.1. Marcaje de sondas radiactivas

La obtención de las sondas radiactivas se llevó a cabo mediante amplificación por PCR. La sonda P_N fue obtenida a partir del plásmido pECOR7 (Tabla 4), tal y como se describe en Barragán et al., 2005. La sonda P_{Nmut} fue obtenida a partir de DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB y las sondas de la región intergénica boxDR fueron amplificadas por PCR a partir del plásmido pSJ3PX (Tabla 4). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando DNA polimerasa *Pfu* (Biotools B. M. Labs) y los siguientes pares de oligonucleótidos específicos (Tabla 5):

- Sonda P_N (376 pb): 5'IVTPN / 3'IVTPN
- Sonda PN2 (162 pb): 5'PN2 / 3'IVTPN
- Sonda PN3 (93 pb): 5'PN3 / 3' PN3
- Sonda P_{Nmut} (376 pb): 5'PNmut3 / 3'IVTPN
- Sonda boxDR marcada en el extremo del gen *boxD*: (234 pb) FPAdh5'/FPAdh3'
- Sonda boxDR marcada en el extremo del gen *boxR*: (266 pb) 5'FPAdhRev/3'FPAdhRev

Los fragmentos de PCR se purificaron mediante el kit *Geneclean* Turbo (Q-BIOgene). Las sonda P_N utilizada en el apartado 3.1 de los Resultados de este trabajo y la sonda boxDR marcada en el extremo del gen *boxD*, fueron digeridas con las parejas de enzimas *PvuII* / *EcoRI* y *ScaI* / *EcoRI*, respectivamente. Los fragmentos obtenidos se marcaron radiactivamente en el extremo 3' generado por la enzima *EcoRI* utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (5 U/μl, Promega) y [α -³²P]dATP (6000 Ci/mmol, 20mCi/ml; Perkin-Elmer Life Sciences). Las reacciones de PCR para la obtención de la sonda boxDR marcada en el extremo del gen *boxR*, al igual que las sondas P_N, P_{Nmut}, P_{N2} Y P_{N3}, utilizadas en los apartados 4.2.5 de los Resultados, fueron llevadas a cabo tras previo marcaje en el extremo 5' de los oligonucleótidos

3'FPAdhRev, 3'IVTPN y 3'PN3, respectivamente, con la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 y [γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol, Perkin-Elmer Life Sciences). Los fragmentos marcados se purificaron empleando el kit *GeneClean Turbo* (Q-Biogene)

7.2. Ensayos de retardo en gel

Para los ensayos de retardo en gel se utilizaron las sondas radiactivas obtenidas tal y como se detalla en el apartado anterior. Las mezclas de reacción contenían extractos crudos obtenidos a partir de células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BzdR) o *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BoxR) que contenían las proteínas His₆BzdR o His₆BoxR, respectivamente o la proteína purificada correspondiente (His₆AccR, His₆AccRD60E o His₆-CAccR) a diversas concentraciones, así como la sonda correspondiente (P_N , P_{Nmut} o boxDR) marcada radiactivamente a una concentración de 0.5 nM en un volumen final de reacción de 9 μ l. El tampón de retardo utilizado contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 2 mM, KCl 50 mM, seroalbúmina bovina (BSA) 250 μ g/ml y DNA inespecífico de esperma de salmón a una concentración de 50 μ g/ml. El resultado de la reacción se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% con tampón TBE 0.5x (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM). El gel se secó sobre papel Whatman 3MM y los productos de la reacción se detectaron por autorradiografía con películas Hyperfilm MP (Amersham Biosciences) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

7.3. Ensayos de protección frente a la digestión con DNAsa I (*footprinting*)

Las mezclas de reacción para el ensayo de protección frente a la digestión con DNAsa I se realizaron en tampón FP (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, KCl 50 mM, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 2 mM), al que se añadió BSA (500 μ g/ml) en presencia de la sonda correspondiente (P_N , o boxDR) a una concentración de 2 nM y 10 μ l de extractos crudos obtenidos a partir de células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BzdR) o *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BoxR) o de la proteína purificada His₆AccR previamente fosforilada (ver apartado 5.3 de esta sección) a diversas concentraciones. Las muestras (en un volumen final de reacción de 15 μ l) se incubaron a 30°C durante 20 min, transcurridos los cuales se añadieron 3 μ l (0.05 U) de DNAsa I (Amersham Biosciences) diluida en un tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM y KCl 125 mM. La digestión con DNAsa I se realizó a 37 °C durante 25 segundos y se detuvo por la adición de 180 μ l de solución DNAsa STOP (acetato sódico 0.4 M,

EDTA 2.5 mM, DNA de esperma de salmón 50 µg/ml y glicógeno 0.3 µl/ml). Las muestras se sometieron a una extracción proteica con fenol y el DNA fue precipitado con 3 volúmenes de etanol absoluto (tras una incubación de al menos 1 h a -80 °C) mediante centrifugación a 14000 rpm y 4 °C en una minifuga refrigerada. Las muestras se lavaron con etanol al 70% y, posteriormente, se secaron y se resuspendieron en tampón de carga (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, formamida 80%, EDTA 20%, azul de bromofenol 0.05% m/v y azul de xilencianol 0.05% m/v). Finalmente, las muestras fueron desnaturalizadas por incubación a 95 °C durante 3 min.

En paralelo a las reacciones de *footprinting*, las correspondientes sondas se secuenciaron mediante el método A+G de Maxam y Gilbert (1980) y se analizaron junto a las reacciones de protección frente a la digestión con DNAsa I en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% - urea 8 M, los cuales se secaron al vacío sobre papel Whatman 3 MM y, por último, se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham Biosciences) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

7.4. Ensayos de transcripción *in vitro*

Todas las soluciones se prepararon con agua destilada que contenía el inhibidor de RNAsa, dietilpircarbonato (DEPC) (Sigma), y fueron filtradas antes de su uso. El tampón utilizado para la reacción contenía Tris-HCl pH 7.5 40 mM, MgCl₂ 10 mM y KCl 100 mM. El DNA molde utilizado correspondía al plásmido pJCDP_N (Tabla 4). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 µl que contenían DNA plasmídico 5 nM y BSA a 500 µg/ml. Se añadieron 3 µl de *E. coli* RNA polimerasa *holoenzyme* 50 nM (1 U/µl; USB) y 21 µl de proteína AccR o AccR-P según corresponda en cada reacción, incubándose esta mezcla a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, se añadió la proteína His₆Fnr*. Las proteínas utilizadas en el ensayo fueron diluidas previamente en el tampón anteriormente mencionado que contenía además ditiotreitól 2 mM y BSA a 500 µg/ml, a diversas concentraciones finales. Esta mezcla fue incubada a 37 °C durante 10 minutos para permitir la formación de los complejos abiertos. La elongación de la cadena de RNA naciente comenzó al añadir 5 µl de una mezcla que contenía ATP, CTP y GTP 1 mM, y 1 µCi de [α -³²P] UTP (Amersham Biosciences). Se paró la reacción al cabo de 15 minutos con 50 µl de una solución STOP que contenía NaCl 350 mM, EDTA 50 mM y RNA transferente 100 µg/ml. El RNA fue precipitado en 3 volúmenes de etanol absoluto y mantenido durante a 1 hora a -80° C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm a 4° C y se llevó a cabo

un segundo lavado con etanol al 70%. Las muestras se secaron y se resuspendieron en 25 μ l de tampón de carga que contenía formamida al 80% (v/v), EDTA 20 mM, azul de bromofenol y azul de xilencianol, antes de ser calentadas a 90 °C y cargadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 5% (v/v)-urea 8 M. La electroforesis se desarrolló a 300 V. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en películas Hyperfilm™ MP (Amersham Pharmacia Biotech) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

8. Ensayos de ultracentrifugación analítica

Los experimentos de velocidad de sedimentación y de equilibrio de sedimentación se llevaron a cabo en una ultracentrífuga analítica modelo Optima XL-A (Beckman) equipada con un espectrofotómetro UV-visible y con un rotor An50Ti con celdas de doble sector de cuarzo. Para la detección del gradiente de concentración de proteína, las medidas fueron llevadas a cabo utilizando una longitud de onda de absorción de 280 nm para los experimentos con las proteínas His₆AccR, His₆AccR-P, His₆AccRD60E y de 235 nm para los experimentos con la proteína His₆-CAccR. En los diferentes ensayos se utilizaron diferentes concentraciones de proteína (His₆AccR, His₆AccR-P His₆AccRD60E, His₆-CAccR) que variaban entre 5 y 40 μ M. En todos los casos, la proteína se encontraba disuelta en un tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5, glicerol 5% y KCl 50 mM. La velocidad a la que se sometieron las muestras (400 μ l) fue de 48000 rpm. La distribución de coeficientes de sedimentación se calculó mediante el programa SEDFIT (Schuck y Rossmannith, 2000; Schuck *et al.*, 2002). Los coeficientes de sedimentación fueron corregidos por la composición del tampón utilizando el programa SEDNTERP (Laue, 1992) para obtener los valores estándares correspondientes (en agua y a 20 °C). La masa molecular aparente de las proteínas His₆AccR, His₆AccR-P His₆AccRD60E y His₆-CAccR en solución, se determinó mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación que describe la distribución de concentraciones radiales de un soluto ideal.

9. Recursos bioinformáticas

9.1. Análisis de secuencias

El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó con los siguientes programas y servidores: Chromas 2.01 (Technelysium Pty Ltd.), análisis cromatogramas procedentes de reacciones rutinarias de secuenciación; Bioedit *Sequence Alignment*

Editor v7.0.3 (Hall, 1999), análisis de cromatogramas procedentes de reacciones rutinarias de secuenciación; Biosupport (<http://bioinfo.hku.hk/>), obtención de secuencias reversas y complementarias de DNA, traducción de secuencias de DNA a proteína; Institut Pasteur (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#welcome>), traducción de secuencias de DNA en los seis marcos de lectura simultáneamente; Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/DNA.html>), traducción de secuencias de DNA.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias deducidas de aminoácidos se compararon con las existentes en las bases de datos mediante el uso de los programas BlastN y BlastP, respectivamente (Altschul *et al.*, 1990). El servidor seleccionado para ejecutar estos algoritmos fue el del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/BLAST.cgi>).

La comparación de parejas de secuencias proteicas se realizó con el programa Blast2sequences a través del servidor del NCBI, mientras que para los alineamientos múltiples de secuencias se empleó el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) desde el servidor EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Las propiedades teóricas de los productos proteicos se determinaron con la aplicación *ProtParam Tool* (ExpASy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics) a través del servidor <http://expasy.org/tools/protparam.html>.

El *Codon Adaptation Index* (CAI; Sharp y Li, 1987) de algunos genes (*box*, *bzd*) se calculó empleando la aplicación ECAI (*Expected CAI Calculation*); (Puigbo *et al.*, 2008), a través del servidor <http://genomes.urv.es/CAIcal/E-CAI/> (Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Universidad Rovira i Virgili), utilizando la información de secuencia del genoma de *Azoarcus* sp. CIB disponible en nuestro grupo.

Los oligonucleótidos se diseñaron empleando el programa Gene Runner 3.05 (Hastings Software Inc.)

9.2. Construcción de árboles filogenéticos

Para la construcción de árboles filogenéticos se partió de alineamientos de múltiples secuencias aminoacídicas mediante el programa ClustalW, tal y como se indica en el apartado anterior. El alineamiento obtenido, mediante el “método del vecino más próximo” (*neighbour-joining*), se procesó con el programa PHYLIP (Phylogenetic Interface Package) versión 3.5.1. por J. Felsenstein (Brodskii *et al.*, 1995) a través del servidor TreeTop-GeneBee (http://www.genebee.msu.su/services/phree_reduced.html) del Instituto Belozersky de Biología Física-Química (Universidad Estatal de Moscú). El

árbol obtenido se visualizó con el programa TreeView X 0.5.1 (Universidad de Glasgow).

9.3. Modelado de la estructura tridimensional de proteínas

Los modelos tridimensionales de proteínas se generaron con las aplicaciones web 3D-Jigsaw (Cancer Research UK, <http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>) y SwissModel (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1).

La visualización de los modelos 3D se realizó con el programa PyMol (DeLano Scientific, <http://pymol.sourceforge.net/>).

Para la predicción de la estructura secundaria de las proteínas se empleó el programa PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, UCL Department of Computer Science)

IV. RESULTADOS

1. Identificación del *cluster* génico responsable de la degradación aeróbica del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Como se ha indicado en la Introducción, algunas bacterias tales como *Azoarcus* sp. CIB, son capaces de degradar benzoato tanto aeróbica como anaeróticamente (Carmona *et al.*, 2009; Mohamed *et al.*, 2001; Rabus *et al.*, 2005; López-Barragán *et al.*, 2004). Si bien, se han estudiado durante los últimos años los genes *bzd* implicados en la degradación anaeróbica del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB (Barragán *et al.*, 2005; Lopez Barragán *et al.*, 2004; Durante-Rodríguez *et al.*, 2006; Durante-Rodríguez *et al.*, 2010), en la degradación aeróbica de este compuesto aromático no han sido descritos hasta la fecha.

Durante el transcurso del proyecto de la secuenciación del genoma de *Azoarcus* sp. CIB, se identificaron 16 genes que mostraron una identidad superior al 90% con los genes del *cluster box* que había sido previamente descrito y caracterizado en *Azoarcus evansii* (Gescher *et al.*, 2002), así como una identidad superior al 80% con los genes de los *clusters box* predichos en *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (Rabus *et al.*, 2005) y *Azoarcus* sp. BH72 (Krause *et al.*, 2006). Estos estudios sugerían que los genes identificados constituyen el *cluster box* para la degradación aeróbica del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB (Fig 13).

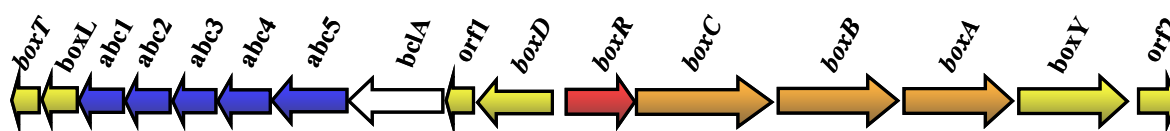


Figura 13. Organización del *cluster* génico *box* para la degradación aeróbica del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB. Los diferentes módulos funcionales predichos en base a su similitud con los de *A. evansii* se indican con códigos de color. En blanco se representa el gen *bclA*, que codifica una benzoato-CoA ligasa, encargada de la activación del sustrato de la ruta. Los genes *boxA*, *boxB* y *boxC*, que codifican las enzimas implicadas en los pasos de desaromatización y apertura del anillo aromático están indicados con flechas naranjas. Los genes *boxD*, *boxT*, *boxL* y *boxY* que codifican las enzimas aldehído deshidrogenasa, tioesterasa, lactonasa, tiolasa, respectivamente y dos proteínas con función desconocida (*orf1* y *orf2*) presuntamente involucradas en la ruta baja *box*, se representan con flechas amarillas. El gen *boxR* que codifica para un presunto regulador transcripcional está indicado con una flecha roja. Los genes que codifican un posible transportador de tipo ABC (*abc1-abc5*), se muestran con flechas azules.

Con el objetivo de comprobar experimentalmente que el *cluster box* identificado en *Azoarcus* sp. CIB es el responsable de codificar las enzimas necesarias para la degradación aeróbica de benzoato, se construyó la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dbclA* (Tabla 3), cuyo gen *bclA*, que codifica la benzoato-CoA ligasa de la ruta aeróbica (Fig.

13), fue inactivado mediante interrupción insercional utilizando el plásmido pK18*mobbclA* (Tabla 4), tal y como se detalla en el apartado 4.2.2 de Materiales y Métodos. Esta cepa fue incapaz de crecer aeróbicamente en benzoato. Esta observación permitió comprobar que la interrupción del gen *bclA* impide la activación de los genes *box* y por ende el crecimiento en benzoato bajo condiciones aeróbicas.

La significativa identidad de secuencia entre los productos génicos del *cluster box* de *Azoarcus* sp. CIB y las proteínas ortólogas de *A. evansii* (Tabla 6), permitió sugerir la función de la mayoría de las proteínas codificadas por los genes *box* de la cepa CIB. Así, los genes *box* de la cepa *Azoarcus* sp. CIB los cuales están organizados en cinco módulos funcionales (Fig. 13), que codifican una ruta bioquímica similar a la descrita en otras bacterias (Fig. 2) y cuya función predicha es la siguiente:

- **Activación del anillo aromático.** El gen *bclA* codifica una benzoato-CoA ligasa que activa el benzoato mediante la adición de una molécula de CoA, transformándolo en benzoil-CoA.
- **Desaromatización y apertura del anillo aromático.** Los genes *boxA* y *boxB* codifican una reductasa dependiente de NADPH y una benzoil-CoA 2,3-epoxidasa, respectivamente, responsables de la desaromatización del anillo del benzoil-CoA. El gen *boxC* codifica una 2,3-epoxibenzoil-CoA hidrolasa, necesaria para la apertura del compuesto alicíclico y la formación de 3,4-dihidroadipil-CoA.
- **Transporte de benzoato.** Un transportador de tipo ABC de cinco componentes estaría implicado en la entrada de benzoato en la bacteria.
- **Regulación.** El gen *boxR* codificaría un regulador transcripcional específico de los genes *box*.
- **Ruta baja.** los genes *boxD*, *boxT*, *boxL* y *boxY*, codifican una semialdehido deshidrogenasa, una tioesterasa, una lactonasa y una tiolasa, respectivamente, que serían las responsables de transformar el 3,4-dihidroadipil-CoA semialdehido en acetil-CoA y succinil-CoA.

| Gen | D (pb) | Producto génico aa/kDa | Función hipotética del producto génico | Productos génicos <i>cluster box Azoarcus Evansii</i> | | |
|-------------|--------|------------------------|--|---|--|-----------------|
| | | | | Nombre/aa | Función | % ID Referencia |
| <i>boxT</i> | 7 | 137/15.8 | Tioesterasa | *BoxU/140 | Tioesterasa | 96 AAN39365 |
| <i>boxL</i> | 7 | 256/27.9 | Lactonasa | *BoxL/256 | Posible lactonasa | 95 AAN39366 |
| <i>abcI</i> | 2 | 257/28.0 | | *AbcI/257 | Posible ATPasa del transporte de benzoato | 97 AAN39367 |
| <i>abc2</i> | 7 | 252/27.4 | Subunidad de transportador ABC | *Abc2/252 | Posible ATPasa del transporte de benzoato | 98 AAN39368 |
| <i>abc3</i> | 17 | 322/34.3 | | - | - | - |
| <i>abc4</i> | 245 | 288/30.8 | | *Abc4/288 | Posible subunidad transmembranal de transporte de benzoato | 98 AAN39369 |
| <i>abc5</i> | 153 | 394/42.2 | | *Abc/394 | Posible subunidad periplásmica de transporte de benzoato | 94 AAN39370 |
| <i>bclA</i> | 205 | 529/57.8 | Benzoato-CoA ligasa | BclA/529 | Benzoato-CoA ligasa | 95 AAN39371 |
| <i>orf1</i> | 67 | 155/16.7 | Desconocida | *Orf1/155 | Desconocida | 93 AAN39372 |
| <i>boxD</i> | 329 | 525/54.2 | Semialdehído deshidrogenasa | BoxD/515 | 3,4-dihidroadiquil-CoA semialdehído deshidrogenasa | 94 AAN39373 |
| <i>boxR</i> | 31 | 300/34.0 | Regulador transcripcional | BoxR/300 | Regulador transcripcional | 96 AAN39374 |
| <i>boxC</i> | 59 | 555/60.9 | 2,3-epoxi-benzoil-CoA dihidrolasa | BoxC/555 | 2,3-epoxi-benzoil-CoA dihidrolasa | 94 AAN39375 |
| <i>boxB</i> | 251 | 473/54.3 | Benzoil-CoA epoxidasa | BoxB/473 | 2,3-benzoil-CoA epoxidasa | 96 AAN39376 |
| <i>boxA</i> | 211 | 414/45.7 | Reductasa dependiente de NADPH | BoxA/414 | Reductasa dependiente de NADPH | 96 AAN39377 |
| <i>boxY</i> | 171 | 402/42.1 | Tiolasa | *BoxY/402 | Tiolasa | 95 AAN39378 |
| <i>orf2</i> | 47 | 193/22.0 | Desconocida | *Orf2/193 | Desconocida | 63 AAN39379 |

Tabla 6. Análisis de los genes *box* de *Azoarcus* sp. CIB y de sus productos génicos. En la tabla, se han detallado los nombres de los genes del *cluster box* de *Azoarcus* sp. CIB, la distancia (D) que separa cada gen del siguiente expresada en pares de bases (pb), la longitud en aminoácidos (aa) de los productos génicos y su masa molecular (en kDa), el grado de identidad con los productos génicos del *cluster box* de *Azoarcus Evansii* (%ID), así como la hipotética función que se les ha asignado a cada uno de ellos. También se especifica la longitud en aminoácidos de los productos génicos del *cluster box* de *Azoarcus Evansii*, así como su función (demostrada o predicha) y su referencia en las bases de datos.

2. Estudios de la regulación del *cluster box* de degradación aeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

A pesar de la importancia de la ruta *box* en la degradación aeróbica de benzoato y del amplio conocimiento de su bioquímica y genética en algunas bacterias, hasta la realización de esta tesis doctoral se desconocían los mecanismos de regulación que controlan la expresión de los genes *box* (Gescher *et al.*, 2002; Schühle *et al.*, 2003; Deneff *et al.*, 2006; Eglund *et al.*, 2001). En este contexto, se decidió profundizar en la regulación del *cluster box* de *Azoarcus* sp. CIB mediante diferentes estrategias *in vivo* e *in vitro*.

2.1. Clonación y estudio de los promotores P_D y P_X

La organización génica del *cluster box* de *Azoarcus* sp. CIB revela que está constituido por, al menos, dos operones divergentes (Fig. 13). Los presuntos promotores que controlarían estos dos operones fueron llamados P_D y P_X (Fig. 14)

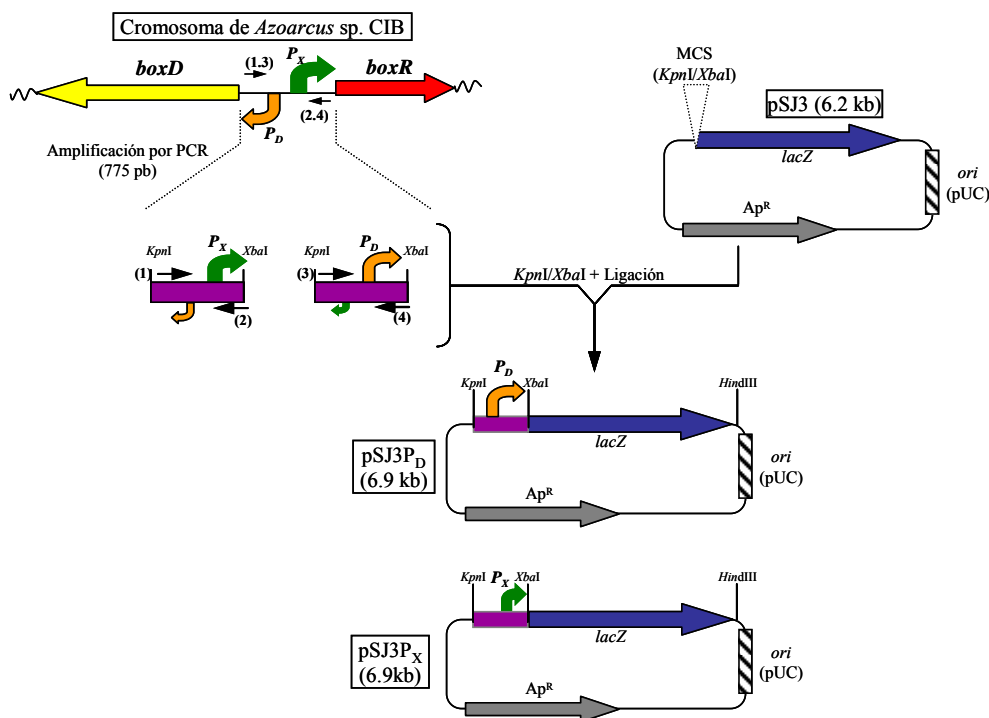


Figura 14. Esquema de la estrategia utilizada para la construcción de las fusiones traducciónales $P_D::lacZ$ y $P_X::lacZ$. La región intergénica localizada entre los genes *boxD* (flecha amarilla) y *boxR* (flecha roja) fue amplificada mediante PCR a partir de DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB. Los oligonucleótidos utilizados fueron (1) 5'pboxD, (2) 3'pboxD, (3) 5'pBoxR y (4) 3'pBoxR (Tabla xx). Estos cebadores introducen dianas de restricción *KpnI* y *XbaI* en los extremos 5' y 3' del fragmento amplificado, de tal forma que la diana *XbaI* de ambos fragmentos permite generar una fusión traducciónal de los primeros 3 nt de los genes *boxD* y *boxR* con el gen reportero *lacZ* en el vector de búsqueda de promotores pSJ3. La región intergénica clonada se representa en color morado, los promotores P_D (naranja) y P_X (verde) con flechas curvadas. *Ap^R*, muestra el gen que codifica la resistencia a ampicilina (flecha gris). El gen *lacZ* se representa con una flecha azul. El origen de replicación *ori*(pUC) se indica con rectángulos rayados.

Para caracterizar los promotores P_D y P_X se procedió inicialmente a clonar la región intergénica situada entre los genes *boxD* y *boxR* en el plásmido de búsqueda de promotores pSJ3 (Tabla 4). De esta forma se construyeron los plásmidos pSJ3P_D y pSJ3P_X, en los que la región que contiene los promotores objeto de este estudio, P_D y P_X y los primeros nucleótidos de los genes *boxD* y *boxR* quedó fusionada traduccionalmente al gen reportero *lacZ* que codifica la β -galactosidasa de *E. coli*. (Fig. 14).

Para determinar la actividad de los promotores P_D y P_X las cepas *E. coli* CC118 (pSJ3P_D) y *E. coli* CC118 (pSJ3P_X) fueron cultivadas aeróbicamente en medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono, en mitad de la fase estacional de crecimiento se analizó su actividad β -galactosidasa en la que se comprobó que ambos cultivos. Estos resultados demostraron que ambos promotores eran activos en *E. coli* y que la actividad de P_D era aproximadamente 3.5 veces superior a la de P_X (Fig. 15).

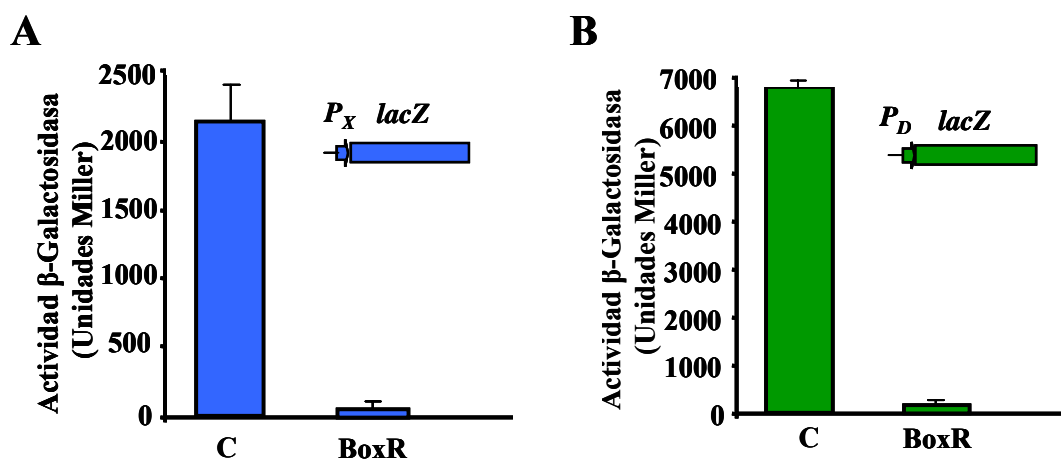


Figura 15. Actividad de los promotores P_D y P_X en *E. coli*. Actividad β -galactosidasa (en unidades Miller) en células de *E. coli* CC118 (Tabla M1) que contienen los plásmidos pSJ3P_X ($P_X::lacZ$) (barras azules) o pSJ3P_D ($P_D::lacZ$) (barras verdes) y el plásmido pCK01BoxR (BoxR) o el plásmido control pCK01 (C) (Tabla M2). Las cepas utilizadas en este experimento fueron cultivadas aeróbicamente en medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de la curva de crecimiento. Las barras muestran la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes.

Para la identificación del sitio de inicio de la transcripción de los promotores P_D y P_X se llevaron a cabo experimentos de extensión por cebador (ver apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos) a partir de RNA total extraído de células de *E. coli* CC118 (pSJ3P_D) y *E. coli* CC118 (pSJ3P_X), respectivamente.

En la figura 16, se muestra el sitio de inicio de la transcripción de los genes *boxD* y *boxR*. En ambos casos, la posición +1 de los promotores se ubica en una C, localizada

a 85 pb del codón de inicio de traducción del gen *boxD* (promotor P_D) y a 34 pb del codón de inicio de traducción del gen *boxR* (promotor P_X).

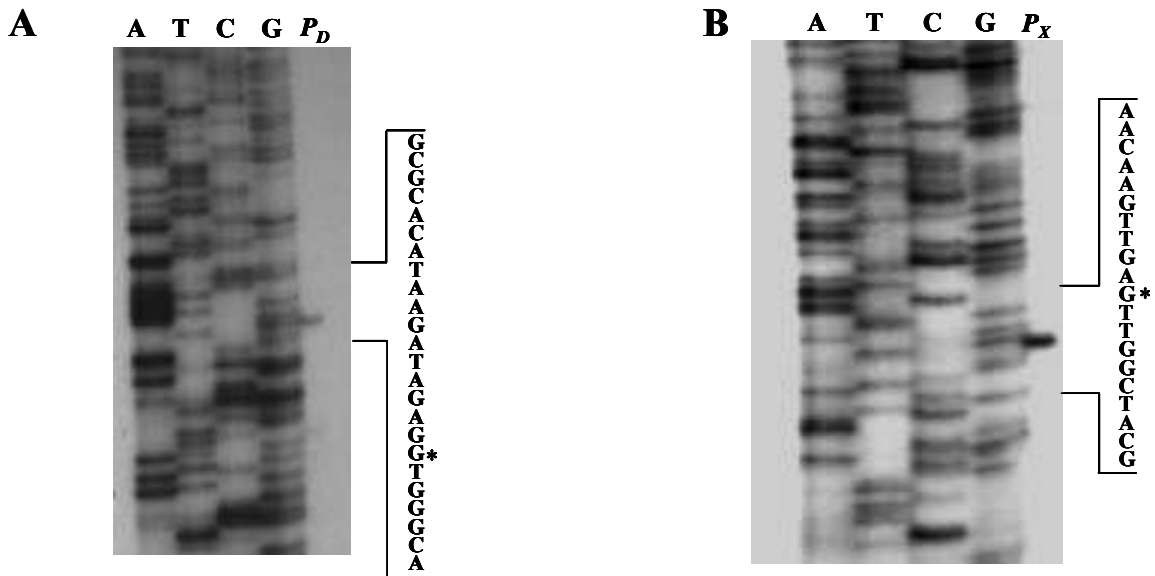


Figura 16. Determinación del sitio de inicio de la transcripción de los promotores P_D y P_X . El RNA total fue aislado de células de *E. coli* portadoras de los plásmidos pSJ3P_D ($P_D::lacZ$) o pSJ3P_X ($P_X::lacZ$) cultivadas aeróbicamente en medio LB hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, tal y como se detalla en el apartado 3.4.1 de Materiales y Métodos). El tamaño del fragmento obtenido (calles P_D y P_X) fue determinado mediante su comparación con la reacción de secuenciación de los promotores P_D (A) y P_X (B) (calles A, T, C y G). Las reacciones de extensión del cebador y las de secuenciación fueron realizadas con los oligonucleótidos 5'boxDext (A) y Lac57 (B) (Tabla 5), como se describe en el apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos. A la derecha de los gels se muestra la secuencia de nucleótidos que flanquea la posición +1 (indicada con un asterisco) en la hebra no codificante.

La identificación de los sitios de inicio de la transcripción permitió proponer las cajas -10 y -35 de interacción con la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa (Fig. 17).

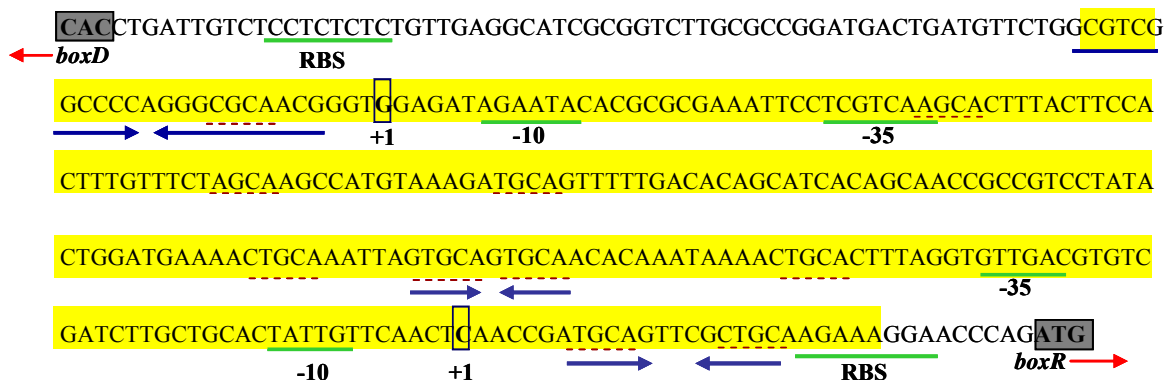


Figura 17. Secuencia de nucleótidos de la región intergénica *boxD-boxR*. Secuencia de nucleótidos comprendida entre los codones de iniciación de la traducción (gris) de los genes divergentes *boxD* (GTG) y *boxR* (ATG). Las flechas rojas señalan la dirección de la transcripción de los genes. Los sitios de inicio de la transcripción (+1) de los genes *boxD* y *boxR* se indica con un recuadro azul. Se han subrayado en verde las regiones de unión del ribosoma (RBS) y las cajas -10 y -35 correspondientes a cada promotor. Se indica con sombreado amarillo la región protegida por la proteína BoxR. Las secuencias TGC(A) de la región promotora se indican con líneas negras discontinuas y las estructuras palindrómicas con flechas convergentes.

2.2. Identificación del gen *boxR* y análisis de la secuencia de su producto génico

Una característica común de los *clusters box* presentes tanto en α -proteobacterias como en β -proteobacterias y en algunas δ -proteobacterias (Gescher *et al.*, 2002; Rather *et al.*, 2010b) es la presencia del gen *boxR*, descrito inicialmente en cepas del género *Azoarcus* (Gescher *et al.*, 2002; Rabus *et al.*, 2005) (Fig. 2). El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por dicho gen sugería que se trata de un miembro de la subfamilia BzdR de reguladores transcripcionales procariontes (Barragán *et al.*, 2005; Lopez Barragán *et al.*, 2004) y, por lo tanto, podría constituir el regulador específico del *cluster box*.

El gen *boxR* de *Azoarcus* sp. CIB codifica una proteína de 300 aminoácidos que muestra una identidad de secuencia del 47% y una organización similar a la del represor transcripcional BzdR (Fig. 18) que controla los genes *bzd* responsables de la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB (Barragán *et al.*, 2005).

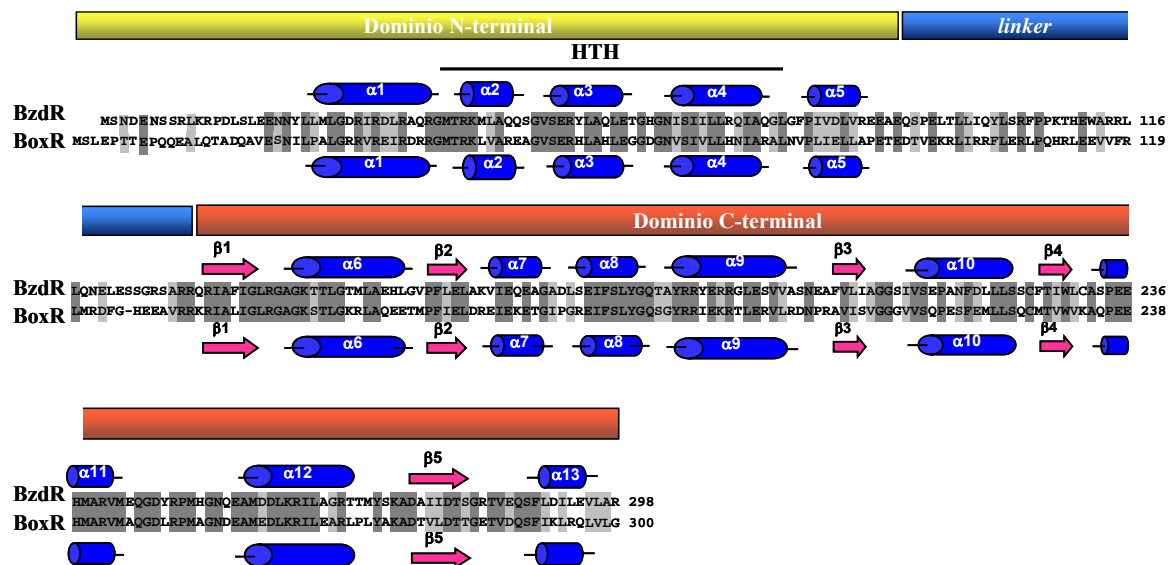


Figura 18 Comparación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas BoxR y BzdR de *Azoarcus* sp. CIB. Las secuencias de aminoácidos de BoxR (CCD33120) y BzdR (AAQ08805) fueron alineadas usando el programa de alineamiento múltiple de secuencias ClustalW. Los residuos de aminoácidos de cada secuencia se indican con el código estándar de una sola letra y han sido numerados a la derecha. En gris oscuro, se enseñan los residuos idénticos de las dos secuencias, mientras que en gris claro están indicados los residuos con similitud funcional. Las α -hélices ($\alpha 1$ a $\alpha 13$) y las hebras β ($\beta 1$ a $\beta 5$) de BzdR (superior) y BoxR (inferior) han sido representadas en azul y rosa, respectivamente. Las regiones N-terminal, linker y C-terminal de ambas proteínas están indicadas en la parte superior en amarillo, azul y rojo, respectivamente. El motivo hélice-giro-hélice (HTH) para unión al DNA está marcado en el dominio N-terminal.

La región N-terminal de BoxR (del residuo 1 al 93) contiene un motivo HTH-XRE de unión muy similar al de la proteína Cro del fago λ (Svenningsen *et al.*, 2005;

Little *et al.*, 1999). La región C-terminal de BoxR (del residuo 133 al 300) muestra una significativa identidad ($\geq 55\%$) con proteínas de la familia de las siquimato quininas. La región central de BoxR (del residuo 94 al 132) se corresponde con la región *linker* de BzdR y podría estar involucrada en la transmisión del cambio conformacional desde el dominio C-terminal de interacción con el inductor hasta el dominio N-terminal tras la interacción con la molécula efectora (Durante-Rodríguez *et al.*, 2010) (Fig. 17)

2.3. El gen *boxR* codifica el represor transcripcional específico del *cluster box*

Una vez identificado el gen *boxR*, y con el fin de determinar si estaba involucrado en la regulación de la ruta *box* de degradación aeróbica de benzoato, se llevó a cabo, inicialmente su mutación mediante interrupción insercional, generándose la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dboxR* (Tabla 3). Para la construcción de este mutante se utilizó el plásmido pKNG101*boxR* (Tabla 2) y se siguió el esquema descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Posteriormente, se monitorizó la expresión del gen catabólico *boxD* mediante RT-PCR en la cepas silvestre y en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dboxR* cultivadas aeróbicamente en presencia o en ausencia de benzoato. De esta manera, se observó que en la cepa silvestre la expresión del gen *boxD* era inducible por benzoato (Fig. 19), mientras que, al contrario, en el mutante *boxR* la expresión del gen catabólico *boxD* fue constitutiva, es decir, se produjo tanto presencia o no de benzoato en el medio de cultivo (Fig.19). Este resultado demuestra la expresión inducible por benzoato del gen *boxD* y sugiere que *boxR* codifica un represor transcripcional del *cluster box*.

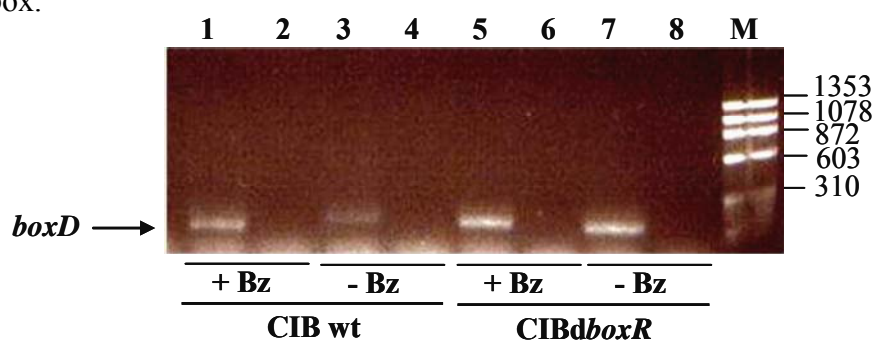


Figura 19. Estudio del producto de RT-PCR del gen *boxD* en *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIB*dboxR*. Las células de *Azoarcus* sp. CIB (CIB *wt*) y *Azoarcus* sp. CIB*dboxR* (CIB*dboxR*) utilizadas para la extracción de RNA total se cultivaron en medio MC con alanina 0.4% como fuente de carbono en presencia (+Bz) (calles 1 y 5) o ausencia (-Bz) (calles 3 y 7) de benzoato 1 mM. Las reacciones de RT-PCR se realizaron tal y como se indica en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. Se utilizó la pareja de oligonucleótidos 5'pboxdQ/3'pboxdQ (Tabla 5) para amplificar un fragmento de 153 pb del gen *boxD*. Las calles 2, 4, 6 y 8 son los controles de la reacción en los cuales la transcriptasa inversa fue excluida de la mezcla de reacción. La calle M contiene DNA del fago Φ X-174 digerido con la enzima de restricción *Hae*III, como indicador de masa molecular. En el margen derecho de la imagen se indican los tamaños de los marcadores (en pb).

Para confirmar el efecto regulador del gen *boxR* sobre el promotor P_D y para determinar su posible papel regulador sobre el promotor P_X , se amplificó y clonó el gen *boxR* como se detalla en la Figura 20. Para ello, el fragmento de DNA *Bam*HI/*Pst*I que contiene el gen *boxR* fue clonado inicialmente en el plásmido pQE32 (Tabla 4), generándose el vector de hiperexpresión pQE32- His_6 BoxR (Tabla 4), el cual fue utilizado posteriormente para hiperexpresar y purificar la proteína His_6 BoxR. El fragmento de DNA *Eco*RI/*Pst*I que contiene el gen *boxR* fue digerido a partir del plásmido pQE32- His_6 BoxR y se clonó en el plásmido de bajo número de copias pCK01 (Tabla 4), digerido con las mismas enzimas de restricción, obteniéndose el plásmido pCK01BoxR (Fig. 20) (Tabla 4).

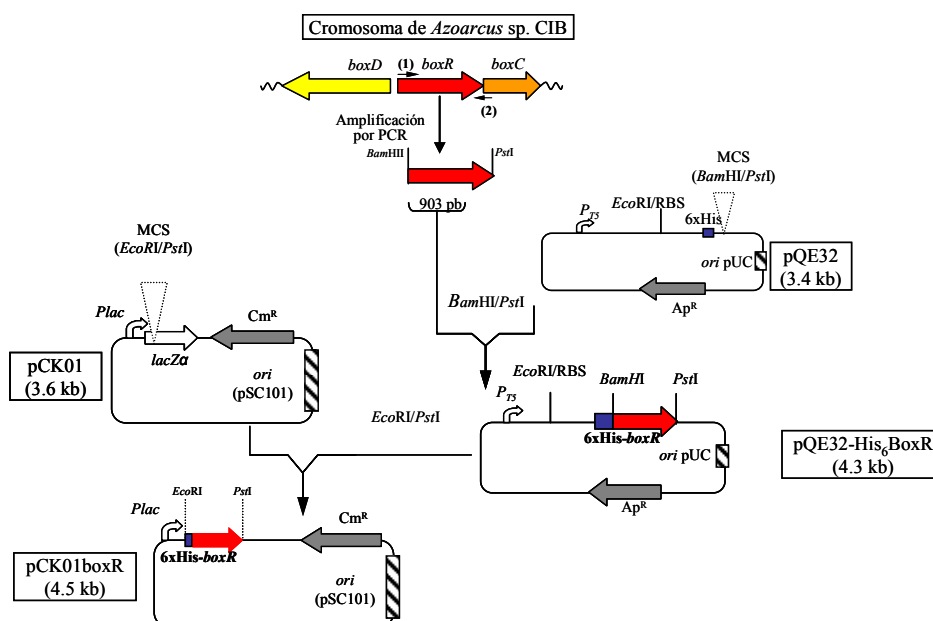


Figura 20. Representación esquemática de la clonación del gen *boxR* en los vectores de expresión pQE32 y pCK01. El gen *boxR* (representado en rojo), fue amplificado mediante PCR a partir de DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB empleando los oligonucleótidos (1) 5'Hisbox y (2) 3'Hisbox. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 5. En azul se señala la secuencia "tag" que codifica 6His. Con flechas blancas se representan los promotores P_{T5} (promotor artificial del fago T5) y *Plac* (promotor *lac*). Ap^R y Cm^R (flechas grises), indican los genes que confieren la resistencia a ampicilina y cloranfenicol, respectivamente. También se señalan los orígenes de replicación *ori* (pUC) y *ori* (pSC101), las dianas de restricción utilizadas (*Bam*HI, *Pst*I y *Eco*RI) y la región de unión del ribosoma (RBS), en el plásmido pQE32.

Cabe destacar que la actividad de ambos promotores fue reducida drásticamente en presencia del gen *boxR* tal y como muestran los bajos niveles de actividad β -galactosidasa medidos en las cepas *E. coli* CC118 (pSJ3 P_D , pCK01BoxR) y *E. coli* CC118 (pSJ3 P_X , pCK01BoxR) (Fig. 15), confirmando que el producto del gen *boxR* es un represor de los promotores P_D y P_X y que este sistema regulador es funcional en un sistema heterólogo como *E. coli*.

2.4. Hiperexpresión de la proteína BoxR

Para llevar a cabo estudios *in vitro* con la proteína BoxR era necesario disponer de un sistema óptimo de hiperexpresión y purificación de la proteína reguladora. Para ello se amplificó por PCR el gen *boxR* y se clonó sin su codón de inicio (ATG) en el plásmido pQE32 (Tabla 4), portador del promotor de origen fágico T5 que contiene dos regiones operadoras *lac* y de una secuencia “tag” que codifica 6 histidinas y permite la producción de una proteína recombinante que puede ser purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel. Con el plásmido resultante, pQE32-His6BoxR (Fig. 20), se transformó la cepa *E. coli* M15 (Tabla 3) portadora del plásmido pREP4 (Tabla 4), que produce el represor LacI, necesario para el estricto control de la expresión génica cuando se emplean promotores que contienen regiones operadoras *lac*. La proteína BoxR fue hiperproducida y purificada como se detalla en el apartado 5.2.1 de Materiales y Métodos. La masa molecular de la proteína BoxR purificada a homogeneidad electroforética (35 kDa) fue calculada mediante análisis por SDS-PAGE (Fig. 21), siendo coincidente con la masa molecular teórica calculada a partir de la secuencia de aminoácidos (35391.7 Da).

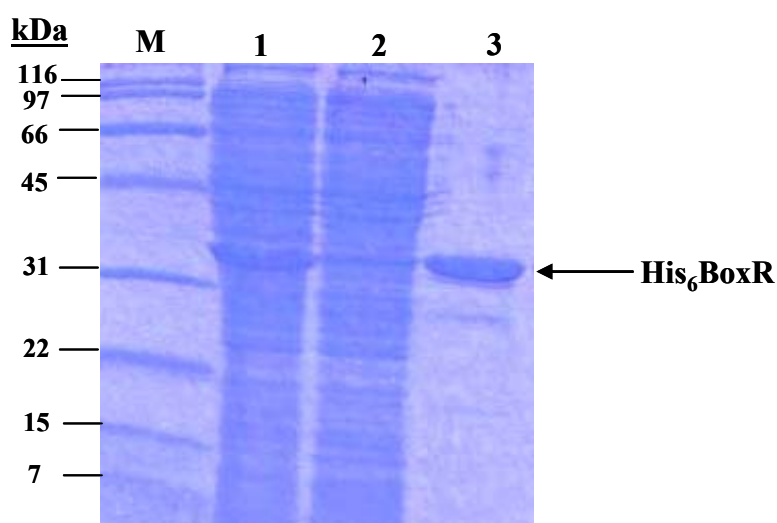


Figura 21. Hiperexpresión y purificación de la proteína His₆-BoxR a partir de extractos de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BoxR). Gel SDS-PAGE (12.5%) en el que se analizó la producción y purificación de la proteína His₆BoxR tal y como se indica en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos. La calle M corresponde a los marcadores de peso molecular *Broad Range* de Bio Rad. En el lado izquierdo de la figura, se detalla el peso molecular de las proteínas marcadas (en kDa). En la calle 1 se muestra la fracción que incluye el extracto crudo de la cepa *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BoxR). En la calle 2 se muestra la fracción soluble que contiene la proteína His₆BoxR. La calle 3 corresponde a la proteína His₆BoxR purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni (apartado 5.2.1 de Materiales y Métodos).

2.5. Caracterización *in vitro* de la interacción específica de la proteína BoxR con los promotores P_D y P_X .

La demostración de la interacción directa de la proteína BoxR con los promotores P_D y P_X se llevó a cabo inicialmente mediante ensayos de retardo en gel tal y como se indica en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. Para tal fin, no fue posible utilizar la proteína purificada, debido a su baja estabilidad y a la formación de agregados tras la purificación. Por tal motivo se utilizaron extractos celulares solubles de la cepa *E. coli* M15 (pREP4) (pQE32-His₆BoxR). Para estos experimentos se utilizó como sonda la región intergénica de DNA de 266 pb que comprendía la región intergénica desde la posición +67 hasta la posición +8 con respecto al sitio de inicio de la transcripción de los genes *boxR* y *boxD*, respectivamente (sonda boxDR) (ver apartado 7.1 de Materiales y Métodos). Como se puede ver en la Figura 22 (calles 3-5), cantidades crecientes de la proteína BoxR producen un retardo en la migración de la sonda boxDR. Por el contrario, un extracto control de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32), que no contiene la proteína BoxR, no causaba retardo en la migración de la sonda (Fig. 22, calle 2) Estos resultados demuestran que la proteína BoxR se une directamente a los promotores P_D y P_X .

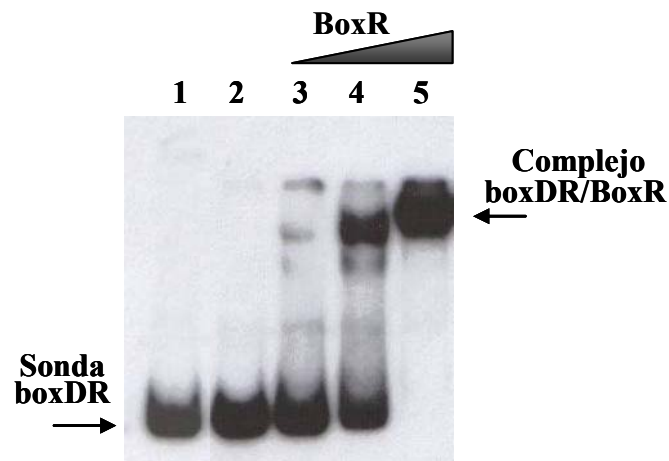


Figura 22. Interacción de la proteína BoxR con la región intergénica *boxD-boxR*. Ensayo de retardo en gel de unión de la proteína His₆BoxR con la región intergénica *boxD-boxR*. Calle 1, sonda boxDR libre; calle 2, sonda boxDR en presencia de 200 ng de extracto crudo obtenido de células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32) (extracto control). Calles 3-5, concentraciones crecientes 50, 100 y 200 ng, respectivamente, de extracto crudo obtenido a partir de células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BoxR). La sonda boxDR y el complejo boxDR/BoxR se indican con flechas.

Para comprobar la especificidad de la interacción entre la proteína BoxR con la sonda boxDR, se adicionó al ensayo de retardo en gel el fragmento de *boxDR* no marcado radiactivamente, observándose la inhibición en la unión de BoxR a la sonda

boxDR a medida que se aumentaba la cantidad de fragmento *boxDR* no marcado añadido en el ensayo (Fig. 23). Estos resultados demostraron que la interacción BoxR/*boxDR* es específica.

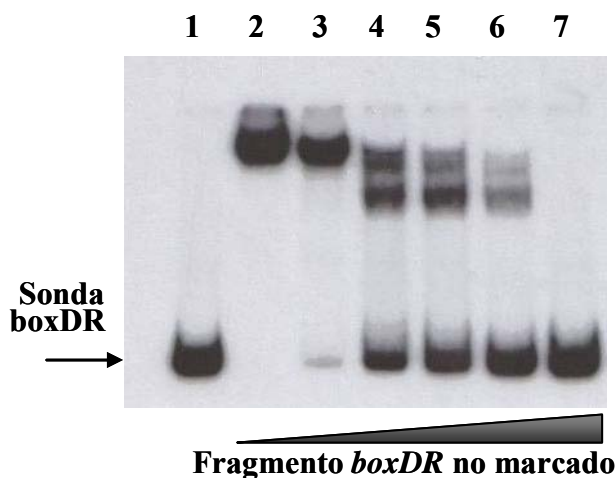


Figura 23. Especificidad de la interacción BoxR/*boxDR*. Ensayo de retardo en gel de la interacción entre la proteína His₆BoxR y la región intergénica *boxD-boxR* en presencia del fragmento *boxDR* no marcado radiactivamente. Calle 1, sonda *boxDR* libre, calles 2-7, sonda *boxDR* en presencia de 200 ng de extracto crudo obtenido a partir de células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BoxR) y 0, 5, 25, 50, 75 y 150 ng, respectivamente, de fragmento *boxDR* no marcado radioactivamente.

2.6. Identificación del benzoil-CoA como molécula inductora de los genes *box*

Tal y como se muestra en la figura 17, el dominio C-terminal de BoxR presenta una alta similitud con el dominio C-terminal de la proteína BzdR, el cual interactúa con la molécula inductora benzoil-CoA (Durante-Rodríguez *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que el benzoil-CoA también es el primer intermediario en la degradación aeróbica del benzoato (ruta *box*) (Fig. 2), se planteó que también pudiese ser la molécula inductora que, tras ser reconocida por BoxR, estuviese implicada en la activación de los genes *box*. Para confirmar esta hipótesis, se realizaron ensayos de retardo en gel con la proteína BoxR y la sonda *boxDR* en presencia de cantidades crecientes de benzoil-CoA (Fig. 24).

La adición de 2 mM de benzoil-CoA en el ensayo, inhibía por completo la formación del complejo BoxR/*boxDR* (Fig. 24, calle 5), lo cual sugiere que el benzoil-CoA impide la unión de la proteína BoxR a los promotores P_D y P_X . Para comprobar la especificidad del benzoil-CoA como inductor del sistema, se analizó la formación del complejo BoxR/*boxDR* mediante ensayos de retardo en gel en presencia de otros compuestos aromáticos como el benzoato y fenilacetil-CoA (Fig. 24, calles 6 y 7). En estos ensayos, se evidenció que a concentraciones de 2 mM ninguna de estas moléculas

era capaz de impedir la formación del complejo de retardo. Estos resultados demuestran la especificidad del benzoil-CoA como molécula inductora de los genes *box*.

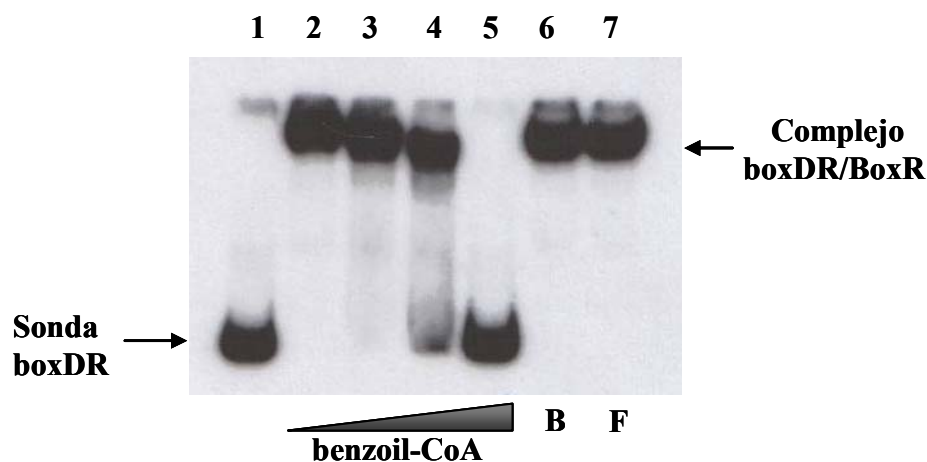


Figura 24. Estudio de la interacción entre BoxR/boxDR en presencia de benzoil-CoA y otros compuestos aromáticos. Ensayo de retardo en gel en el que se analiza la interacción de la proteína His₆-BoxR y la región boxDR en presencia de compuestos aromáticos. Calle 1, sonda boxDR libre. Calles 2-5, sonda boxDR en presencia de 200 ng de extracto crudo obtenido a partir de células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BoxR) y 0, 0,5, 1 y 2 mM de benzoil-CoA, respectivamente. Calles 6 y 7, 200 ng de extracto crudo obtenido a partir de células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BoxR) en presencia de 2 mM de benzoato (B) y fenilacetil-CoA (F), respectivamente. Se indican con flechas la sonda boxDR y el complejo boxDR/BoxR

2.7. Identificación de los sitios de unión de la proteína BoxR a los promotores P_D y P_X .

Para determinar los sitios de unión de la proteína BoxR en los promotores P_D y P_X se llevaron a cabo ensayos de *footprinting* con DNasa I (ver apartado 7.3 de Materiales y Métodos). Como se puede observar en la figura 25, la proteína BoxR genera una huella de protección frente a la digestión por la DNasa I que se extiende por toda la región intergénica *boxD-boxR*. Cabe destacar que la unión de BoxR induce cambios en la estructura del DNA tal y como revela la aparición de bandas de hipersensibilidad a la digestión con la DNasa I a medida que se incrementa la concentración de BoxR en el ensayo (Fig. 25).

La región protegida por la proteína BoxR en los promotores P_D y P_X abarca tanto los sitios de inicio de la transcripción como las secuencias -10 y -35 de interacción con la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa, lo cual estaría de acuerdo con el papel represor de BoxR sobre ambos promotores. Las regiones de protección contienen repeticiones directas TGC(A), secuencia que en algunos casos se presenta formando parte de estructuras palindrómicas más largas (Figuras 17 y 25), al igual que se ha descrito previamente para el represor BzdR que controla la expresión de la ruta anaeróbica *bzd* de degradación del benzoato (Barragán *et al.*, 2005).

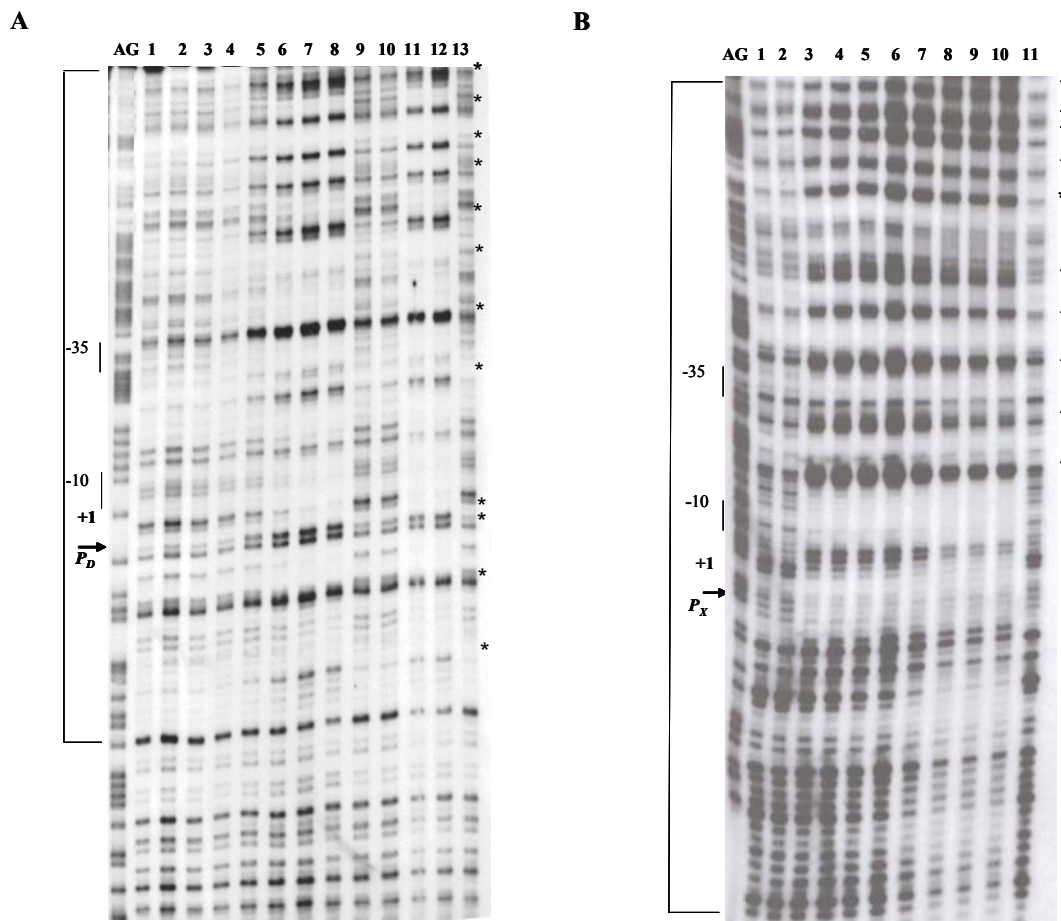


Figura 25. Ensayo de protección frente a la digestión por DNasa I de la proteína BoxR en los promotores P_D y P_X . Los experimentos de footprinting con DNasa I se llevaron a cabo usando fragmentos de la región intergénica *boxD-boxR* marcados en los extremos *boxD* (A) y *boxR* (B). En las calles marcadas como AG se han cargado las correspondientes reacciones de secuenciación de las sondas llevadas a cabo según el método de Maxam y Gilbert, 1980. **A)** Las calles 1 y 13 muestran reacciones de footprinting en presencia de 1600 ng de extracto crudo, obtenido a partir de células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32) (Extracto control). Las calles 2 a 8 corresponden a cantidades de 25, 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 ng de extracto crudo que contienen la proteína His₆BoxR obtenido a partir de células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BoxR), respectivamente. Las calles 9 y 10 corresponden a cantidades de 400 y 800 ng, respectivamente, de extracto crudo que contiene la proteína His₆BoxR y 2 mM de benzoil-CoA. Las calles 11 y 12 muestran reacciones de footprinting correspondientes a 400 ng de extracto crudo que contiene la proteína His₆BoxR y 2 mM de benzoato y fenilacetil-CoA, respectivamente. **B)** La calle 1, corresponde a 1600 ng del extracto crudo control. Las calles 2 a 8, contienen 25, 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 ng de extracto crudo que contiene la proteína His₆BoxR, respectivamente. Las calles 9 a 11, contienen 1600 ng de proteína His₆BoxR presente en extractos crudos y 2 mM de benzoato, fenilacetil-CoA o benzoil-CoA, respectivamente. Las regiones de protección están indicadas en corchetes y las bandas de hipersensibilidad a la actividad de la DNasa I se indican con asteriscos. También se muestran las cajas -10 y -35 de unión a la RNA polimerasa además de los sitios de inicio de la transcripción (+1) de los promotores P_D y P_X .

Por otro lado, en los ensayos de footprinting (Fig. 25, Panel A, calles 9 y 10 y 24B, calle 11) también se comprobó que la adición de benzoil-CoA impedía la protección específica de BoxR a las regiones operadoras tanto de P_D como de P_X . En contraste, la adición de otros análogos del benzoil-CoA, tales como el fenilacetil-CoA o benzoato no afectaban la unión de BoxR a la región intergénica *boxD-boxR* (Fig. 25,

Panel A, calles 11 y 12 y Fig. 24B, calles 9 y 10). Estos resultados ratificaron los obtenidos en los experimentos de retardo en gel (Fig. 24), y permiten sugerir que el benzoil-CoA es la molécula inductora que interactúa con el represor BoxR, impidiendo su unión a los promotores que controlan la expresión de los genes *box* cuando *Azoarcus* sp. CIB crece en benzoato.

3. Estudio del papel del oxígeno en la expresión de los genes del *cluster box*

Como se ha indicado en el apartado 3.2 de la Introducción, además de la regulación específica, existe un control adicional que coordina la inducción de los *clusters* de catabolismo aromático en bacterias con los cambios físico-químicos y nutricionales en el ambiente (Carmona *et al.*, 2009; Shingler, 2003; Cases y de Lorenzo, 2005; Rojo, 2010). Teniendo en cuenta que *Azoarcus* sp. CIB es un organismo anaerobio facultativo, la disponibilidad de oxígeno puede jugar un papel muy importante en el control de la expresión de estas vías metabólicas.

3.1. Expresión de los genes *boxR* y *boxD* en presencia o ausencia de oxígeno en *Azoarcus* sp. CIB

Para determinar si el oxígeno también controlaba la expresión de los genes *box* en *Azoarcus* sp. CIB, se llevó a cabo un análisis mediante RT-PCR a tiempo real de la expresión de los genes *boxD* y *boxR* cuando las células fueron cultivadas en benzoato en presencia o ausencia de oxígeno.

Como se puede observar en la Fig. 26, el oxígeno no es un factor determinante en la expresión de los genes *boxR* y *boxD*. Así, la expresión del gen *boxD* es cuatro veces más elevada en condiciones de crecimiento anaeróbicas que en células creciendo aeróbicamente, por otro lado, el gen *boxR* mostró niveles de expresión muy similares en ambas condiciones de crecimiento. Este resultado sugiere que los genes *box* que codifican una ruta aeróbica de degradación de benzoato, también estarían activos en presencia de benzoato y en ausencia de oxígeno en el medio.

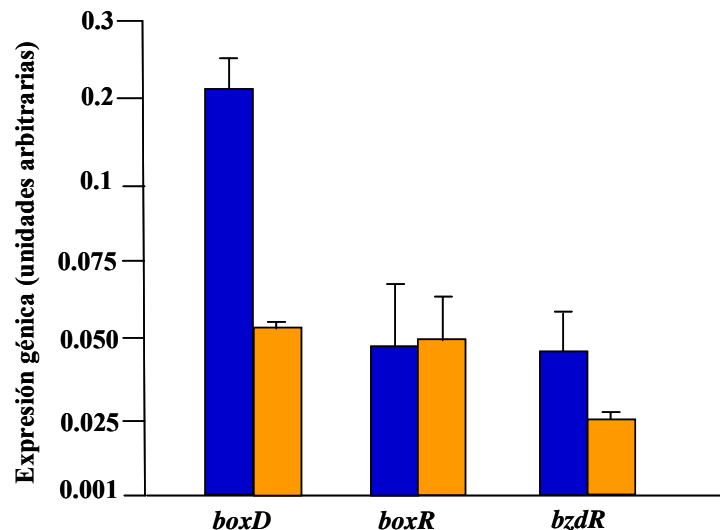


Figura 26. Expresión de los genes *boxD*, *boxR* y *bzdR* en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. A partir de células de *Azoarcus* sp. CIB creciendo en presencia (barras naranjas) o ausencia (barras azules), se extrajo RNA total y se midió por RT-PCR a tiempo real la expresión de los genes *boxD*, *boxR* y *bzdR* tal y como se indica en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. La expresión relativa de los genes se muestra en unidades arbitrarias. Se indica la desviación estándar correspondiente a los resultados de tres experimentos independientes.

3.2. Actividad de los promotores P_X y P_D en condiciones anaeróbicas en *E. coli*.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en *Azoarcus* sp. CIB, se procedió a analizar el efecto del oxígeno en la actividad de los promotores P_D y P_X en un huésped heterólogo como es *E. coli*.

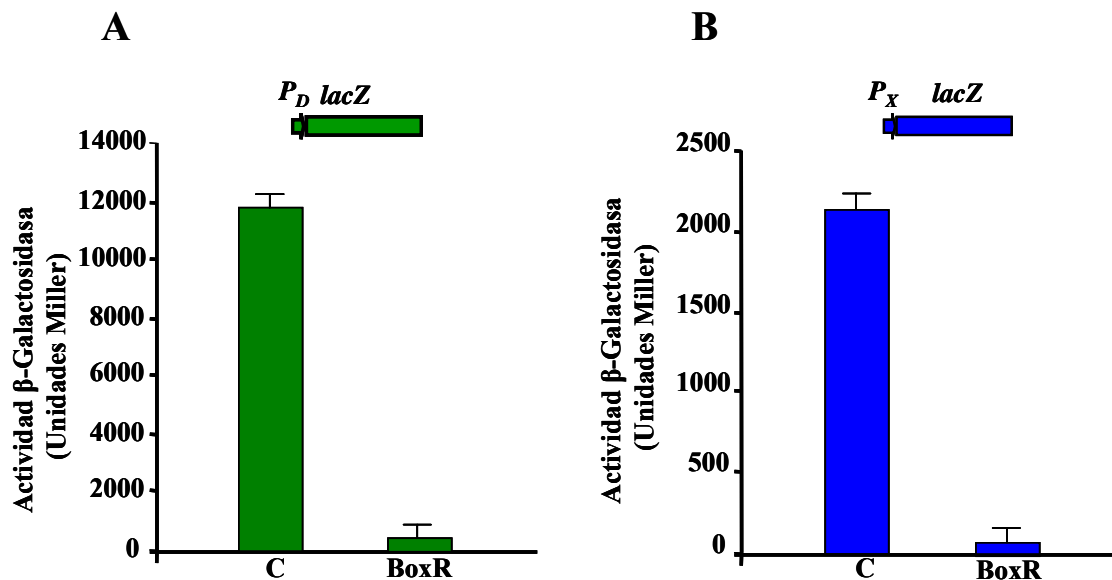


Figura 27. BoxR es un represor de los promotores P_D y P_X en *E. coli* cultivada anaeróbicamente. Actividad β -galactosidasa (en unidades Miller) en células de *E. coli* CC118 que contienen los plásmidos pSJ3 P_X ($P_X::lacZ$) (barras azules) o pSJ3 P_D ($P_D::lacZ$) (barras verdes) y el plásmido pCK01BoxR (BoxR) o el plásmido control pCK01 (C). Las cepas utilizadas en este experimento fueron cultivadas anaeróbicamente en medio mínimo M63 con glicerol 30 mM como única fuente de carbono hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de la curva de crecimiento. La actividad β -galactosidasa se determinó como se indica en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. Se indica la desviación estándar de los resultados correspondientes a tres experimentos independientes.

Para ello, se utilizaron las cepas *E. coli* CC118 (pSJ3P_D, pCK01BoxR) y *E. coli* CC118 (pSJ3P_X, pCK01BoxR) que expresan las fusiones traduccionales P_D::*lacZ* y P_X::*lacZ*, respectivamente y la proteína represora BoxR. Tal y como se había observado previamente en condiciones de crecimiento aeróbicas (Fig. 15), tanto P_D como P_X eran activos en ausencia de oxígeno, y además su actividad era eficientemente reprimida por el producto del gen *boxR* (Fig. 27)

3.3. Efecto del gen *bclA* en la inducción de la degradación anaeróbica del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Con el fin de profundizar en el posible papel de la expresión en anaerobiosis de los genes *box* y dado que el benzoil-CoA, producto de la reacción catalizada por la enzima BclA (Fig. 2), es también el inductor y el primer intermediario de la ruta anaeróbica *bzd*, una mutación del gen *bclA* (Fig. 13), que codifica la benzoato-CoA ligasa de la ruta aeróbica *box*, podría afectar el crecimiento anaeróbico en benzoato como consecuencia de una menor disponibilidad del inductor benzoil-CoA. Para confirmar esta hipótesis, se comparó la curva de crecimiento de la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB con la del mutante *Azoarcus* sp. CIB*dbclA* (Tabla 3), en medio mínimo conteniendo benzoato como fuente de carbono en condiciones anaeróbicas. Aunque ambas cepas fueron capaces de crecer anaeróbicamente en benzoato, se observó que la cepa mutante presentaba una fase de latencia incrementada unas 10 horas con respecto a la cepa silvestre (Fig. 28).

Estos resultados sugieren que el producto del gen *bclA* facilita la inducción de la degradación anaeróbica de benzoato (genes *bzd*).

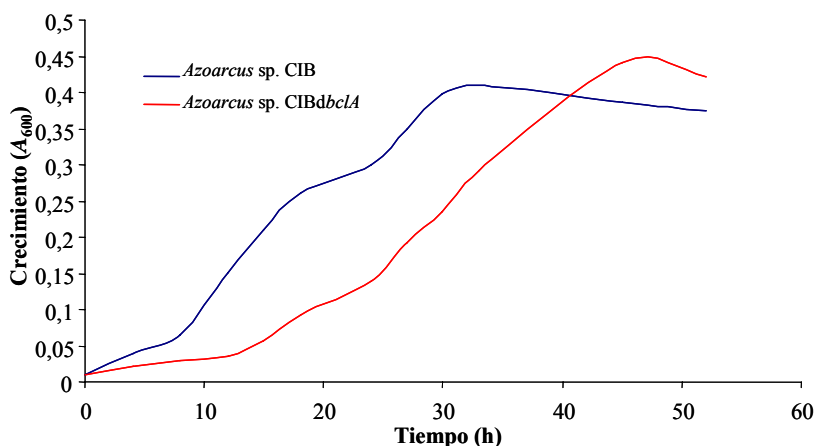


Figura 28. Crecimiento anaeróbico en benzoato de las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIB*dbclA*. Se valoró el incremento de absorbancia a 600 nm (A_{600}) de la cepa silvestre *Azoarcus* sp. CIB (línea azul) y la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dbclA* (línea roja) cultivadas anaeróbicamente en medio mínimo MC, a 30°C, con benzoato 3mM como única fuente de carbono.

4. Regulación cruzada entre la ruta aeróbica *box* y la ruta anaeróbica *bzd* de degradación de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Como se ha señalado anteriormente, el gen *boxR* se expresa tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas en *Azoarcus* sp. CIB. De igual manera, el gen *bzdR* que codifica el regulador transcripcional de los genes anaeróbicos *bzd* también se expresa independientemente de la presencia o ausencia de oxígeno a unos niveles que no difieren significativamente a los del gen *boxR* (Fig. 26). De igual manera el gen *bzdR*, que codifica el regulador transcripcional de los genes anaeróbicos *bzd*, también se expresa independientemente de la presencia o ausencia de oxígeno a unos niveles que no difieren significativamente a los del gen *boxR* (Fig. 26). Estos resultados permiten sugerir que podría haber una regulación transcripcional cruzada mediada por los reguladores/promotores específicos de las rutas de degradación aeróbica y anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB.

4.1. Estudios *in vitro* de la interacción entre **BoxR/ P_N** y entre **BzdR/ P_X** y **BzdR/ P_D**

Para demostrar experimentalmente que los reguladores BoxR y BzdR eran capaces de interactuar directamente con el promotor P_N del *cluster* anaeróbico *bzd* y con los promotores P_X y P_D del *cluster* aeróbico *box*, respectivamente, se llevó a cabo un estudio *in vitro* de interacción proteína/DNA mediante ensayos de retardo en gel. En la Figura 29, Panel A, se muestra como el regulador BoxR se une al promotor anaeróbico P_N (sonda P_N) de forma dependiente de la concentración y con una eficiencia muy similar a la observada en las interacciones con la sonda boxDR del *cluster* aeróbico (Fig. 22). Con estos ensayos, también se comprobó la especificidad de la unión, al ver que un extracto control de la cepa de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32) (Fig 28, Panel A, calle C) no retardaba la migración de la sonda P_N .

Por otro lado, para ver la interacción del regulador BzdR con los promotores P_X y P_D , se utilizaron extractos de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32His₆BzdR) (Barragán *et al.*, 2005) que hiperproducen la proteína BzdR. Mediante experimentos de retardo en gel, se comprobó que BzdR retardaba la migración de la sonda boxDR (Fig. 29, Panel B), con la misma eficiencia que lo hacía con su correspondiente sonda P_N (Fig. 29, Panel C).

Estos resultados indican que las proteínas BoxR y BzdR se unen eficientemente a sus promotores heterólogos P_N y P_X/P_D , respectivamente, sugiriendo que ambos

reguladores podrían actuar como represores tanto de la ruta aeróbica *box* como de la ruta anaeróbica *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB

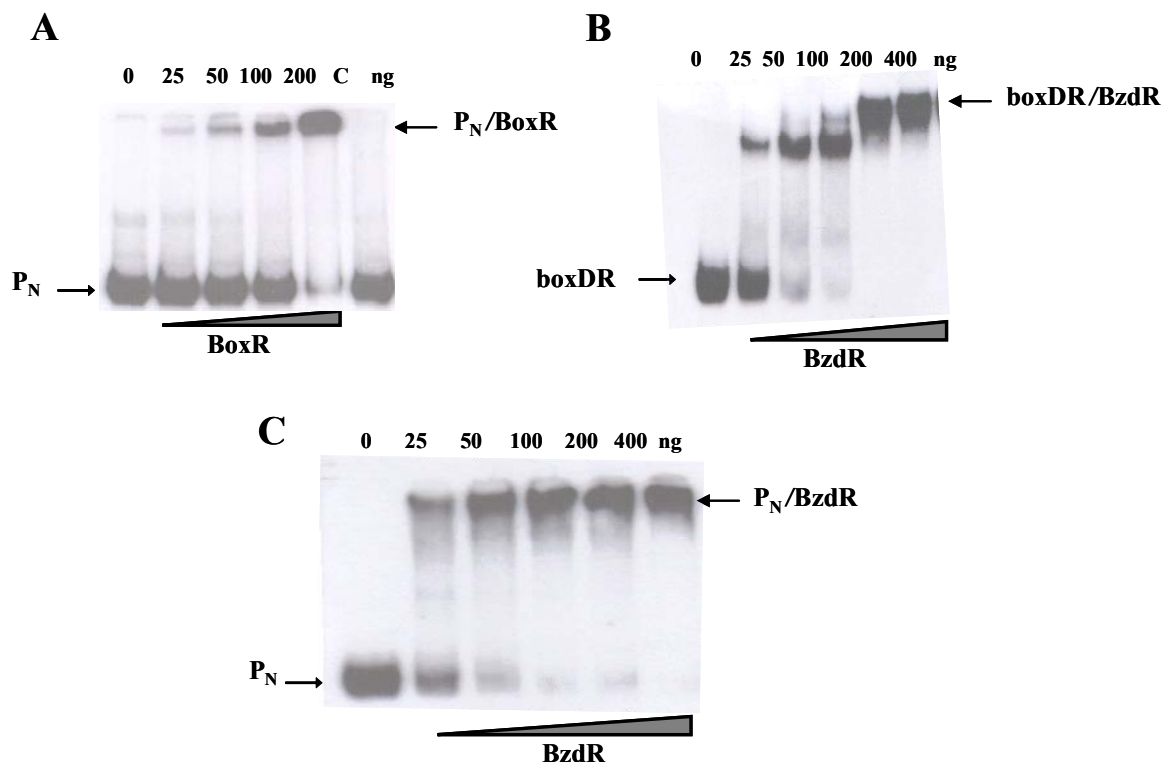


Figura 29. Interacción entre BoxR y P_N , y entre BzdR y los promotores P_D y P_X . Ensayos de retardo en gel de la unión de las proteínas His₆BoxR al promotor P_N (A) His₆BzdR a la región intergénica *boxD-boxR* (B) y al promotor P_N (C). Se utilizaron las sondas que se indican con flechas negras una concentración creciente de extracto crudo de células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32His₆-BoxR) (A) o de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32His₆-BzdR) (B) y (C), tal y como se indica en el apartado 7.2 Materiales y Métodos. Se muestran los complejos de interacción formados. La calle C (A), se corresponde con un extracto control (200 ng) de la cepa de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32).

4.2. Estudios *in vivo* en *E. coli* de la interacción entre BoxR/ P_N y entre BzdR/ P_X y BzdR/ P_D

Para confirmar los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* mostrados en el apartado anterior, se monitorizó la actividad de los promotores P_N , P_X y P_D en cepas recombinantes de *E. coli* que contienen las fusiones traduccionales $P_N::lacZ$, $P_X::lacZ$ y $P_D::lacZ$, respectivamente, en presencia o ausencia de los genes *boxR* o *bzdR*. Para tal fin, la cepa *E. coli* AFMCP_N, que contiene una fusión traduccional $P_N::lacZ$ insertada en su cromosoma (Tabla 3), fue transformada de forma independiente con los plásmidos pCK01BoxR (expresa BoxR), pCK01BzdR (expresa BzdR) o el plásmido control pCK01 (Tabla 4). Por otra parte, la cepa *E. coli* CC118 que contiene los plásmidos pSJ3P_X ($P_X::lacZ$) o pSJ3P_D ($P_D::lacZ$) (Tabla 4), fue también transformada con los plásmidos pCK01BzdR o el plásmido control pCK01. Las cepas derivadas *E. coli*

AFMCPN fueron cultivadas en ausencia de oxígeno mientras que las cepas derivadas de *E. coli* CC118 se cultivaron aeróbicamente. La actividad de los promotores fue monitorizada midiendo los niveles de actividad β -galactosidasa.

Como se puede ver en la figura 30, Panel A, bajo condiciones anaeróbicas la actividad del promotor P_N disminuía unas 14 veces tanto en presencia del regulador específico BzdR como del regulador aeróbico BoxR, demostrando así que BoxR ejerce una función represora del promotor P_N de igual manera a como lo hace el regulador anaeróbico BzdR.

De igual manera, bajo condiciones de crecimiento aeróbicas, el regulador transcripcional anaeróbico BzdR fue capaz de inhibir la actividad de los promotores P_X (Fig.30, Panel B) y P_D (Fig.30, PanelC), de forma equivalente a como se había observado previamente con su represor específico BoxR (Fig. 15).

Todos estos resultados indicaron que los reguladores transcripcionales BoxR y BzdR reprimían con la misma eficiencia tanto el promotor P_N como los promotores P_D y P_X , respectivamente y que por lo tanto, podrían actuar sinérgicamente controlando la expresión de los clusters *box* y *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB

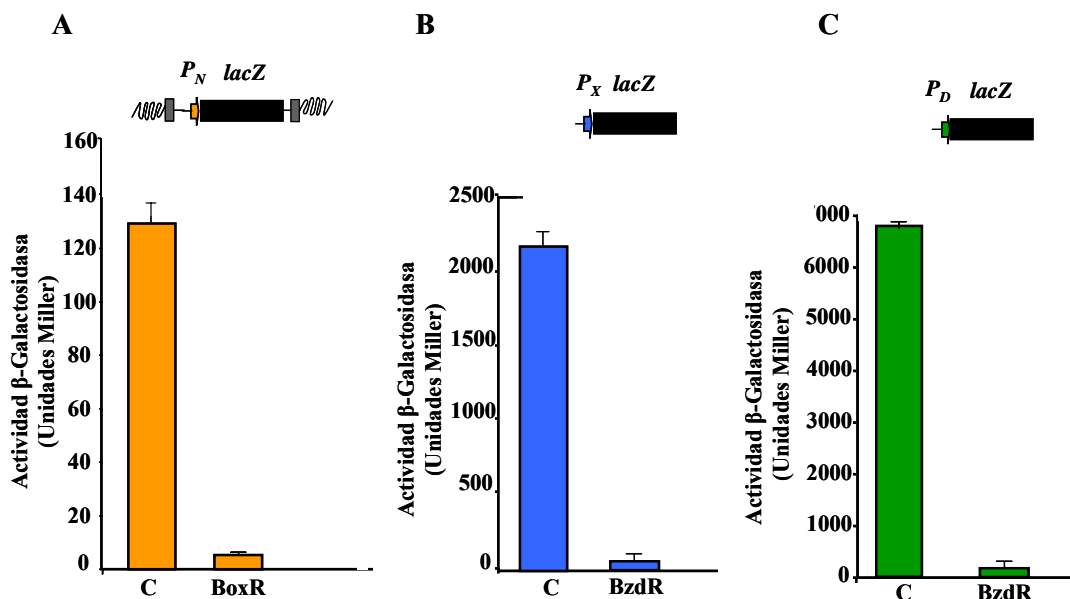


Figura 30. Control de los promotores P_N , P_D y P_X por las proteínas BoxR y BzdR en *E. coli*. Los paneles A, B y C, muestran la expresión de las fusiones traducciónales $P_N::lacZ$, $P_X::lacZ$ y $P_D::lacZ$, respectivamente. **A)** Células de *E. coli* AFMCPN que contienen la fusión traducciónal $P_N::lacZ$ insertada en su cromosoma, transformadas con los plásmidos pCK01BoxR (BoxR), pCK01BzdR (BzdR) o el plásmido control pCK01 (C), creciendo anaerómicamente en medio mínimo M63 con glicerol 20 mM como fuente de carbono. **B) y C)** Células de *E. coli* CC118 (pSJ3P_X) ($P_X::lacZ$) y *E. coli* CC118 (pSJ3P_D) ($P_D::lacZ$), respectivamente, transformadas con los plásmidos pCK01BzdR (BzdR) o el plásmido control pCK01 (C), creciendo aerómicamente en medio mínimo M63 con glicerol 20 mM. Los valores de actividad β -galactosidasa (en unidades Miller) fueron determinados cuando los cultivos alcanzaron la mitad de la fase exponencial de crecimiento, tal y como se indica en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. Se indican las desviaciones estándar de los resultados correspondientes a tres experimentos independientes.

4.3. Papel de los reguladores BoxR y BzdR sobre los promotores P_N y P_D/P_X en *Azoarcus* sp. CIB.

Teniendo en cuenta que los experimentos mostrados en el apartado anterior fueron hechos en un huésped heterólogo y, en algunos casos, en niveles de multicopia, nos propusimos confirmar la regulación cruzada de los reguladores BoxR y BzdR y los promotores catabólicos P_N y P_D en la propia cepa *Azoarcus* sp. CIB. Para este fin, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR a tiempo real de la expresión del gen *bzdN*, del *cluster* de degradación anaeróbica de benzoato, y del gen *boxD*, del *cluster* de degradación aeróbica en las cepa silvestre *Azoarcus* sp. CIB y en las cepas mutantes *Azoarcus* sp. CIBdboxR (Tabla 3), la cepa *Azoarcus* sp. CIBdbzdR (Tabla 3), y la cepa *Azoarcus* sp. CIBdboxRbzdR (Tabla M1), un doble mutante cuyos genes *boxR* y *bzdR* fueron interrumpidos mediante inserción según se detalla en el apartado 4.2.2 de Materiales y Métodos, cultivadas anaeróticamente en medio MA con alanina como única fuente de carbono.

En la cepa doble mutante *Azoarcus* sp. CIBdboxRbzdR la actividad de los promotores P_N y P_D en condiciones de no inducción (crecimiento en alanina) fue muy similar a la mostrada por la cepa silvestre creciendo en condiciones de inducción (crecimiento en benzoato), y aproximadamente dos órdenes de magnitud superior a la actividad mostrada por la cepa silvestre creciendo en alanina (Fig. 31). Este resultado confirmó que BoxR y BzdR controlan de forma eficiente la represión de los dos promotores catabólicos en *Azoarcus* sp. CIB. Sin embargo, mientras que en la cepa *Azoarcus* sp. CIBdboxR la actividad de P_N fue reprimida eficientemente por BzdR, siendo esta represión de dos órdenes de magnitud, la actividad de P_N en la cepa *Azoarcus* sp. CIBdbzdR fue la mitad del máximo alcanzado en la cepa doble mutante *Azoarcus* sp. CIBdboxRbzdR (Fig 31). Indicando que el control de P_N por el regulador BoxR no es tan eficaz como el mediado por la proteína BzdR.

Por otro lado, aunque los niveles de actividad del promotor P_D se incrementan significativamente en la cepa *Azoarcus* sp. CIBdboxR con relación a la cepa parental, en la cepa *Azoarcus* sp. CIBdbzdR los niveles de actividad de P_D sugieren que BzdR contribuye en un factor de unas 10 veces al control de la represión de P_D (Fig. 31), indicando que tanto BzdR como BoxR median el control de la expresión del promotor P_D en *Azoarcus* sp. CIB.

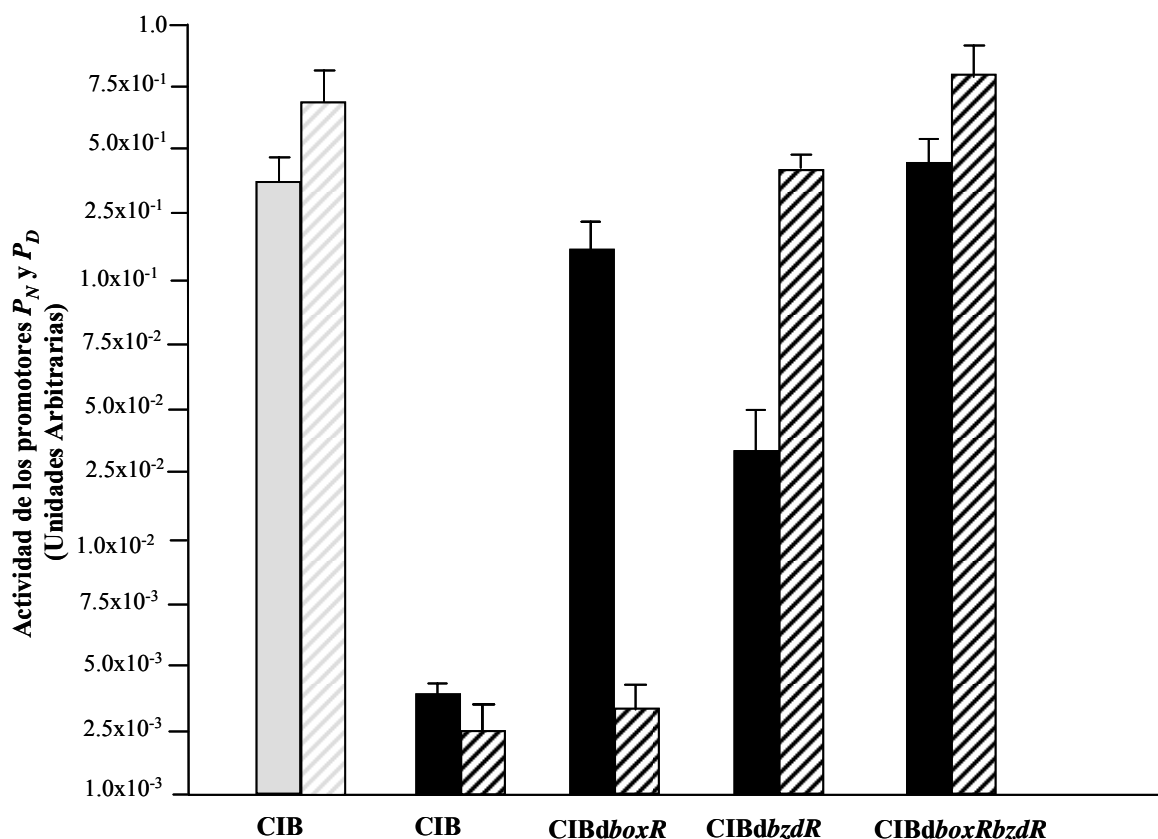


Figura 31. Efecto sinérgico de BzdR y BoxR sobre la actividad de los promotores P_D y P_N . Las células de *Azoarcus* sp. CIB (CIB), *Azoarcus* sp. CIBdboxR (CIBdboxR), *Azoarcus* sp. CIBdbzdR (CIBdbzdR) y *Azoarcus* sp. CIBdboxRbzdR (CIBdboxRbzdR), fueron cultivadas anaeróbicamente en benzoato 3mM (barras grises) o en alanina 0,4% (barras negras) hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Se extrajo RNA total y se midió por RT-PCR a tiempo real la actividad de los promotores P_N (barras rayadas) y P_D (barras lisas) tal y como se detalla en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. La actividad relativa de los promotores se muestra en unidades arbitrarias. Se presentan las desviaciones estándar que corresponden con los resultados de tres experimentos independientes.

4.4. Estudio comparativo de la viabilidad de las cepas *Azoarcus* sp. CIB, CIBdboxR, CIBdbzdR y CIBdboxRbzdR en medio no selectivo

Las proteínas BoxR y BzdR de *Azoarcus* sp. CIB son ortólogos, ambas responden al mismo inductor, el benzoil-CoA, y pueden reconocer la misma secuencia en los promotores. Esta aparente redundancia genética planteó la hipótesis de si la existencia de una copia de los genes *boxR* y *bzdR* en el cromosoma de *Azoarcus* sp. CIB podría favorecer la supervivencia de la bacteria en condiciones de crecimiento en las que las células no metabolizan benzoato. Para comprobar esta hipótesis, se comparó la viabilidad de la cepa silvestre *Azoarcus* sp. CIB con la de las cepas mutantes *Azoarcus* sp. CIBdboxR y *Azoarcus* sp. CIBdbzdR y la cepa doble mutante *Azoarcus* sp. CIBdboxRbzdR, cultivadas en fuentes de carbono no aromáticas (glutarato) y bajo condiciones no óptimas de crecimiento (medio sólido).

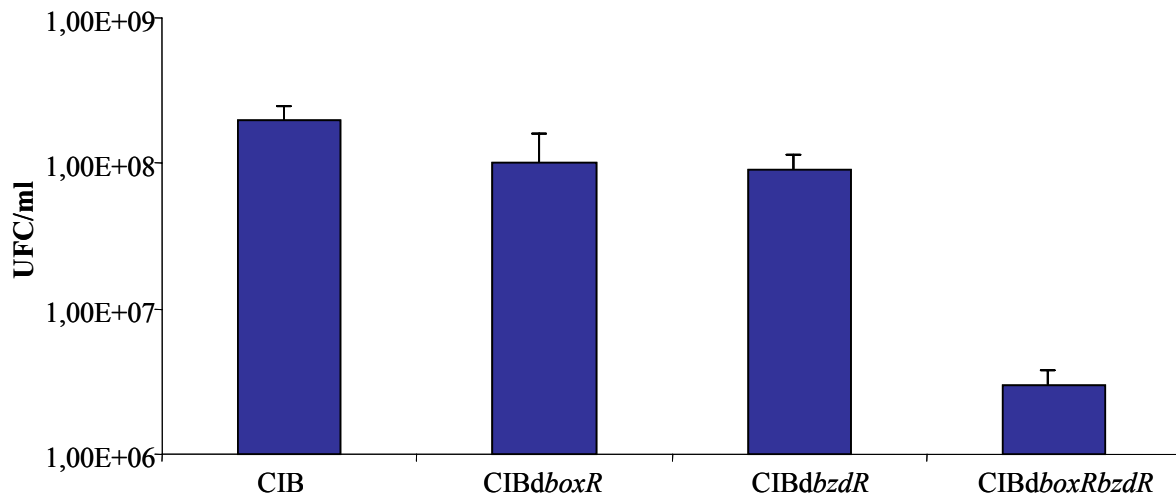


Figura 32. Efecto de los genes *boxR* y *bzdR* sobre la viabilidad celular de diferentes cepas de *Azoarcus* sp. CIB. Las cepas *Azoarcus* sp. CIB (CIB), *Azoarcus* sp. CIBdboxR (CIBdboxR), *Azoarcus* sp. CIBdbzdR (CIBdbzdR) y *Azoarcus* sp. CIBdboxRbzdR (CIBdboxRbzdR) fueron cultivadas en medio MC líquido con glutarato 10 mM como única fuente de carbono hasta alcanzar una densidad óptica de 0,1. Finalmente fueron plaqueadas en medio MC sólido con glutarato 10 mM. Las placas fueron incubadas durante 72 h a 30°C, tiempo tras el cual se procedió al recuento de células viables (UFC/ml). Se muestran las desviaciones estándar de los resultados de tres experimentos independientes

Como se puede observar en la figura 32, se produce una disminución de la viabilidad celular en la cepa doble mutante *boxR/bzdR* de cerca de dos órdenes de magnitud comparando con los niveles de viabilidad obtenidos para la cepa silvestre. Por otro lado, aunque en las cepas mutantes *Azoarcus* sp. CIBdboxR y *Azoarcus* sp. CIBdbzdR la viabilidad celular disminuyó a la mitad en relación con la de la cepa silvestre, el descenso no fue tan significativo como el observado en el doble mutante. Estas observaciones permiten sugerir que la presencia de ambos genes *boxR* y *bzdR* en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB contribuye a la viabilidad celular, reduciendo la expresión basal de los genes *box* y *bzd* en ausencia de benzoato y constituyendo por ello una ventaja adaptativa para la bacteria cuando se enfrenta a condiciones de cultivo que no implican al benzoato.

5. Estudios sobre la regulación sobreimpuesta mediada por fuentes de carbono en la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Como se ha indicado en la Introducción, la regulación de los genes de la ruta *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB, es uno de los sistemas de regulación transcripcional mejor estudiados en el catabolismo anaerobio de los compuestos aromáticos. Esta regulación, tiene lugar a dos niveles. El primer nivel de regulación lo constituye la regulación específica, mediada por los represores transcripcionales BzdR y en menor medida BoxR (Barragán *et al.*, 2005; Durante Rodríguez *et al.*, 2010; Apartado 3 de esta tesis). Un segundo nivel de regulación que controla y modula al anterior lo constituye la regulación sobreimpuesta. Dentro de la regulación sobreimpuesta se ha estudiado la dependiente de oxígeno que está mediada por el regulador transcripcional AcpR que activa la expresión de los genes *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB (Ver apartado 2.2.1 de la Introducción) (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha descrito que el promotor P_N está sometido a una regulación mediada por la capacidad selectiva de la bacteria de asimilar fuentes de carbono preferenciales (López-Barragán *et al.*, 2004), fenómeno conocido como represión catabólica por fuente de carbono (CCR) (Rojo, 2010). Con el propósito de conocer y entender los mecanismos genéticos y moleculares que controlan la CCR en la expresión de los genes *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB, se realizaron los abordajes experimentales que se detallan a continuación.

5.1. Identificación del sistema regulador de dos componentes AccSR, presuntamente implicado en la CCR en *Azoarcus* sp. CIB

La CCR es un complejo sistema de regulación mediado frecuentemente por diferentes mecanismos, los cuales han sido extensamente estudiados en enterobacterias y firmicutes y en menor medida, en bacterias del género *Pseudomonas* (Fujita, 2009; Rojo, 2010; Gorke y Stulke, 2008; Deutscher, 2008). Por otro lado, aunque en β -proteobacterias se conoce muy poco acerca de los genes y los mecanismos que controlan la CCR, recientemente se ha postulado que en *Acidovorax* sp. KKS102 el gen *bphQ* está implicado en el control de la CCR en la expresión del operón *bph*, cuyos genes codifican las enzimas implicadas en la degradación de policlorobifenilos/bifenilos. El gen *bphQ* codifica el regulador de respuesta del sistema regulador de dos componentes BphPQ (Ohtsubo *et al.*, 2006). Un análisis de la secuencia del genoma de *Azoarcus* sp. CIB, reveló la existencia de dos genes (*accSR*)

cuyos productos muestran similitud con las proteínas BphPQ de *Acidovorax* sp. KKS102.

El gen *accR* (*a*romatic *c*atabolic *c*arbon *r*egulator) codifica un presunto regulador de respuesta (RR) de 212 aminoácidos, cuya secuencia presenta una significativa identidad ($\geq 50\%$) con la de BphQ y otros miembros de la familia FixJ de reguladores de respuesta. Por otro lado, el gen *accS* (*a*romatic *c*atabolic *c*arbon *s*ensor) codifica una proteína histidina quinasa (HK) de 903 aminoácidos. Que muestra una identidad de secuencia del 47% con la proteína BphP de *Acidovorax* sp. KKS102. Estas observaciones permitieron postular que los productos de los genes *accSR* codifican un sistema regulador de dos componentes (TCS), que podría estar implicado en el control de la represión catabólica del metabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB.

5.2. Caracterización del regulador de respuesta AccR de *Azoarcus* sp. CIB

5.2.1. El gen *accR* está implicado en la represión catabólica de la ruta *bzd*

Para confirmar experimentalmente si el gen *accR*, está implicado en el control de la expresión del *cluster bzd* en *Azoarcus* sp. CIB, se construyó la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB Δ *accR* (Tabla 3), cuyo gen *accR* fue deletado utilizando el plásmido pKNG101*accR* (Tabla 4), tal y como se detalla en el apartado 4.2.3 de Materiales y Métodos. Inicialmente se comparó el crecimiento de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB Δ *accR* con el de la cepa silvestre *Azoarcus* sp. CIB en benzoato. Tras 72 h de incubación en anaerobiosis no se observaron diferencias significativas entre las dos cepas en ninguna fase de la curva de crecimiento, lo que permitió sugerir que el producto del gen *accR* no es indispensable para la activación de la expresión de los genes *bzd* encargados del catabolismo anaeróbico del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB.

Para determinar si el gen *accR* interviene en la represión catabólica del promotor P_N , se monitorizó la actividad de éste mediante RT-PCR a tiempo real en la cepa silvestre *Azoarcus* sp. CIB y en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB Δ *accR* cultivadas anaeróticamente en benzoato (condición control de inducción) o en benzoato más succinato (condición de represión catabólica). Tal y como se observa en la figura 33, la actividad del promotor P_N en la cepa silvestre cultivada en condición de represión catabólica fue unas 50 veces menor que cuando se cultivaba en condiciones de inducción. Sin embargo, los niveles de actividad de P_N en la cepa mutante fueron

similares tanto en condiciones de inducción como de represión catabólica y no se observaron diferencias significativas con respecto a la actividad de P_N en la cepa silvestre cultivada en condiciones de inducción (Fig. 33). Cuando la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB Δ *accR* fue complementada con el plásmido pBBR1MC-5*accR* (Tabla 4) que expresa el gen *accR* bajo el control del promotor *Ptac*, la actividad de P_N en condiciones de represión catabólica mostró niveles muy similares a los obtenidos en la cepa silvestre cultivada en condiciones de represión catabólica (Fig. 33)

Estos resultados revelan que el producto del gen *accR* está implicado en el control de la represión catabólica que ejercen algunas fuentes de carbono, como el succinato, sobre el promotor P_N .

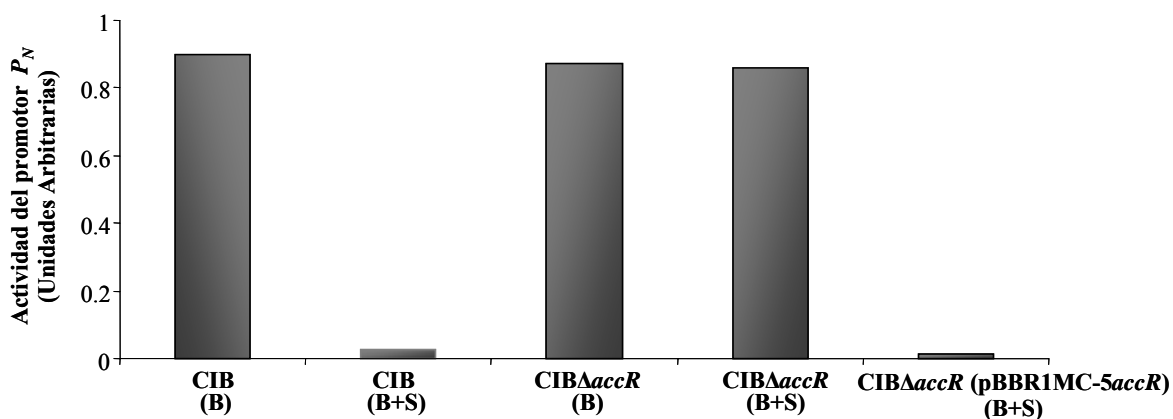


Figura 33. Efecto del gen *accR* en la actividad del promotor P_N . La cepa silvestre *Azoarcus* sp. CIB (CIB), la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB Δ *accR* (CIB Δ *accR*) y la cepa mutante complementada con el plásmido pBBR1MC-5*accR* [CIB Δ *accR* (pBBR1MC-5*accR*)] fueron cultivadas anaeróbicamente en benzoato 3 mM (B) (condiciones de inducción) o en benzoato 1 mM + succinato 0,4% (B+S) (condiciones de represión catabólica), hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Se extrajo RNA total y se midió por RT-PCR a tiempo real la actividad del promotor P_N tal y como se detalla en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. La actividad relativa del promotor se representa en unidades arbitrarias. Los datos mostrados son los resultados de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

5.2.2. Hiperexpresión del gen *accR* y purificación de su producto génico

Con el objetivo de purificar la proteína AccR para proceder a su caracterización bioquímica, se procedió inicialmente a clonar el gen *accR* en el vector de hiperexpresión pQE32 (Tabla 4), dando lugar al plásmido pQE32-His₆AccR (Tabla 4), el cual expresa un gen *accR* recombinante que fusiona seis histidinas en el extremo amino-terminal de AccR, posibilitando la purificación de la proteína mediante un solo paso de cromatografía de afinidad en columnas de níquel. La metodología empleada para la hiperexpresión y posterior purificación de la proteína AccR según se describe en el apartado 5.2.2 de Materiales y Métodos. La masa molecular del monómero de la

proteína AccR analizado en SDS-PAGE fue de aproximadamente 25 kDa, lo cual coincide con la masa molecular teórica de 24628.2 Da. (Fig. 32)

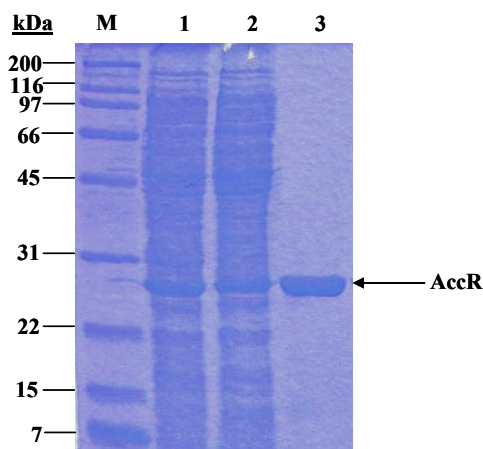


Figura 33. Hiperexpresión y purificación de la proteína His₆AccR a partir de extractos de *E.coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆AccR). Gel SDS-PAGE (12,5%) en el que se analizó la producción y purificación de la proteína His₆AccR tal y como se indica en el apartado 5.2.2 de Materiales y Métodos. La calle M se corresponde con los marcadores de peso molecular *Broad Range* de Bio-Rad. En el margen izquierdo de la figura, se señala el peso molecular de las proteínas marcadoras (en kDa). En la calle 1 se muestra la fracción el extracto crudo de la cepa *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆AccR). En la calle 2 se muestra la fracción soluble del extracto crudo que contiene la proteína His₆AccR. La calle 3 corresponde a la proteína His₆AccR purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel.

5.2.3. AccR cataliza su autofosforilación *in vitro*

Los reguladores de respuesta tienen la propiedad de catalizar su autofosforilación *in vitro* usando pequeñas moléculas donadoras de fosfato (Lukat *et al.*, 1992). Para confirmar que la proteína AccR purificada se comportaba como un regulador de respuesta, se incubó *in vitro* con carbamoil fosfato como molécula donadora de fosfato (ver apartado 5.3 de Materiales y Métodos) y la fosforilación de la proteína AccR se confirmó mediante análisis de espectrometría de masas (MALDI-TOF) (ver apartado 5.4 de Materiales y métodos). Mientras que la proteína AccR purificada sin tratamiento de fosforilación generó un pico cuya masa molecular fue de 24628.8 Da (Fig. 33, panel A), tras ser fosforilada en presencia de carbamoil fosfato (Fig. 34, Panel B), generó dos picos claramente definidos, el primero de ellos se corresponde con la proteína sin fosforilar (24628.8 Da), mientras que el segundo de ellos (24708.6 Da) incrementa en 80 Da con respecto al primero y es compatible con la adición de un grupo fosfato a la proteína AccR correspondiente a la forma fosforilada AccR-P

Estos resultados indican que la proteína AccR se autofosforila y que el carbamoil fosfato es una molécula donadora de fosfato efectiva para la fosforilación *in vitro* de la proteína AccR.

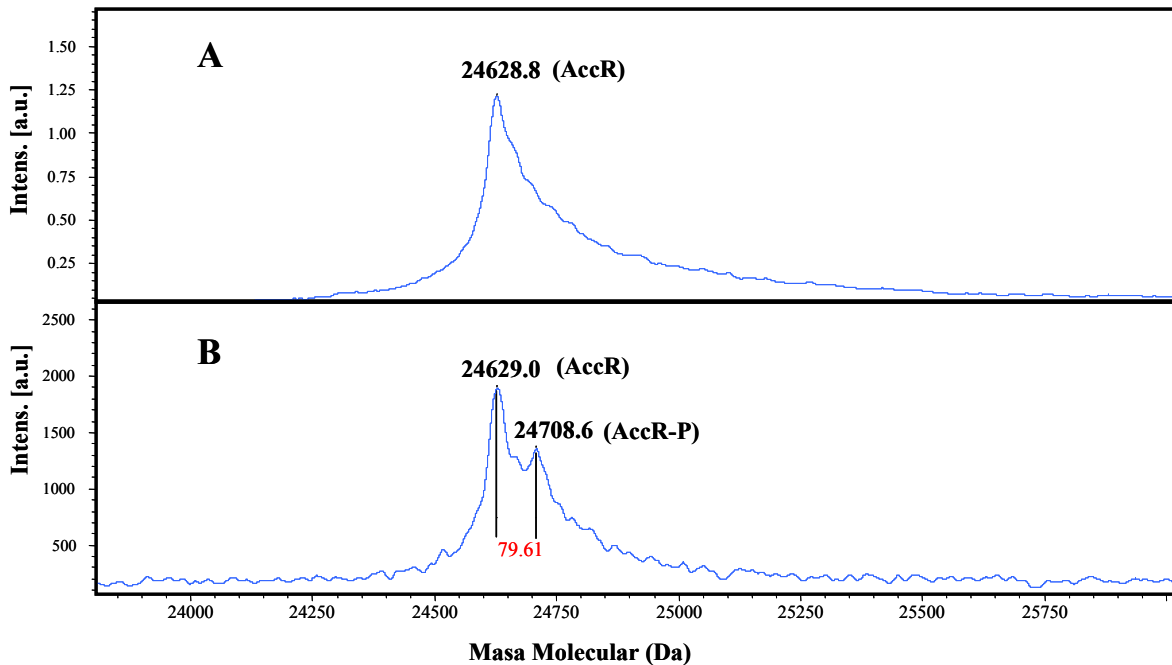


Figura 34. Fosforilación *in vitro* de la proteína His₆AccR. La proteína His₆AccR (20 μ M) se incubó en el tampón de fosforilación a 25°C durante 90 minutos como se indica en el apartado 5.3 de Materiales y Métodos. Los análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF fueron llevados a cabo tal y como se indica en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos. Se representa la intensidad de la señal (eje de ordenadas) frente a la masa molecular (eje de abscisas) **A)** Espectro correspondiente a la proteína His₆AccR sin fosforilar. **B)** Espectro de la proteína His₆AccR incubada con carbamoil fosfato 20 mM. Se indican las proteínas que corresponden a cada pico analizado en el ensayo.

5.2.4. La fosforilación induce un cambio del estado oligomérico de la proteína AccR

Con el fin de estudiar el estado oligomérico de las proteínas AccR y su forma fosforilada AccR-P, se realizaron experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica tal y como se detalla en el apartado 8 de Materiales y Métodos. El perfil de distribución de coeficientes de sedimentación de la proteína AccR corresponde a una única especie cuyo coeficiente (1.5 S) es compatible con un estado de asociación monomérico. Así mismo, la masa molecular calculada por equilibrio de sedimentación coincide con la estimada para el monómero a partir de su secuencia, 24628.8 kDa (Tabla 7 y Fig. 35, Paneles A y C).

Por otro lado los experimentos de velocidad de sedimentación realizados con la proteína AccR-P mostraron la existencia de dos especies moleculares, una de ellas con

un coeficiente de sedimentación de 1.5 compatible con el monómero (proteína no fosforilada) y otra con un coeficiente de sedimentación 2.1 compatible con un dímero de la proteína (proteína fosforilada). Estos resultados estaban de acuerdo con los estudios de espectrometría de masas que indicaban que la fosforilación de AccR con carbamoil fosfato no es total y parte de la proteína AccR permanecía sin fosforilar (Fig. 34)

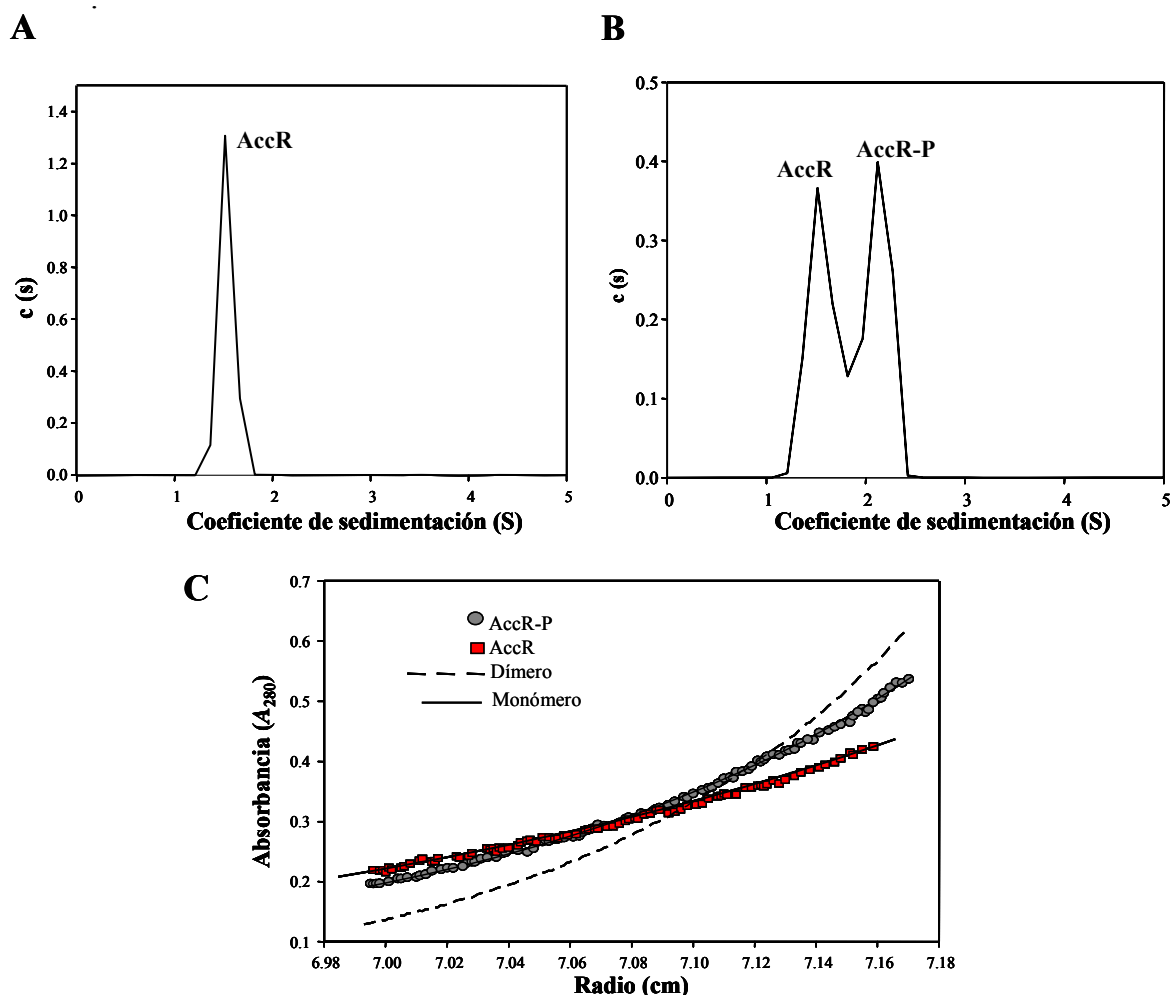


Figura 35 Estudio del estado oligomérico de las proteínas His₆AccR y His₆AccR-P. A) y B) Análisis mediante velocidad de sedimentación de las proteínas purificadas His₆AccR y His₆AccR-P, respectivamente. Se representa el perfil de distribución de concentraciones (eje de ordenadas) frente al coeficiente de sedimentación (eje de abscisas) de las proteínas His₆AccR (panel A) e His₆AccR-P (panel B). No se observaron diferencias en los respectivos coeficientes de sedimentación en el rango de concentraciones de proteína analizadas (0.1-1.0 mg/ml). C) Análisis mediante equilibrio de sedimentación de las proteínas purificadas His₆AccR y His₆AccR-P. Gradiente en equilibrio de sedimentación de las proteínas His₆AccR (cuadros rojos) e His₆AccR-P (círculos grises). La línea discontinua representa el gradiente teórico correspondiente a un dímero. El gradiente correspondiente a un monómero se representa con una línea negra continua.

La masa molecular promedio calculada a partir del perfil de equilibrio de sedimentación de la muestra de proteína AccR fosforilada era intermedia entre la correspondiente al estado monomérico y dimérico (Fig. 35, Panel C), confirmando la

presencia de estas dos especies y permitiendo cuantificar su abundancia relativa en la mezcla (Tabla 7).

Tanto para la proteína AccR como para la proteína AccR-P se obtuvo el mismo índice de fricción (fff_0) de 1.7, que indica que se trata de proteínas con forma ligeramente elongada. En resumen los resultados obtenidos con los experimentos de ultracentrifugación analítica demostraron que la fosforilación induce un cambio en el estado oligomérico de monómero a dímero en la proteína AccR

Tabla 7. Datos obtenidos en los experimentos de ultracentrifugación analítica. M_m representa la masa molecular y fff_0 el coeficiente de fricción.

| Proteína | M_m experimental (Da) | fff_0 | Coefficiente de Sedimentación (S) | Estado de asociación |
|----------|-------------------------|---------|-----------------------------------|------------------------------------|
| AccR | 24000+/-500 | 1.7 | 1.5 | Monómero |
| AccR-P | 38500+/-400 | 1.7 | 1.5 y 2.1 | Monómero (51.3%) Dímero (48.3%) |

5.2.5. AccR-P interacciona *in vitro* con el promotor P_N

Con el objetivo de analizar si las proteínas AccR y AccR-P eran capaces de interactuar directamente con el promotor catabólico P_N de la degradación anaeróbica de benzoato, se llevaron a cabo inicialmente experimentos de retardo en gel. Para estos ensayos se utilizó la sonda P_N marcada radiactivamente tal y como se indica en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos.

Se observó un incremento en la formación del complejo P_N /AccR-P a medida que se incrementaba la concentración de proteína AccR fosforilada (Fig. 36, Panel A). Sin embargo, la proteína sin fosforilar no causó retardo en la migración de la sonda P_N (Fig. 36, Panel B). Estos resultados demuestran que la interacción de AccR con el promotor P_N es una interacción directa y dependiente del estado fosforilado de la proteína reguladora.

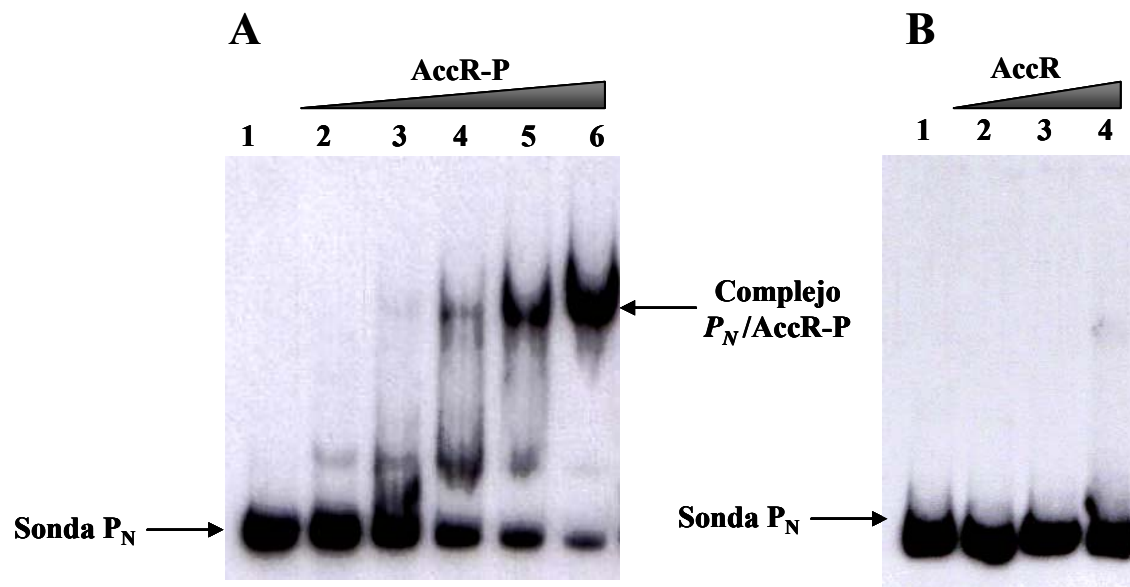


Figura 36. Interacción de las proteínas His₆AccR-P e His₆AccR con el promotor P_N. A) Ensayos de retardo en gel de la sonda P_N con la proteína His₆AccR-P con. Calle 1, sonda P_N libre. Calles 2-6, sonda P_N en presencia de concentraciones crecientes 3, 6, 8, 10 y 12 μM, respectivamente de proteína AccR-P purificada. B) Ensayo de retardo en gel de la sonda P_N con la proteína His₆AccR. Calle 1, sonda P_N libre. Calles 2-4, sonda P_N en presencia de 8, 10 y 12 μM de Proteína AccR, respectivamente. La sonda P_N y el complejo P_N/ AccR-P se indicaron con flechas.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la interacción entre la proteína AccR-P y el promotor P_N, se llevaron a cabo ensayos de protección frente a la digestión por la DNasa I (*footprinting*) empleando la sonda P_N y la proteína AccR-P (Fig. 37, Panel A). Como se puede observar en la Figura 37, Panel B, la zona de protección de la proteína AccR-P sobre la sonda P_N, se extiende desde la posición -48 hasta la posición -151 con respecto al sitio de inicio de la transcripción del promotor P_N y está flanqueada por bandas de hipersensibilidad a la digestión por la DNasa I. Un análisis detallado de la región protegida por AccR-P permitió identificar dos repeticiones de la secuencia palindrómica, 5'-ATGCA(N₆)TGCA-3' (Fig. 37, Panel B) la cual fue propuesta como la región operadora de reconocimiento de AccR-P en el promotor P_N.

Figura 37. A) Ensayos de protección frente a la digestión por DNasa I de la interacción de la proteína AccR-P con el promotor P_N . Las reacciones de *footprinting* fueron llevadas a cabo tal y como se detalla en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos. En la calle 1 se muestra la sonda P_N en ausencia de proteína. En las calles 2-6 se añadió al ensayo 3, 6, 8, 10 y 12 μM de proteína His₆AccR-P, respectivamente. En la calle AG, fue cargada la reacción de secuenciación A+G de Maxam y Gilbert del promotor P_N . La región protegida por la proteína His₆AccR-P se esquematiza con una barra acotada a la derecha. A la izquierda se indica la secuencia del promotor P_N que incluye las cajas operadoras (recuadros azules) de His₆AccR-P. Han sido señaladas las regiones -10 y -35 del promotor P_N , al igual que la posición regiones -151, que delimita la huella de protección de AccR-P sobre P_N . Las bandas de hipersensibilidad a la digestión a la actividad de la DNasa I se indican con asteriscos. **B) Secuencia de nucleótidos del promotor P_N** Las flecha rojas señalan la dirección de la transcripción del gen *bzdN*. El sitio de inicio de la transcripción (+1) y las cajas -10 y -35 del promotor P_N se indican resaltando los nucleótidos en rojo. Se ha subrayado en negro la región de unión del ribosoma (RBS). Por otro lado, se enseña sombreado en amarillo la región del promotor P_N protegida por la proteína AccR. Las secuencias palindrómicas de la región protegida por AccR se indican con flechas azules divergentes. Se han subrayado en rojo y verde la secuencia de nucleótidos que incluyen las sondas P_{N3} y P_{N2} , respectivamente.

Para confirmar si AccR-P era capaz de reconocer ambas regiones palindrómicas independientemente, se diseñaron dos variantes truncadas del promotor P_N (sondas P_{N2} y P_{N3}) (Fig. 37, Panel B). Mediante ensayos de retardo en gel utilizando la proteína AccR-P y las sondas P_{N2} y P_{N3} , marcadas radiactivamente tal y como se indica en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos, se pudo comprobar que AccR-P retarda la migración de ambas sondas de forma independiente (Fig. 38, Panel A y Panel B) y con una afinidad similar a la observada en los ensayos de retardo en gel que se llevaron a cabo con la sonda P_N (Fig. 36)

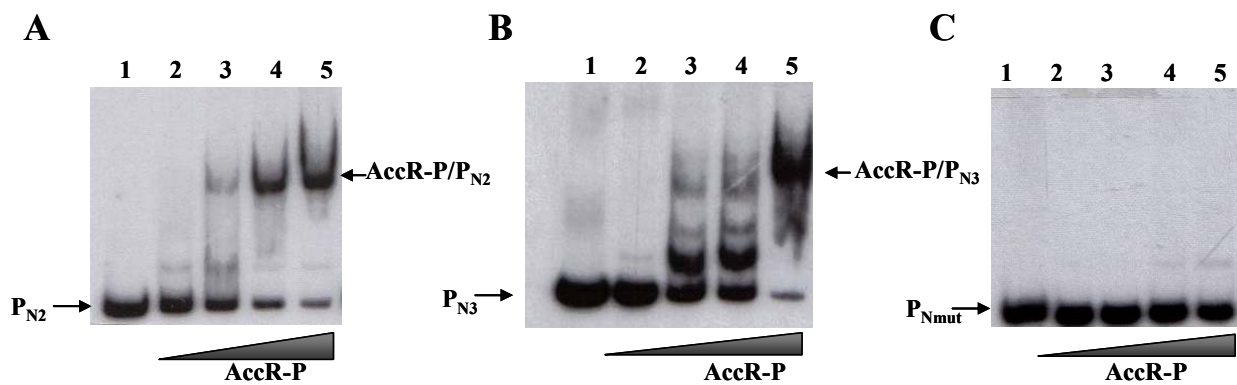


Figura 38. Ensayos de retardo en gel de las sondas P_{N2} , P_{N3} y P_{Nmut} con la proteína AccR-P. Los ensayos fueron llevados a cabo tal y como se indica en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. Las calles 1 se corresponden con las sondas libres P_{N2} (panel A), P_{N3} (panel B) y P_{Nmut} (panel C). En las calles 2-5 se añadieron concentraciones crecientes 3, 8, 10 y 12 μM , respectivamente, de proteína AccR-P purificada. Las sondas P_{N2} , P_{N3} y P_{Nmut} , al igual que el complejo AccR-P/ P_N se indican con flechas negras.

Con el objetivo de confirmar la región operadora de AccR-P, se diseñó mediante mutagénesis dirigida por PCR una sonda P_N mutante (P_{Nmut}) sustituyendo la estructura palindrómica de la región operadora propuesta por la secuencia 5'-CGCCTGATCAAGTGCAT-3' (Ver apartado 7.1 de Materiales y Métodos). Cuando se realizaron ensayos de retardo en gel comparando la interacción de AccR-P con las

sondas P_{N2} y P_{Nmut} , se constató que la proteína AccR-P no era capaz de retardar la migración de la sonda P_{Nmut} (Fig. 38, Panel C), sugiriendo que la secuencia ATGCA(N₆)TGCAT, era la región operadora de reconocimiento de la proteína AccR-P en el promotor P_N .

5.2.6. La proteína AccR-P es un represor transcripcional del promotor P_N

Los resultados de los experimentos *in vivo* (apartado 4.2.1) sugieren que el producto del gen *accR* podría codificar un represor transcripcional del promotor P_N . Con el fin de confirmar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos de transcripción *in vitro* (ver apartado 7.4 de Materiales y métodos). Para ello se utilizó proteína FNR* purificada (un activador indispensable para que tenga lugar la transcripción desde el promotor P_N (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006) (ver Introducción apartado 2.2.1), RNAP de *E. coli*, diferentes concentraciones de proteína AccR y AccR-P, y el plásmido pJCD- P_N (Tabla 4), el cual tiene clonado el promotor P_N que transcribe un RNAm de 184 nt.

Como se puede observar en la figura 39 (calles 1-4), la actividad del promotor P_N , medida en base a la formación del transcrito esperado de 184 nt, fue inhibida a medida que se añadieron concentraciones crecientes de proteína AccR-P. Por el contrario la proteína AccR no fue capaz de inhibir no fue capaz de inhibir la actividad de P_N ni siquiera cuando se añadió al ensayo una concentración 10 veces superior a la de AccR-P. (Fig. 39, calles 5-7), Estos resultados no sólo confirmaron que el gen *accR* codifica un represor de la transcripción, sino que además el efecto inhibitor de la actividad del promotor P_N es un efecto directo y dependiente del estado fosforilado de la proteína AccR.

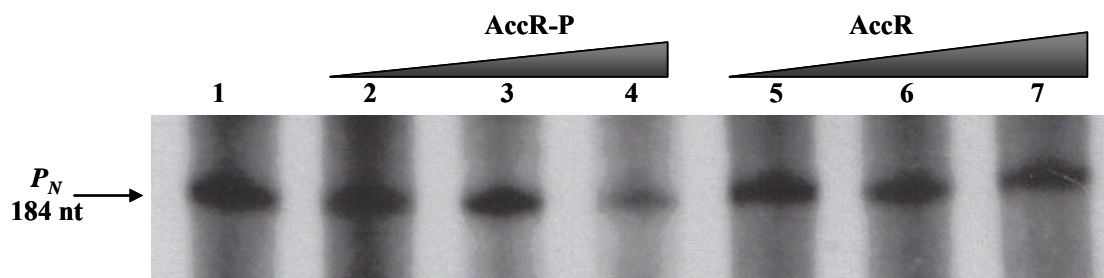


Figura 39. Ensayos de transcripción *in vitro* del promotor P_N . Reacciones de transcripción *in vitro* de múltiples rondas, utilizando el plásmido pJCD-PN que incluye el promotor P_N (Tabla 4). Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en presencia de RNAP de *E. coli* (40 nM) y proteína His₆-Fnr* purificada (200 nM), tal y como se detalla en el apartado 7.4 de Materiales y Métodos. Además se añadió en el ensayo proteína His₆AccR-P a concentraciones de 0, 0.04, 0.1 y 0.2 μ M (calles 1-4, respectivamente), o proteína His₆AccR a concentraciones de 0.4, 1.0 y 2.5 μ M (calles 5-7, respectivamente). Se señala con una flecha el transcrito de 184 nt del promotor P_N .

5.2.7. Estudios de las relaciones estructura y función del regulador AccR.

Para profundizar en el estudio del mecanismo de activación por fosforilación de la proteína AccR, se procedió al análisis de las relaciones estructura-función de dicha proteína. Un análisis *in silico* de la estructura de AccR reveló dos regiones claramente diferenciadas separadas por un *linker* de 23 aminoácidos (Fig. 40). La región N-terminal (del residuo 1 al 122) contiene un motivo *receiver* (REC), altamente conservado y que es responsable de las reacciones de fosforilación y defosforilación de los reguladores de respuesta (Bourret, 2010). La región C-terminal (residuos 145-212) (Fig. 40) contiene un motivo HTH de unión al DNA de tipo LuxR (SMART release, <http://smart.embl-heidelberg.de/smart>).

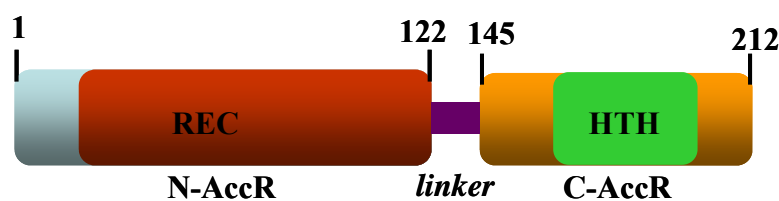


Figura 40. Arquitectura modular de la proteína AccR. Representación esquemática de los dominios que componen la proteína AccR. En azul, se muestra el dominio N-terminal (N-AccR), en naranja se muestra el dominio C-terminal (C-AccR) y en morado la región *linker*. Se representan en rojo y verde los motivos REC (receiver) y HTH (hélice-giro-hélice), respectivamente. Los números de los residuos que delimitan cada dominio de la proteína han sido indicados.

5.2.7.1. Análisis de la región N-terminal de AccR

El dominio N-terminal de la proteína AccR (N-AccR), está constituido por un motivo REC (residuos 10 al 122) que incluye el sitio activo de fosforilación de la proteína. El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de esta región permitió la identificación del residuo altamente conservado, Asp60, presuntamente implicado en la fosforilación de la proteína. Para confirmar experimentalmente que el residuo Asp60 era la diana de fosforilación en la proteína AccR, se procedió a su sustitución por un residuo Glu, mediante mutagénesis dirigida por PCR tal y como se detalla en el apartado 3.6 de Materiales y Métodos, generándose la proteína AccRD60E. La sustitución del residuo Asp conservado que se fosforila en un regulador de respuesta, genera una proteína que ya no se puede fosforilar. Por otro lado, se adecuó la sustitución a un residuo Glu ya que si bien inactiva a algunos reguladores de respuesta, en otros casos mimetiza el estado fosforilado de la proteína parental y permite la obtención de reguladores constitutivamente activos (Klose *et al.*, 1993; Lan y Igo, 1998). Las

condiciones de hiperproducción y purificación de la proteína mutante AccRD60E en extractos de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆AccRD60E) se realizaron de modo similar a lo descrito para la proteína AccR, tal y como se indica en el apartado 5.2.2 de Materiales y Métodos. La proteína AccRD60E purificada una solubilidad y estabilidad similar a la de la proteína parental (datos no mostrados).

Para estudiar *in vitro* la interacción de la proteína AccRD60E con el promotor P_N , se llevaron a cabo experimentos de retardo en gel (ver apartado 7.2 de Materiales y Métodos), los cuales mostraron que a medida que se aumentaba la cantidad de proteína en el ensayo, se retardaba la migración de la sonda. (Fig. 41). Este resultado sugiere que la sustitución Asp60Glu le permitiría a la proteína AccRD60E adquirir una conformación similar a la de la proteína parental en estado fosforilado para poder unirse al promotor P_N .

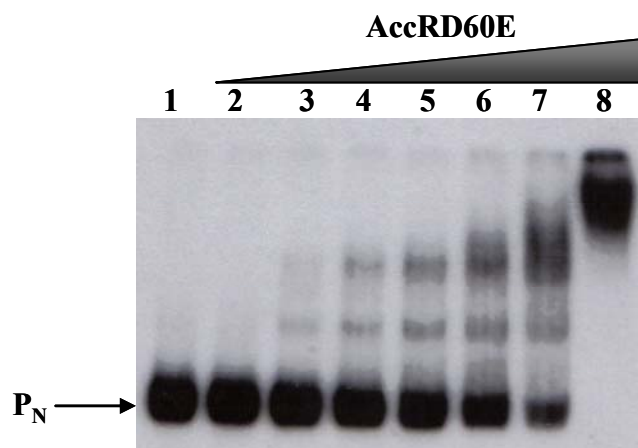


Figura 41. Ensayos *in vitro* de unión de la proteína AccRD60E al promotor P_N . El ensayo de retardo en gel fue llevado a cabo tal y como se indica en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. Calle 1, sonda P_N libre. Calles 2-8, sonda P_N en presencia de 1, 2, 3, 5, 8, 10 y 12 μ M de proteína His₆-AccRD60E, respectivamente. A la izquierda de la figura se indica con una flecha la sonda P_N

Para confirmar *in vivo* que la sustitución Asp60Glu generaba una proteína constitutivamente activa cuya actividad represora del promotor P_N era independiente de fosforilación, se analizó la expresión de la fusión traduccional $P_N::lacZ$ en *E. coli*, monitorizando los niveles de actividad β -galactosidasa en células cultivadas anaeróbicamente. Para realizar estos experimentos, la cepa *E. coli* AFMCP_N (Tabla 3) fue transformada independientemente con los plásmidos pIZAccRD60E y pIZAccSR (Tabla 4), que expresan las proteínas AccRD60E y AccR, respectivamente, bajo el control del promotor *P_{tac}*. Como se puede observar en la figura 42, PanelA, mientras que los niveles de actividad del promotor P_N en la cepa que expresaba las proteína AccR

eran similares a los observados en la cepa portadora del plásmido control pIZ1016, la actividad de P_N disminuyó alrededor de 4 veces en la cepa que expresaba la proteína AccRD60E (Fig. 42, Panel A). Estos resultados sugieren que en las condiciones de crecimiento ensayadas la proteína AccR, aún en presencia de la correspondiente histidina quinasa AccS codificada en el plásmido pIZAccSR (Tabla 4), es incapaz de fosforilarse y reprimir la actividad del promotor P_N en *E. coli*. Por el contrario, en las mismas condiciones que no inducen fosforilación de AccR, la proteína AccRD60E reprime el promotor P_N , confirmando la actividad constitutiva del regulador mutante.

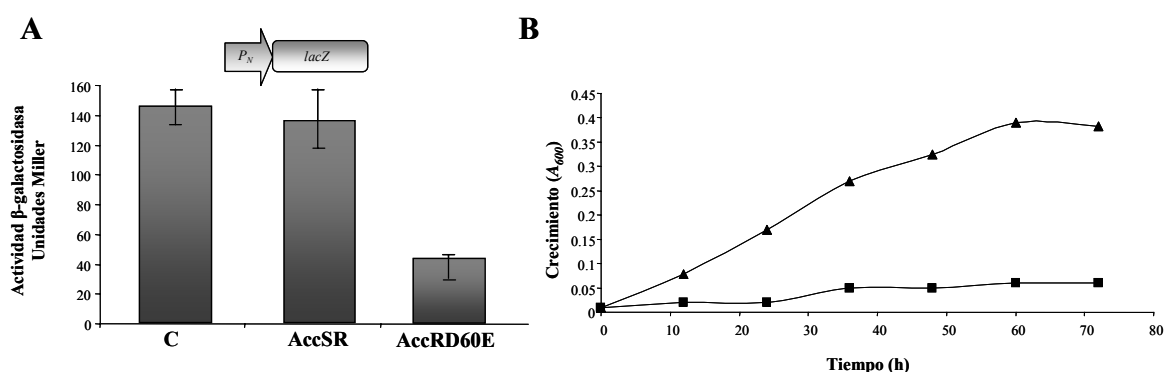


Figura 42. Efecto de la proteína AccRD60E sobre la expresión de los genes de la ruta bzd. A) Actividad del promotor P_N en *E. coli*. La cepa *E. coli* AFMCP $_N$, que incorpora en cromosoma la fusión traduccional $P_N::lacZ$ (Tabla 3), fue transformada con el plásmido control pIZ1016 (C) o con los plásmidos pIZAccRD60E (AccRD60E) y pIZAccSR (AccR), que expresan las proteínas AccRD60E y AccR, respectivamente (Tabla 4). Las células fueron cultivadas en medio mínimo M63 con glicerol como única fuente de carbono a 30°C en anaerobiosis hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente se ensayó su actividad β-galactosidasa, tal y como se detalla en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. Se muestran las desviaciones estándar de los resultados de tres experimentos independientes. **B) Crecimiento en benzoato de las cepas *Azoarcus* sp. CIBΔAccR y en condiciones anaeróbicas.** Se valoró el incremento de absorbancia a 600 nm de las cepas mutantes *Azoarcus* sp. CIBΔaccR (triángulos negros) y *Azoarcus* sp. CIBΔaccR (pIZAccRD60E) (cuadrados negros) cultivadas anaeróbicamente en medio mínimo MC, a 30°C con benzoato 3mM como única fuente de carbono.

Para analizar el efecto de la proteína AccRD60E *in vivo* en *Azoarcus* sp. CIB, se monitorizó el crecimiento anaeróbico en medio mínimo MC con benzoato como fuente de carbono de las cepas *Azoarcus* sp. CIBΔaccR y *Azoarcus* sp. CIBΔaccR conteniendo el plásmido pIZAccRD60E. Como se puede observar en la figura 42, Panel B, la cepa que contiene el plásmido que expresa la proteína AccRD60E no fue capaz de crecer anaeróbicamente en benzoato, al contrario de lo que ocurría con otras fuentes de carbono, como succinato o glutarato, en donde su crecimiento fue similar al de la cepa *Azoarcus* sp. CIBΔaccR (datos no mostrados). Todos estos resultados demuestran que la proteína AccRD60E es constitutivamente activa, comportándose tanto *in vivo* como *in*

in vitro como la proteína parental fosforilada, ejerciendo su función de represor de la transcripción de los genes *bzd* y como consecuencia de esto, impidiendo a la cepa CIB metabolizar el benzoato en ausencia de oxígeno.

5.2.7.2. Análisis funcional de la región C-terminal de la proteína AccR

Para confirmar la función predicha para la región C-terminal de AccR (C-AccR) de interacción con el promotor P_N y demostrar que se trataba de un dominio funcional independiente de la región N-AccR, se procedió a la construcción del plásmido pQE32-His₆CAccR (Tabla 4), que expresa el dominio C-AccR (residuo 135 al 212) fusionado a un tag de 6 His. Las condiciones de hiperproducción y purificación de la proteína fueron similares a las que se llevaron a cabo con la proteína AccR (ver apartado 5.2.2 de Materiales y Métodos). La proteína purificada (Fig. 43, Panel A) presentó una estabilidad y solubilidad similar a la proteína parental, sugiriendo que se trataba de un dominio estructuralmente independiente del resto de la proteína AccR.

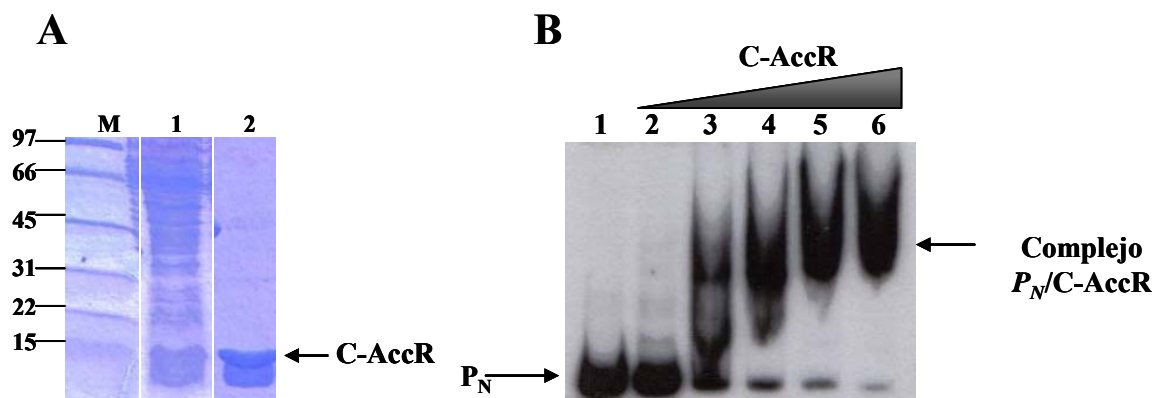


Figura 43. A) Hiperexpresión y purificación de la proteína His₆-CAccR a partir de extractos de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆AccR). Gel SDS-PAGE (12,5%) en el que se analizó la producción y purificación de la proteína His₆-CAccR tal y como se indica en el apartado 5.2.2 de Materiales y Métodos. La calle M se corresponde con los marcadores de peso molecular *Broad Range* de Bio-Rad. En el margen izquierdo de la figura, se señala el peso molecular de las proteínas marcadoras (en kDa). En la calle 1 se muestra la fracción soluble del extracto crudo de la cepa *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆AccR) que contiene la proteína His₆AccR. La calle 2 corresponde a la proteína His₆-CAccR purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel.

B) Interacción de la proteína C-AccR con el promotor P_N . Ensayo de retardo en gel realizado tal y como se detalla en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. Calle 1, sonda P_N libre. Calles 2-6, sonda P_N en presencia de 1, 2, 3, 5 y 10 μ M de proteína His₆-CAccR, respectivamente. A izquierda y derecha de la figura, se señalan la sonda P_N y el complejo formado, respectivamente.

El dominio C-AccR tiene un motivo HTH (del residuo 162 al 189) donde se localiza la hipotética región de interacción con el DNA (Fig. 40). Para comprobar que la proteína C-AccR se unía al DNA, se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel, en los

cuales se observó que la proteína C-AccR era capaz de interactuar con el DNA, retardando la migración de la sonda P_N a medida que se incrementaba su concentración en el ensayo (Fig. 43, Panel B).

Con el fin de conocer el estado de oligomerización de la proteína C-AccR en solución, se realizaron experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación, empleando la técnica de ultracentrifugación analítica tal y como se detalla en el apartado 8 de Materiales y Métodos. Los perfiles de sedimentación mostraron la presencia de una única especie de 1.3S con un índice de fricción f/fo de 1.4, compatible con un monómero de geometría cercana a la de una proteína globular. En los experimentos de equilibrio de sedimentación se identificó una única especie compatible con un estado de asociación monomérico en solución para la proteína C-AccR. (Fig. 44).

Con los datos obtenidos en estos experimentos se demuestra la funcionalidad del dominio C-AccR siendo capaz de unirse al DNA, en ausencia de la fosforilación y posterior dimerización requeridas por la proteína AccR parental.

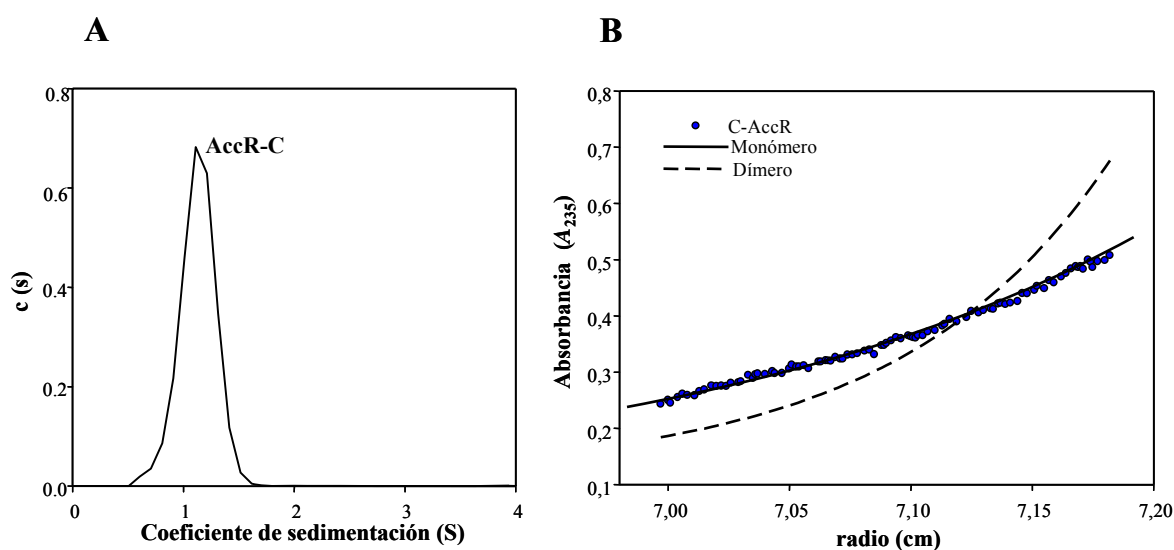


Figura 44 Estudio del estado oligomérico de las proteína C-AccR. **A)** Análisis mediante velocidad de sedimentación de la proteína purificada His₆C-AccR. Se representa el perfil de distribución de concentraciones (eje de ordenadas) frente al coeficiente de sedimentación (eje de abscisas) de la proteína His₆C-AccR. **B)** Análisis mediante equilibrio de sedimentación de la proteína purificada His₆C-AccR. Gradiente en equilibrio de sedimentación de la proteína His₆C-AccR (círculos azules). La línea discontinua representa el gradiente teórico correspondiente a un dímero. El gradiente correspondiente a un monómero se representa con una línea negra continua, la cual coincide con las medidas realizadas para la proteína His₆C-AccR. La concentración de proteína utilizada en estos experimentos fue de 0,5 mg/ml.

5.3. Caracterización de la proteína histidina quinasa AccS

Como se ha indicado en el apartado 4.1, el gen *accS* codifica una presunta proteína histidina quinasa (HK) de 903 aminoácidos, la cual formaría parte del sistema de dos componentes AccSR. Con el objetivo de comprobar la implicación de AccS en la represión catabólica de los genes *bzd* así como entender los mecanismos moleculares que disparan e intervienen en la cascada de fosforilación entre la HK AccS y el RR AccR, se procedió al estudio detallado de la proteína AccS.

5.3.1. El gen *accS* está implicado en la represión catabólica de la ruta *bzd*

Como se ha demostrado con los experimentos mostrados en el apartado 4.2, el regulador AccR está implicado directamente en la CCR de los genes *bzd* y la represión que ejerce sobre la actividad del promotor P_N es dependiente de su estado de activación. Dicha activación está mediada por la fosforilación de la proteína, que a su vez, podría estar controlada por la HK AccS. Para comprobar que la proteína AccS, al igual que AccR, está implicada en el control de la CCR del promotor P_N , se llevó a cabo inicialmente un estudio *in vivo* en *Azoarcus* sp. CIB. Con este fin, se construyó la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB $\Delta accS$ (Tabla 3), cuyo gen *accS* fue deletado utilizando el plásmido pK18*mobcacBaccS* (Tabla 4) tal y como se detalla en el apartado 4.2.3 de Materiales y Métodos. Mediante experimentos de RT-PCR a tiempo real se analizó la expresión del promotor P_N en la cepa silvestre y en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB $\Delta accS$ cultivadas en condiciones de inducción (benzoato 3 mM) o en condiciones de represión catabólica (benzoato 1 mM + succinato 0.4 %).

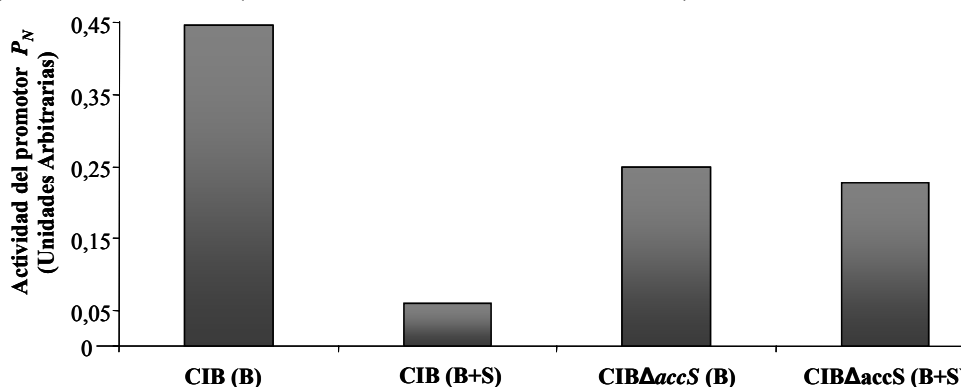


Figura 45. Implicación del gen *accS* en la actividad del promotor P_N . Las células de la cepa silvestre *Azoarcus* sp. CIB (CIB) y la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB $\Delta accS$ (CIB $\Delta accS$), fueron cultivadas anaeróbicamente en benzoato 3 mM (B) (condiciones de inducción) o en benzoato 1 mM + succinato 0,4% (B+S) (condiciones de represión catabólica), hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Se extrajo RNA total y se midió por RT-PCR a tiempo real la actividad del promotor P_N tal y como se detalla en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. La actividad relativa del promotor se representa en unidades arbitrarias. Los datos mostrados son los resultados de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

Como se puede ver en la figura 45, la actividad del promotor P_N en la cepa *Azoarcus* sp. CIB $\Delta accS$ fue la misma tanto en condiciones de inducción como en condiciones de represión catabólica, a diferencia de lo que ocurre en la cepa silvestre que mostró un claro descenso de la actividad de P_N en condiciones de represión. Este resultado indica que el gen *accS* está implicado en el control de la represión catabólica de los genes *bzd* y sugiere que la actividad constitutiva del promotor P_N en la cepa que carece de la HK AccS es debida a la ineficaz activación por fosforilación del represor transcripcional AccR cuando las células se cultivan en succinato.

5.3.2. Análisis de la estructura modular de la proteína AccS

Las proteínas PHKs tienen una arquitectura modular con distintos dominios estructurales que cumplen diferentes funciones (Gao y Stock, 2009; Grebe y Stock, 1999; Dutta *et al.*, 1999; Krell *et al.*, 2010). Un análisis detallado de la estructura primaria de la HK AccS, permitió postular dos regiones claramente diferenciadas, una región periplásmica y otra citoplasmática con una arquitectura modular característica. La región periplásmica, se encuentra delimitada por dos motivos transmembrana TM1 y TM2, comprendidos entre los aminoácidos 15 al 37 y 253 al 275, respectivamente (Fig. 46). La región citoplasmática está constituida por un presunto dominio sensor y un dominio autoquinasa. El dominio sensor de AccS contiene tres motivos PAS (Per-RNAt-Sim) (Huang *et al.*, 1993), supuestamente utilizados para la detección de cambios físicoquímicos del medio ambiente (Ulrich *et al.*, 2005) (Fig. 45).

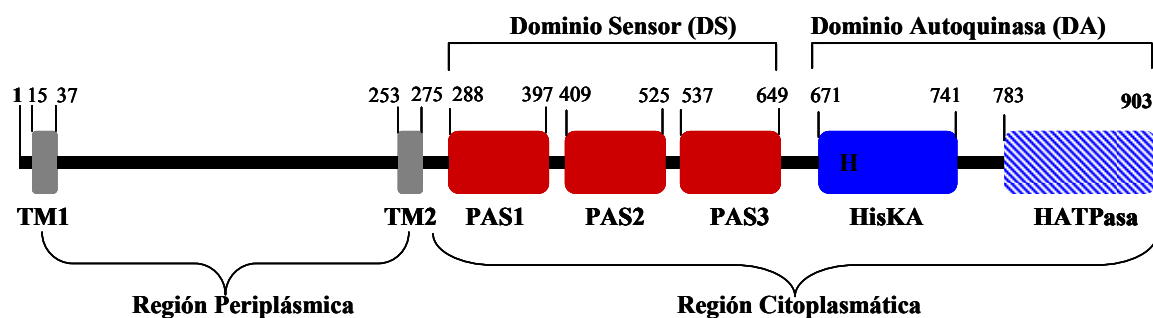


Figura. 46. Estructura modular de la proteína AccS. Representación esquemática de las regiones periplásmica y citoplásmica que componen la proteína AccS. Los motivos transmembrana TM1 y TM2 se representan en gris. Se señalan con corchetes negros el dominio sensor (DS) y autoquinasa (DA). Los motivos PAS1, PAS2 y PAS3 se representan en granate. Los motivos HisKA y HATPasa que componen el dominio autoquinasa se representan en azul liso y rayado, respectivamente. También se muestra la His receptora del grupo fosfato en la reacción de atofosforilación. También se indica la posición de los residuos que delimitan cada uno de los motivos de la proteína.

Por otro lado, el dominio autoquinas, incluye los motivos HisKA ó motivo DhP (*dimerization and histidine phosphotransfer*) (del residuo 671 al 741), que cataliza las reacciones de dimerización y de transferencia de fosfato, y el motivo HATPasa (del residuo 783 al 903), que cataliza la unión del ATP y la autofosforilación de la HKen el residuo His (His₆₈₁ en AccS) del motivo HisKA (Fig. 45)

5.3.3. Caracterización del dominio autoquinas de la proteína AccS

Con el objetivo de demostrar experimentalmente la funcionalidad del dominio autoquinas de la proteína AccS, se procedió a la clonación e hiperexpresión de dicho dominio (residuos 653-903) con un tag de seis histidinas en su extremo N-terminal, utilizando el plásmido de hiperexpresión pQE32His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ (Tabla 4) La proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ fue purificadas mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni-NTA tal y como se describe en el apartado 5.2.3 de Materiales y Métodos. La masa molecular de la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ en SDS-PAGE fue de aproximadamente 30 kDa, lo que coincide con la masa teórica esperada (29388.6 Da) (Fig. 47) y sugiere que el dominio autoquinas es estructuralmente independiente del resto de la proteína AccS.

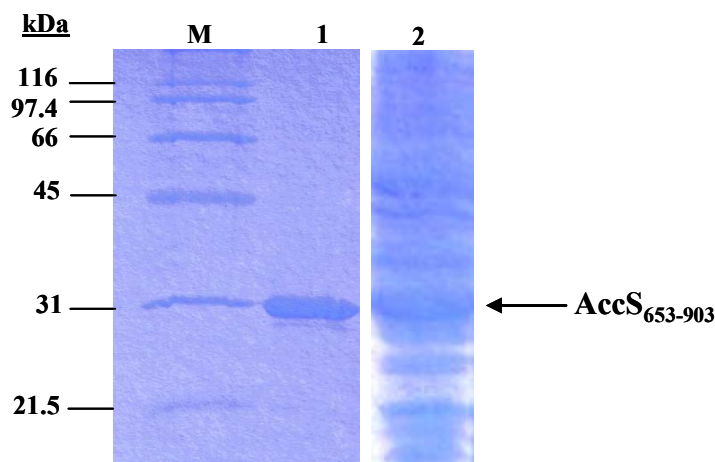


Figura 47. Hiperexpresión y purificación de la proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ a partir de extractos de *E.coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃). Gel SDS-PAGE (12,5%) en el que se analizó la producción y purificación de la proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ tal y como se indica en el apartado 5.2.3 de Materiales y Métodos. La calle M se corresponde con los marcadores de peso molecular *Broad Range* de Bio-Rad. En el margen izquierdo de la figura, se señala el peso molecular de las proteínas marcadoras (en kDa). La calle 1 corresponde a la proteína purificada His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel. En la calle 2 se muestra la fracción soluble del extracto crudo que contiene la proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃

5.3.3.1. La proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ cataliza su autofosforilación en el dominio autoquinasa

Una propiedad característica de las HKs es la de catalizar su autofosforilación en presencia de ATP. Con el fin de demostrar *in vitro* la autofosforilación del dominio autoquinasa, la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ fue incubada en presencia de (γ -³²P) ATP y se monitorizó la incorporación del fosfato radiactivo en el dominio autoquinasa, mediante análisis en SDS-PAGE (Fig. 48, Panel A) (ver apartado 6.2 de Materiales y métodos). Como se observa en la figura 48, el porcentaje de fosforilación aumentó proporcionalmente con el tiempo del ensayo, alcanzando el máximo nivel de autofosforilación a los 30 minutos de reacción, manteniéndose alto hasta los 50 minutos (>80 %) de ensayo, y reduciéndose a tan sólo el 30 % tras 120 minutos. Con este resultado se comprobó que el dominio constituido por los motivos HisKA y HATPasa, es un dominio funcional que le confiere a la proteína AccS la capacidad de autofosforilarse *in vitro* en presencia de ATP.

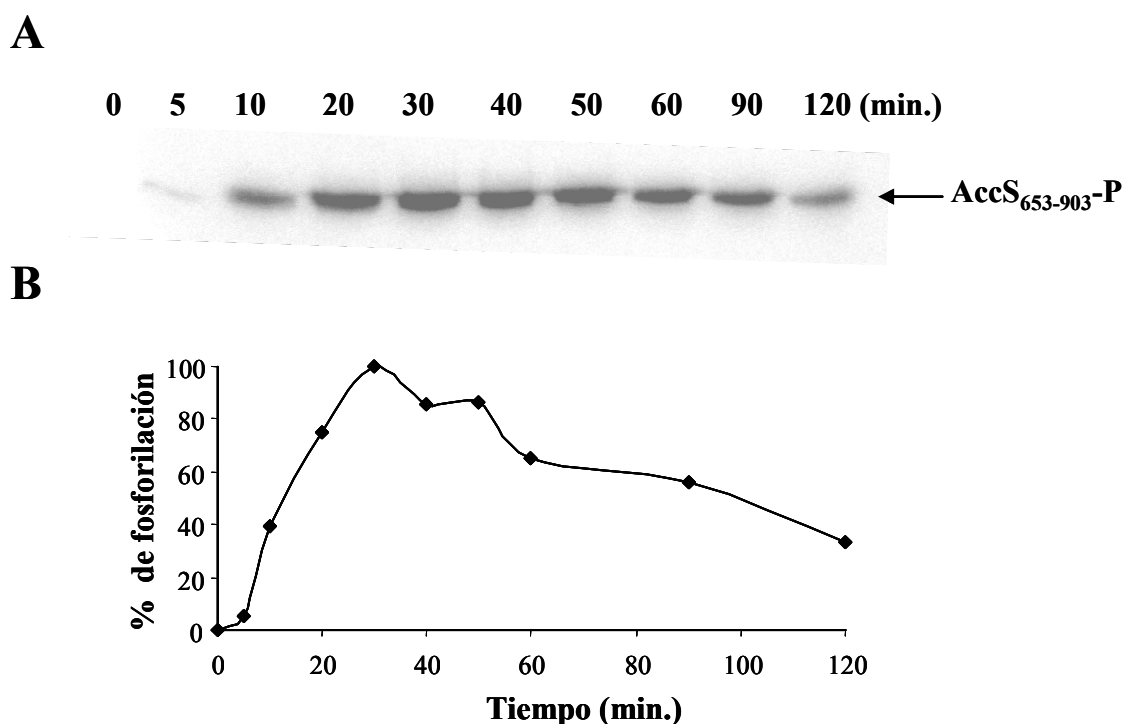


Figura 48. Ensayo de autofosforilación de la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃. La proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ (5 μ M) fue incubada en presencia de (γ -³²P) ATP en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos. Se tomaron muestras a los 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 y 120 min de incubación y éstas fueron analizadas mediante SDS-PAGE 12.5 % (A). Se indica con una flecha la posición de la proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ fosforilada. La intensidad de señal radiactiva, medida mediante densitometrado de las bandas de fosforilación, se representa en el panel B.

5.3.3.2. Defosforilación de la proteína AccS653-903

Con el fin de determinar la vida media de la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ en su estado fosforilado, se realizó un ensayo de autofosforilación en presencia de ATP frío. Para ello, la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ fue autofosforilada durante 30 minutos tal y como se indica el apartado 6.2 de Materiales y Métodos). Transcurrido este tiempo se añadió al ensayo un exceso de ATP no marcado radiactivamente y se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación. (Fig. 49, Panel A). El porcentaje de fosforilación correspondiente a cada uno de los tiempos de incubación representado en la figura 48, Panel B muestra una vida media de unos 40 min y una disminución del 80 % después de 180 minutos de ensayo.

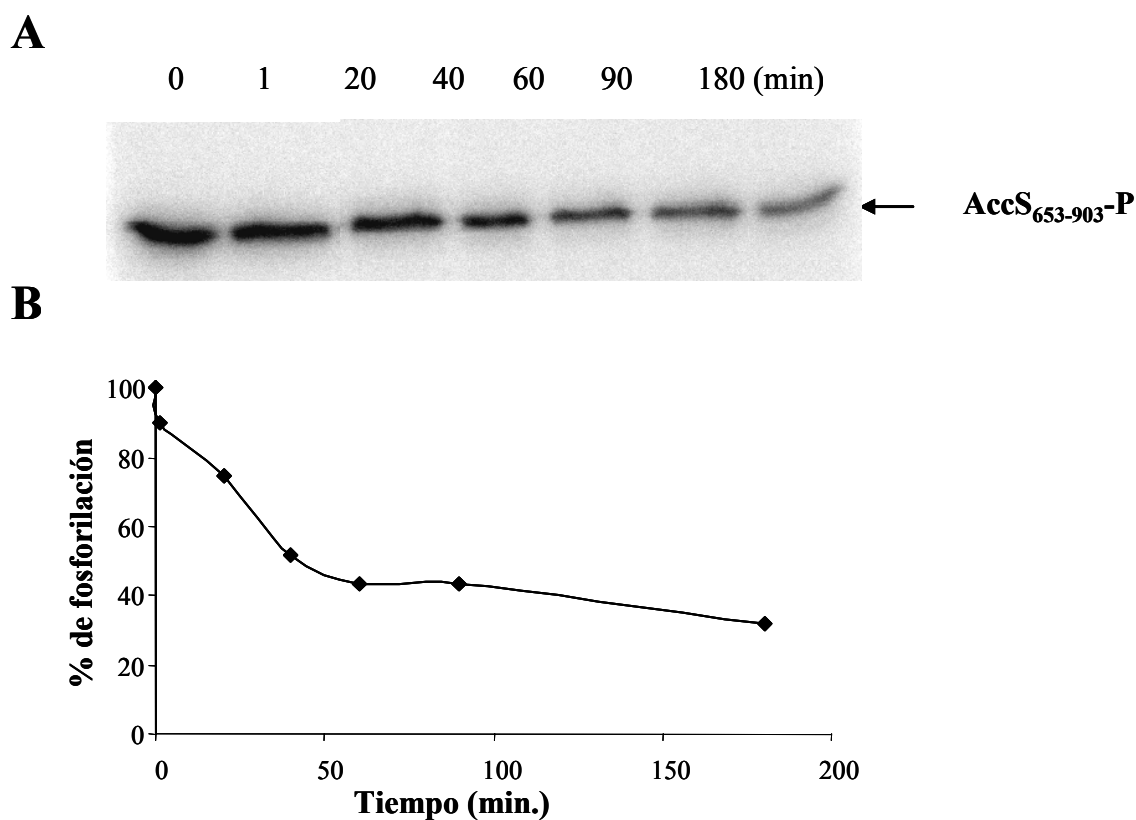


Figura 49 Ensayos de defosforilación de la proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃. La proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ a (5 μ M) fue inicialmente autofosforilada en presencia de (γ^{32} -P) ATP. Tras añadir un exceso molar de 500 ATP frío, se tomaron muestras a los 0, 1, 20, 40, 60, 90 y 180 minutos de incubación y éstas Las reacciones fueron paradas con tampón TR (ver apartado xx de Materiales y Métodos) y posteriormente fueron analizadas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE 12.5% (A) (ver apartado 6.3 de Materiales y Métodos). Se indica con una flecha la banda correspondiente a la proteína fosforilada (AccS₆₅₃₋₉₀₃-P). La intensidad de señal radiactiva, medida mediante densitometrado de las bandas de fosforilación, se representa en el panel B.

5.3.3.3. La proteína AccS transfosforila al regulador de respuesta AccR

Los estudios *in vivo* realizados con los mutantes *Azoarcus* sp. CIB Δ *accR* y *Azoarcus* sp. CIB Δ *accS* (apartados 4.3.1 y 4.3.2) habían demostrado que tanto el gen *accR* como el gen *accS* estaban implicados en el control de la CCR de los genes *bzd*. Además, los resultados de la caracterización *in vitro* de las proteínas AccR y AccS sugieren que se trata de un sistema regulador de dos componentes basado en la transferencia de fosfato de la HK AccS al RR AccR.. Para demostrarlo, se llevaron a cabo ensayos de transfosforilación *in vitro* entre las proteínas AccS₆₅₃₋₉₀₃ y AccR (ver apartado 6.4 de Materiales y Métodos). Con este fin, la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ fue inicialmente autofosforilada durante 30 minutos en presencia de (γ^{32} -P) ATP y tras pasado este tiempo se añadió al ensayo la proteína purificada AccR y se monitorizó la transferencia de fosfato radiactivo a diferentes tiempos de incubación. La figura 49 ilustra que la transfosforilación entre AccS-AccR ocurre a tiempos muy cortos, observándose la transferencia del fosfato de la HK al RR a los 10 segundos de poner las dos proteínas en contacto, lo que se confirmó con la desaparición de la forma AccS₆₅₃₋₉₀₃-P (Figura 50, Calle2).

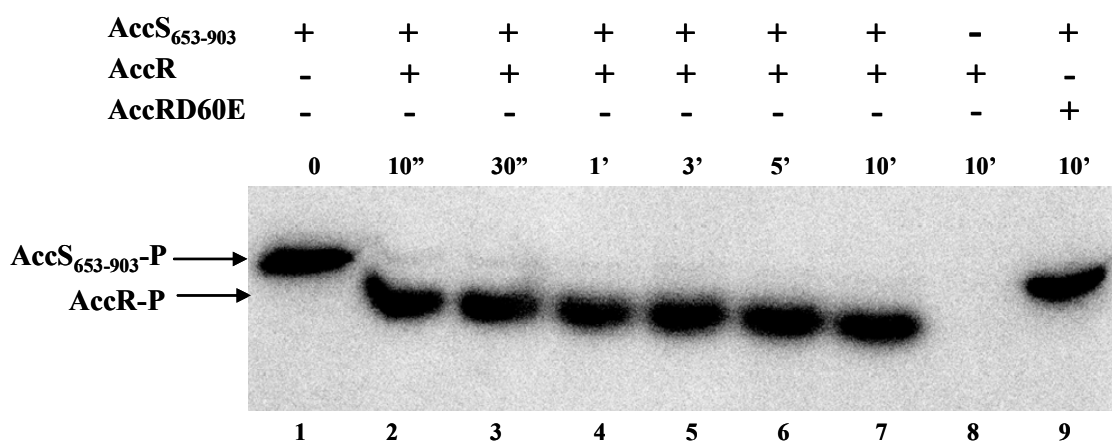


Figura 50. Ensayos de transfosforilación *in vitro* entre las proteínas AccS₆₅₃₋₉₀₃ y AccR o AccRD60E. La proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ (5 μ M), fue inicialmente autofosforilada durante 30 minutos en presencia de (γ^{32} -P) ATP en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos y posteriormente se añadieron los reguladores de respuesta AccR o AccRD60E. En la parte superior de la figura se indica la presencia (+) o ausencia (-) de las proteínas purificadas His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃, His₆AccR o His₆AccRD60E (5 μ M) en cada reacción. Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados en la figura y se analizaron mediante SDS-PAGE 12.5%. Con una flecha se ha señalado la banda correspondiente a cada proteína fosforilada, His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ (AccS₆₅₃₋₉₀₃-P) o His₆AccR (AccR-P).

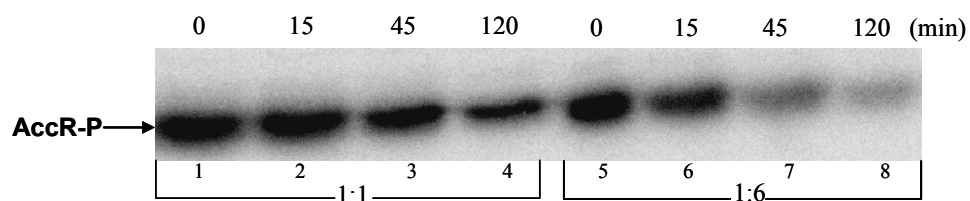
Por otro lado, no se observó transfosforilación cuando la proteína AccR fue sustituida por la proteína mutante AccRD60E (Figura 50, calle 9), lo que confirma que AccRD60E no puede ser fosforilada y sugiere que el residuo Asp60 es el lugar de

fosforilación en el regulador AccR. Todos estos resultados demuestran que las proteínas AccS y AccR forman un sistema de dos componentes, y participan en una cascada de fosforilación que implica una rápida y específica transferencia de fosfato desde la HK (AccS) al residuo Asp60 del RR (AccR).

5.3.3.4. AccS controla la defosforilación de AccR

Con el objetivo de conocer la vida media de la proteína AccR-P en presencia de su correspondiente HK AccS, se llevó a cabo un ensayo de transfosforilación *in vitro* entre las proteínas AccS₆₅₃₋₉₀₃ y AccR (relación molar 1:1) y al cabo de 10 minutos se eliminó el ATP del ensayo y se monitorizó la cantidad de proteína AccR-P presente a lo largo del tiempo en SDS-PAGE. Como se puede ver en la figura 51, calles 1-4, la vida media de la proteína fosforilada AccR fue aproximadamente de 100 minutos.

A



B

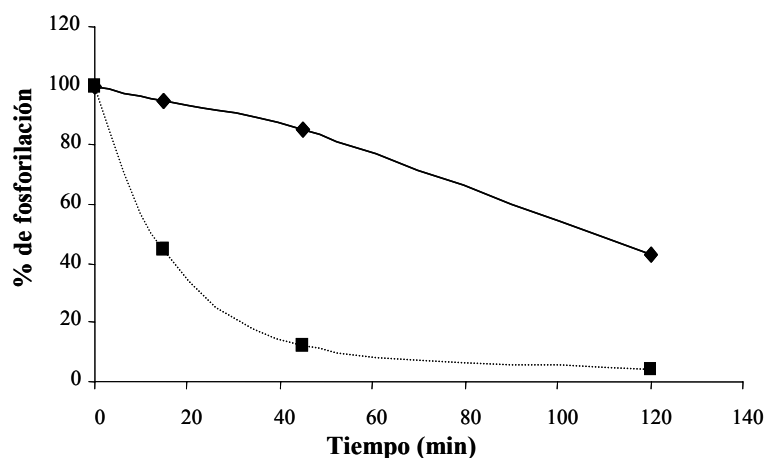


Figura 51. Ensayo de defosforilación de la proteína AccR mediado por AccS₆₅₃₋₉₀₃. La proteína His₆AccR (5 μ M) fue transfosforilada por la proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ (5 μ M) durante 10 minutos, transcurrido este tiempo se eliminó el ATP de la reacción (ver apartado 6.5 de Materiales y Métodos). Se tomaron muestras a los 0, 15, 45 y 120 minutos (min) y se analizaron mediante SDS-PAGE al 12.5% (Panel A, calles 1-4). En las calles 5-8 se muestran los resultados de un experimento similar en el que tras eliminar el ATP de la reacción, se añadió más proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ para alcanzar una relación molar AccR/AccS₆₅₃₋₉₀₃ de 1:6. Se indica con una flecha negra la banda correspondiente a la proteína His₆AccR fosforilada. **B)** Cuantificación de la fosforilación de His₆AccR en presencia de His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ a una relación molar de 1:1 (línea) y 1:6 (línea discontinua). Se representa en el eje de las ordenadas el porcentaje de fosforilación (%) y en el eje de las abscisas el tiempo de incubación en minutos

Para confirmar si la defosforilación de AccR-P estaba mediada por la actividad fosfatasa de AccS, se realizó el ensayo de transfosforilación *in vitro* entre AccS₆₅₃₋₉₀₃ y

AccR y tras la eliminación del ATP se añadió más proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ hasta alcanzar una relación molar AccR/ AccS₆₅₃₋₉₀₃ de 1:6. En estas condiciones el porcentaje de proteína AccR fosforilada disminuyó al 50% al cabo de tan sólo 15 min. y se redujo hasta menos del 5% al cabo de 120 min. (Fig. 51, calles 5-8). Estos resultados sugieren que la defosforilación de AccR está mediada por la actividad fosfatasa del dominio autoquinasa de AccS.

5.3.3.5. Transferencia reversa de fosfato entre AccR y AccS

Teniendo en cuenta que el EDTA es un agente inhibidor de las actividades de fosforilación y defosforilación dependientes de Mg²⁺ de las HKs (Jeon *et al.*, 2001), se propuso investigar el efecto del EDTA en la defosforilación de AccR. Para ello, se realizó un ensayo de transfosforilación *in vitro* entre las proteínas AccS₆₅₃₋₉₀₃ y AccR y una vez fosforilada AccR se eliminó el ATP del ensayo y se añadió EDTA a una concentración final de 50 mM. Curiosamente, la adición de EDTA no inhibió la defosforilación de AccR sino que permitió observar la transferencia del grupo fosfato de AccR-P a la HK AccS, completándose esta transfosforilación reversa al cabo de 90 min. de ensayo (Fig. 52). Este fenómeno, conocido como transferencia reversa de fosfato, podría constituir un mecanismo adicional de control de AccR-P.

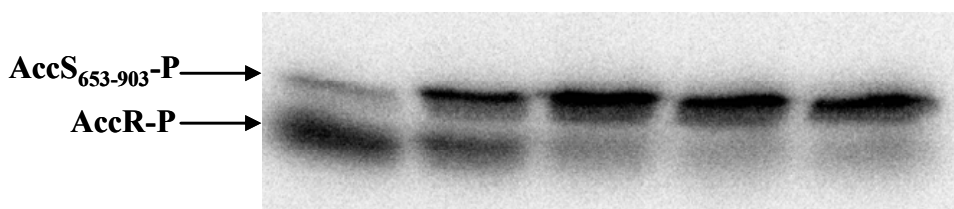


Figura 52. Transferencia reversa de la proteína AccR a la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃. Inicialmente se realizó un experimento de transfosforilación *in vitro* entre las proteínas His₆AccR (5 μM) y His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ (5 μM) (Ver apartado 6.4 de Materiales y Métodos), una vez fosforilada la proteína His₆AccR, se eliminó el ATP, se añadió EDTA 50 mM y se tomaron muestras a los 0, 15, 45, 90 y 120 minutos (min). Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE del 12.5%. Se indican con flechas las bandas de fosforilación correspondientes a las proteínas His₆AccR (AccR-P) e His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ (AccS₆₅₃₋₉₀₃-P)

5.3.4. Identificación de algunas señales reconocidas por la HK AccS

Como se ha descrito en la Introducción, las HKs sensan y responden a un amplio rango de señales físicas y/o químicas. Por ello, se planteó el objetivo de conocer cuales son algunas de las señales a las que responde la HK AccS, modificando su actividad autoquinasa y por consiguiente al control del estado de fosforilación del RR AccR. Teniendo en cuenta que AccS está implicada en el control de la ruta catabólica anaeróbica bzd de una bacteria anaerobia facultativa como *Azoarcus* sp. CIB, se planteó

la hipótesis de que AccS podría estar involucrada en el reconocimiento del estado de óxido-reducción de la bacteria.

5.3.4.1. Construcción y estudio de la proteína AccS₂₈₈₋₉₀₃

Para profundizar en los estudios sobre las señales reconocidas por la HK AccS, se procedió a la clonación e hiperexpresión de la región citoplásmica (residuos 288-903) de la proteína AccS con un tag de 6 His en su extremo N-terminal utilizando el plásmido (pQE32AccS₂₈₈₋₉₀₃) (Tabla 4). A diferencia de los elevados niveles de hiperexpresión del dominio autoquinasa (proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃, Fig. 37), la proteína AccS₂₈₈₋₉₀₃ que contiene el dominio autoquinasa y el dominio sensor (Fig. 46), se hiperprodujo a bajos niveles (Fig. 53).

La proteína AccS₂₈₈₋₉₀₃ fue purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni-NTA tal y como se detalla en el apartado 5.2.3 de Materiales y Métodos. La masa molecular de la proteína AccS₂₈₈₋₉₀₃ en SDS-PAGE fue de 70 kDa, lo que coincide con la masa teórica esperada (70662.6 Da) (Fig. 53).

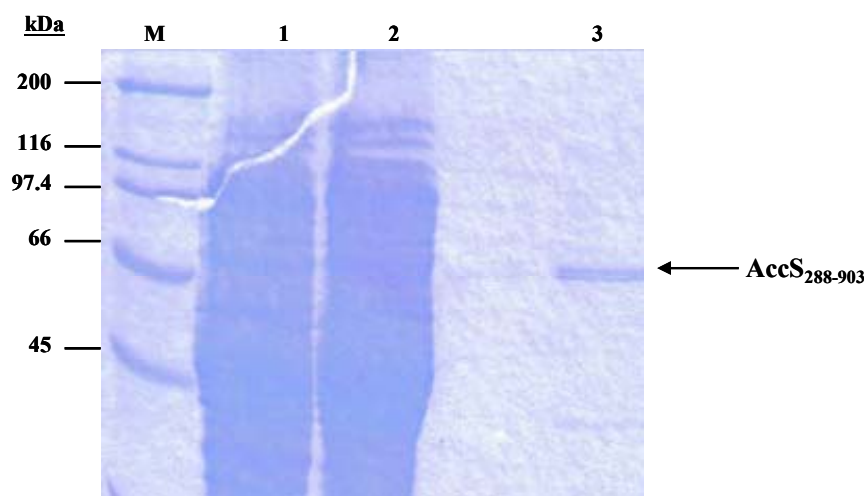


Figura 53. Hiperexpresión y purificación de la proteína AccS₂₈₈₋₉₀₃ a partir de extractos de *E.coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆AccS₂₈₈₋₉₀₃). Gel SDS-PAGE (15%) en el que se analizó la producción y purificación de la proteína His₆AccS₂₈₈₋₉₀₃ tal y como se indica en el apartado 5.2.3 de Materiales y Métodos. La calle M se corresponde con los marcadores de peso molecular *Broad Range* de Bio-Rad. En el margen izquierdo de la figura, se señala el peso molecular de las proteínas marcadoras (en kDa). En la calle 1 se muestra la fracción el extracto crudo de la cepa *E. coli* M15 (pREP4, pQE32- His₆AccS₂₈₈₋₉₀₃). En la calle 2 se muestra la fracción soluble del extracto crudo que contiene la proteína His₆AccR. La calle 3 corresponde a la proteína His₆AccR purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel.

Se realizaron experimentos de autofosforilación *in vitro* de la proteína AccS₂₈₈₋₉₀₃, comprobándose que la proteína era funcional y alcanzaba la máxima fosforilación a los 45 minutos de ensayo (Fig. 54, Panel B).

Una vez comprobada la actividad autoquinasa de la proteína AccS₂₈₈₋₉₀₃, se ensayó dicha actividad en presencia de diferentes compuestos que responden o afectan el estado rédox de la célula (NAD, NADP⁺, FAD⁺, FMN⁺, ditionito, NADH y NADPH) o que se han visto implicados en el fenómeno de represión catabólica en la ruta bzd (D-lactato, acetato y succinato). Ninguno de los ácidos orgánicos probados tuvo efecto en los niveles de autofosforilación de AccS₂₈₈₋₉₀₃ (Fig. 54, calles 1-3). La mayoría de cofactores y/o agentes reductores probados tampoco mostraron efecto en la actividad autoquinasa de AccS₂₈₈₋₉₀₃. Sin embargo, el NADP⁺, al contrario que el NADPH, inhibió la autofosforilación de la proteína AccS₂₈₈₋₉₀₃ (Fig 53, calles 2 y 3). Este resultado sugiere que la adición de algunos compuestos en su forma oxidada como el NADP, inhibiría la autofosforilación de AccS, lo que estaría de acuerdo con que AccS estuviese respondiendo a cambios en el estado de oxidoreducción de la célula.

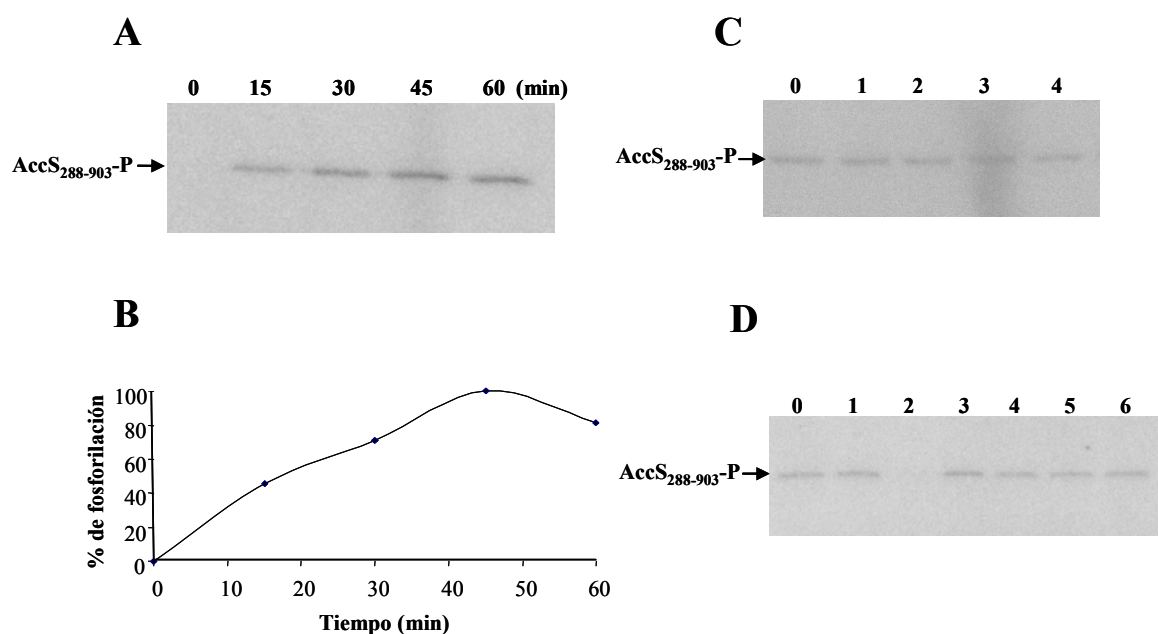


Figura 54. Ensayos de autofosforilación de la proteína AccS₂₈₈₋₉₀₃ **A)** Ensayo de autofosforilación *in vitro* de la proteína His₆AccS₂₈₈₋₉₀₃ (1 μM), en presencia de (γ³²-P)ATP en las condiciones de fosforilación *in vitro* que se indican en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos. Se indican los tiempos de fosforilación (en minutos) a los que se extrajeron las muestras que se analizaron posteriormente en SDS-PAGE al 15%. **B)** Perfil de la autofosforilación de la proteína His₆AccS₂₈₈₋₉₀₃, se representa en el eje de las ordenadas el porcentaje de fosforilación (%) y en el eje de las abscisas el tiempo de incubación (en minutos). **C)** Calles 0-4; reacciones de autofosforilación en ausencia de compuestos adicionales o en presencia de D-lactato, acetato, succinato y ditionito, respectivamente. **D)** Calles 0-6; reacciones de autofosforilación a los 45 min en ausencia de compuestos adicionales o en presencia de NADPH⁺, NADP⁺, NAD⁺, NADH, FAD⁺, FMN⁺, respectivamente. Todos los compuestos fueron añadidos a una concentración de 5 mM e incubados con la proteína 10 minutos a 24°C antes de llevar a cabo el ensayo de autofosforilación, tal y como se indica en el apartado 6.7 de Materiales y Métodos.

Para confirmar este resultado, se llevó a cabo el experimento de autofosforilación de la proteína $\text{AccS}_{288-903}$ en ausencia del agente reductor DTT y en presencia de distintas moléculas oxidantes como las quinonas solubles ubiquinona-0 y menadiona y la cloramina T. Como se puede ver en la figura 54, tanto las quinonas ubiquinona-0 y menadiona como la cloramina T inhibieron la actividad autoquinasa de $\text{AccS}_{288-903}$. Estos resultados demuestran que la proteína AccS se autofosforila en condiciones reducidas, sin embargo, en condiciones de oxidación generadas por agentes como las quinonas en estado oxidado o la cloramina T, la actividad autoquinasa de AccS es inhibida.

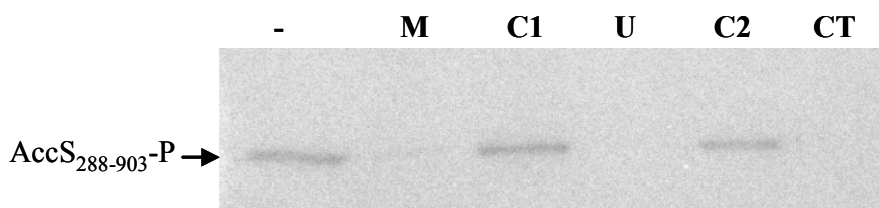


Figura 55. Ensayo de la actividad autoquinasa de la proteína $\text{AccS}_{288-903}$ en presencia de diferentes compuestos oxidantes. La proteína $\text{His}_6\text{AccS}_{288-903}$ ($1\mu\text{M}$), fue autofosforilada durante 45 minutos en presencia ($\gamma^{32}\text{-P}$) ATP en ausencia de DTT en el ensayo (apartado 6.7 de Materiales y Métodos), incubándose previamente a 24°C durante 10 minutos con menadiona (M), ubiquinona-0 (U) o cloramina T (CT) a una concentración de 5 mM. La calle (-), corresponde con el control de autofosforilación de la proteína $\text{His}_6\text{AccS}_{288-903}$, Las calles C1 y C2, se corresponden con reacciones de autofosforilación de la proteína $\text{His}_6\text{AccS}_{288-903}$ incubada previamente con los disolventes de la menadiona y ubiquinona-0, (Etanol 50 % y DMSO, respectivamente). Se indica con una flecha la banda correspondiente a la proteína $\text{His}_6\text{AccS}_{288-903}$ autofosforilada ($\text{AccS}_{288-903}\text{-P}$).

5.3.4.2. Efecto del estado redox sobre la actividad del dominio autoquinasa de la HK AccS.

Con la finalidad de confirmar si el dominio sensor de AccS es el encargado de reconocer las moléculas en estado oxidado que inhibían la actividad autoquinasa de la proteína, se hicieron ensayos de autofosforilación *in vitro* en presencia de estas moléculas utilizando la proteína $\text{AccS}_{653-903}$, que no expresa el dominio sensor y tiene actividad autoquinasa. De esta manera se llevaron a cabo inicialmente ensayos de autofosforilación de la proteína $\text{AccS}_{653-903}$ en presencia de diferentes concentraciones de NADP^+ . Como se puede ver en la figura 55, Paneles A y B, la actividad autoquinasa de la proteína disminuye conforme se aumenta la cantidad de NADP^+ en el ensayo. Al igual que se había observado con la proteína $\text{AccS}_{288-903}$, una concentración de 5 mM de NADP^+ fue suficiente para inhibir por completo la actividad autoquinasa de la proteína $\text{AccS}_{653-903}$. Por el contrario, la adición de NADPH no causó ningún efecto en la autofosforilación de $\text{AccS}_{653-903}$ (datos no mostrados). De la misma manera, se analizó el

efecto de agentes oxidantes como las quinonas menadiona y ubiquinona-0 o la cloramina T sobre la actividad autoquinasa de la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃. En la figura 56, Panel C, se puede ver que tanto las quinonas como la cloramina T inhibían la actividad autoquinasa de AccS₆₅₃₋₉₀₃ y este efecto era más evidente en ausencia del agente reductor DTT. El efecto del DTT favoreciendo la fosforilación AccS₆₅₃₋₉₀₃ en ausencia de agentes oxidantes también se observa en la figura 56, Panel C.

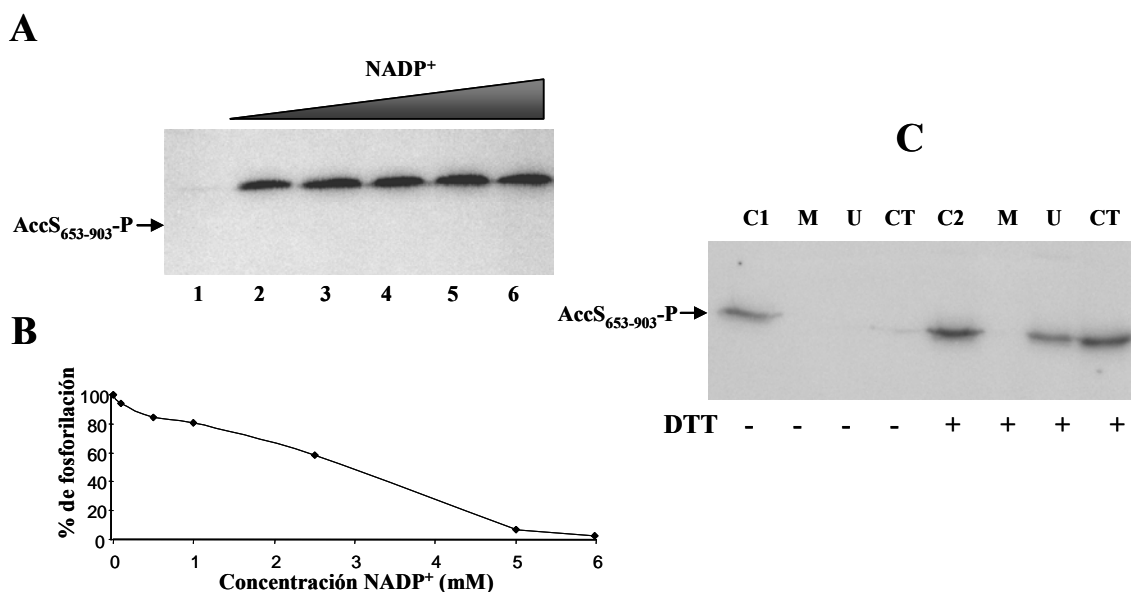


Figura 56. Actividad autoquinasa de la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ en presencia de diferentes moléculas en estado oxidado. His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ (5μM) fue autofosforilada durante 45 min en presencia de (γ³²-P) ATP, tal y como se indica en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos en presencia de diferentes moléculas en estado oxidado. **A)** Calles 1 a 6: Reacciones de autofosforilación *in vitro* de la proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ en presencia de concentraciones crecientes 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 mM de NADP⁺, respectivamente. **B)** Cuantificación de la autofosforilación de la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ en presencia de concentraciones crecientes de NADP⁺. Se representa en el eje de las ordenadas el porcentaje de fosforilación (%) y en el eje de las abscisas la concentración de NADP⁺ (en mM). **C)** Reacciones de autofosforilación *in vitro* de la proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ en presencia (+) o ausencia (-) de DTT (10 mM). La proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ fue incubada previamente a 24°C durante 10 minutos con 5 mM de menadiona (M), ubiquinona (U) o cloramina T (CT). Las calles C1 y C2 se corresponden a los controles de autofosforilación de la proteína en ausencia de los agentes oxidantes. Con una flecha se indica la banda correspondiente a la proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ autofosforilada (AccS₆₅₃₋₉₀₃-P).

Cuando se realizaron experimentos de autofosforilación de la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ en presencia de diferentes concentraciones de ubiquinona-0 y menadiona (Fig. 57), fue necesario añadir en el ensayo 10 veces menos de ubiquinona-0 (0.1 mM) que de menadiona (1 mM) para inhibir por completo la actividad autoquinasa de la proteína.

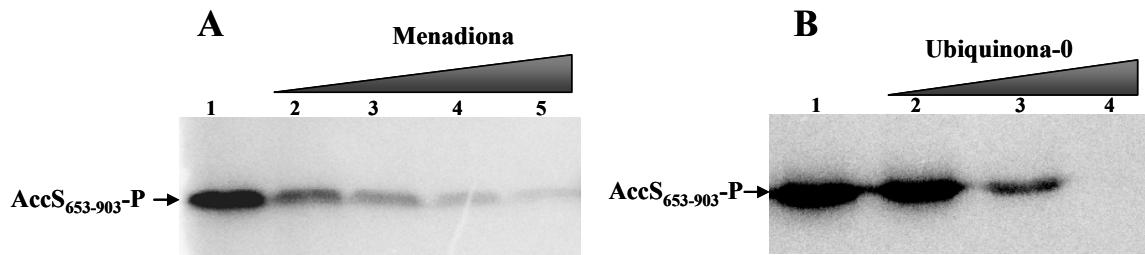


Figura 57 Actividad autoquinasa de la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ en presencia de diferentes concentraciones de ubiquinona-0 o menadiona. La proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃ (5 μ M) fue autofosforilada en presencia de (γ ³²-P) ATP y de concentraciones crecientes de menadiona o ubiquinona-0 y ausencia de DTT, tal y como se indica en el apartado 6.7 de Materiales y Métodos **A)** Calles 1 a 5, reacciones de autofosforilación *in vitro* de la proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃, incubada previamente durante 10 minutos a 24°C en presencia de 0, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM de menadiona, respectivamente. **B)** Calles 1 a 4; reacciones de autofosforilación *in vitro* de la proteína His₆AccS₆₅₃₋₉₀₃, incubada previamente durante 10 minutos a 24°C en presencia de 0, 0.001, 0.01 y 0.1 mM de ubiquinona-0, respectivamente.

Todos estos resultados sugieren que la actividad autoquinasa de AccS es dependiente del estado redox del medio, siendo necesario un estado reducido para favorecer dicha actividad enzimática. Por otro lado, es el propio dominio autoquinasa y no el dominio sensor el implicado directamente en el reconocimiento del estado redox.

V. DISCUSIÓN

1. Identificación del *cluster box* responsable de la degradación aeróbica del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB.

El benzoato se ha usado como un compuesto modelo para el estudio del catabolismo bacteriano de los compuestos aromáticos debido a su relativa alta solubilidad y baja toxicidad (Carmona *et al.*, 2009; Gibson y Harwood, 2002). En la Introducción se ha citado que algunos microorganismos han desarrollado la capacidad de degradar el benzoato tanto aeróbica como anaeróbicamente (Carmona *et al.*, 2009; Mohamed *et al.*, 2001; Rabus *et al.*, 2005). Al inicio de este trabajo se conocían en detalle muchos aspectos de la bioquímica y genética, además de los mecanismos de regulación, que algunas bacterias tales como *Azoarcus* sp. CIB utilizan para la degradación anaeróbica del benzoato (Carmona *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque experimentalmente se había comprobado que *Azoarcus* sp. CIB al igual que otros *Azoarcus/Aromatoleum* también tenía la capacidad de degradar el benzoato en condiciones aeróbicas de crecimiento (López-Barragán *et al.*, 2004), no se habían descrito los genes implicados en su degradación.

El análisis *in silico* de la secuencia del genoma de *Azoarcus* sp. CIB, recientemente obtenida en nuestro laboratorio, permitió identificar una agrupación génica de 16 genes, los cuales tenían una alta identidad ($\geq 90\%$) y presentaban una similar organización a los genes del *cluster box* que había sido descrito en *Azoarcus evansii* y está implicado en la ruta de degradación aeróbica híbrida de benzoato (Gescher *et al.*, 2002) (Fig. 13); (Tabla 6). El *cluster box* de la cepa CIB también presentaba porcentajes de identidad significativos ($\geq 80\%$) con los *clusters* génicos *box* predichos en *A. aromaticum* EbN1 (Rabus *et al.*, 2005) y *Azoarcus* sp. BH72 (Krause *et al.*, 2006). El análisis de la secuencia de los genes *box* permitió postular una ruta híbrida de degradación aeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 58). La construcción de la cepa *Azoarcus* sp. CIB***bclA***, cuyo gen *bclA* había sido mutado y la observación de que este mutante no tenía la capacidad de crecer aeróbicamente en benzoato como única fuente de carbono, confirmó la participación del *cluster box* en la degradación aeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB. La ruta híbrida *box* propuesta para *Azoarcus* sp. CIB se inicia por medio de la enzima benzoato-CoA ligasa (BclA), la cual activa el benzoato a benzoil-CoA. Posteriormente, una reductasa dependiente de NADPH (BoxA) y una benzoil-CoA 2,3-epoxidasa (BoxB), catalizarían la introducción de un átomo de oxígeno y la desaromatización del benzoil-CoA generando 2,3-epoxibenzoil-CoA. La apertura del anillo alicíclico sería llevada a cabo a continuación por la acción de la 2,3-

epoxibenzoil-CoA hidrolasa (BoxC), generando 3,4-dihidroadipil-CoA semialdehido. Este producto es, a su vez, oxidado a 3,4-dihidroadipil-CoA por la acción de la 3,4-dihidroadipil-CoA semialdehido deshidrogenasa (BoxD). El 3,4-dihidroadipil-CoA resultante experimentaría un proceso similar al de una β -oxidación en donde estarían implicadas otras enzimas de la ruta box baja (Fig. 58), identificadas como tiolasa, tioesterasa y lactonasa para finalmente ser transformado en succinil-CoA y acetil-CoA.

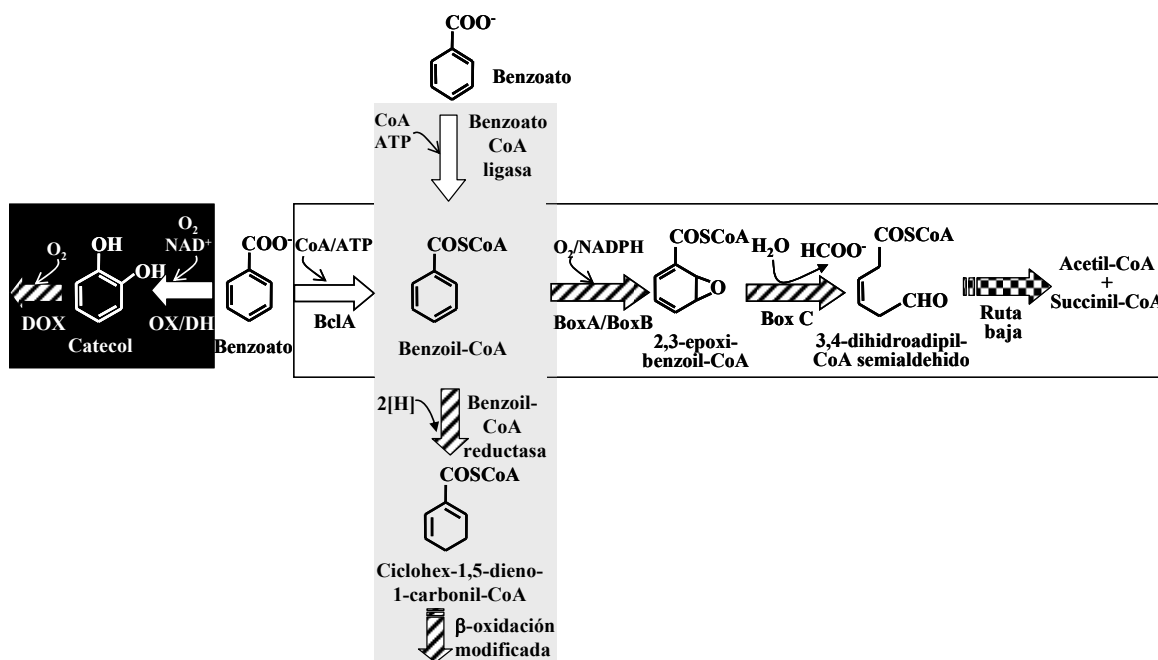


Figura 58. Estrategias bioquímicas para la degradación de benzoato en proteobacterias. Esquema de los primeros pasos bioquímicos de las vías de degradación de benzoato aeróbica (caja negra) anaeróbica (caja gris) y la ruta aeróbica híbrida box (caja blanca). Los pasos bioquímicos de activación y desaromatización/apertura del anillo aromático están indicados con flechas blancas y rayadas, respectivamente. La ruta baja box que conduce el dihidroadipil-CoA semialdehido al metabolismo central de la bacteria está representada con una flecha de cuadros. Las abreviaturas usadas son: OX, benzoato dioxigenasa; DH, benzoato dihidrodiol deshidrogenasa; DOX, catecol dioxigenasa. Las enzimas Box, responsables de la activación y desaromatización/apertura del anillo aromático son: BclA, benzoato-CoA ligasa; BoxA, reductasa dependiente de $NADPH$; BoxB, benzoil-CoA 2,3-epoxidasa; BoxC, 2,3-epoxibenzoil-CoA hidrolasa.

Aunque la ruta box fue inicialmente descrita en organismos degradadores anaeróbicos de benzoato como las β -Proteobacterias *A. evansii* y *T. aromatica*, así como en la bacteria gram-positiva *Bacillus stearothermophilus* (Zaar *et al.*, 2001; Mohamed *et al.*, 2001; Schühle *et al.*, 2003), una búsqueda en los genomas bacterianos secuenciados reveló que los genes *box* están presentes en muchas β -Proteobacterias, y en algunas δ -proteobacterias como *Sorangium cellulosum* (Gescher *et al.*, 2002; Rather *et al.*, 2010a). En la figura 59 se representa la organización de los módulos funcionales de activación (C1), desaromatización/apertura del anillo aromático (C2) y la ruta baja (C3) de los *clusters box* en Proteobacterias. Cabe destacar que la composición de los

genes y la disposición de éstos dentro del módulo de la ruta baja, puede variar incluso dentro de especies del mismo género. La organización de los módulos funcionales de los *clusters box* sigue tres patrones fundamentales.

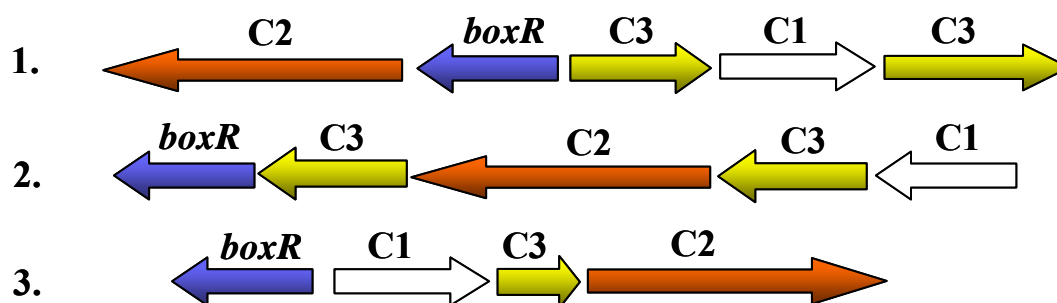


Figura 59. Esquema de los *clusters box* de Proteobacterias. Se representan los módulos de activación (C1, gen *bclA*), desaromatización/apertura del anillo aromático (C2, genes *boxABC*) y ruta baja (C3). Los módulos catabólicos C1, C2 y C3 se representan con flechas blancas, rojas y amarillas, respectivamente. El módulo regulador (gen *boxR*) se indica con flechas azules. Los tres tipos de *clusters box* se indican como 1, 2 y 3.

Los *clusters box* de tipo 1 están presentes en muchas β -Proteobacterias, que incluye algunas cepas de *Azoarcus/Aromatoleum*, *Burkholderia*, *Bordetella*, *Polaromonas*, *Rhodiferax*, *Delftia*, *Variovorax*, *Leptothrix*, *Verminephrobacter*, *Comamonas*, *Achromobacter*, *Ralstonia* o *Cupiavidus*. Los *cluster box* de tipo 2 están presentes en algunas α -Proteobacterias en donde el módulo C1 puede estar asociado, en el caso de *Silicibacter* y *Jannaschia*, o no, como en el caso de *Magnetospirillum* sp. AMB-1, al *cluster box*. Aunque tanto los *clusters box* de tipo 1 como los de tipo 2 generalmente contienen el gen *boxA* dentro del módulo C2, algunas cepas carecen de este gen. Los *clusters box* de tipo 3 están presentes en algunas α -Proteobacterias como en las cepas de *Rhodopseudomonas* y *Bradyrhizobium*, en las cuales el módulo C3 contiene un solo gen y el módulo C2 carece del gen *boxA*. Este tipo de *clusters box* también se encuentra en algunas β -Proteobacterias como *T. aromatica* en donde el módulo C3 no se encuentra entre los módulos C1 y C2, y en δ -Proteobacterias, como *Sorangium cellulosum*, en donde el gen *boxR* está orientado en posición divergente al módulo C2, el cual está compuesto por los genes *boxB* y *boxC*.

2. Regulación del *cluster box* de *Azoarcus* sp. CIB

A pesar de que la ruta *box* es importante para la degradación aeróbica de benzoato en muchas bacterias y se han investigado muchos aspectos que tienen que ver con su bioquímica y su genética en diferentes géneros bacterianos, hasta la realización de este

trabajo no se conocían los mecanismos regulatorios que controlan la expresión de los genes *box* en bacterias (Gescher *et al.*, 2002; Deneff *et al.*, 2006; Schühle *et al.*, 2003).

2.1. El gen *boxR* codifica un regulador transcripcional de los genes *box*

Al analizar la organización de los *clusters box* en proteobacterias se observó que el gen *boxR* inicialmente descrito en cepas de *Azoarcus* (Gescher *et al.*, 2002; Rabus *et al.*, 2005) y que codifica un presunto miembro de la subfamilia BzdR de reguladores transcripcionales procariotas estaba presente en la mayoría de ellos y, por lo tanto, podría constituir el modulo regulador del *cluster box* (Fig. 59).

El gen *boxR* de *Azoarcus* sp. CIB, que se corresponde con el *orf10* del *cluster box* de *A. evansii* (Gescher *et al.*, 2002), codifica una proteína de 300 aminoácidos la cual presenta un 47% de identidad en su secuencia, además de una arquitectura modular muy similar, con la del regulador transcripcional BzdR que controla los genes *bzd* responsables de la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB (Barragán *et al.*, 2005; Durante-Rodríguez *et al.*, 2010). La región N-terminal de BoxR (residuos 1 al 93) (Fig. 60), presenta una alta similitud con reguladores transcripcionales de la familia HTH-XRE, en la cual se incluyen más de 1300 proteínas de eucariotas, bacterias, arqueas y bacteriófagos, y contiene un motivo HTH, similar al motivo que caracteriza a numerosas proteínas de unión a DNA (Aravind *et al.*, 2005). Por su parte, el dominio C-terminal de BoxR (residuos 133 al 300) (Fig. 60), muestra similitud con siquimato quinazas, enzimas implicadas en la transformación del siquimato a 3P-siquimato usando ATP como sustrato en la ruta central de biosíntesis de algunos compuestos aromáticos como la ubiquinona, el ácido fólico y aminoácidos aromáticos (Gu *et al.*, 2002)

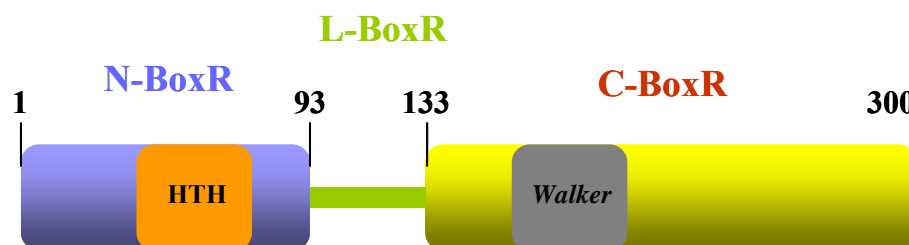


Figura 60. Arquitectura modular de la proteína BoxR. Representación esquemática de los dominios N-terminal (N-BoxR), C-terminal (C-BoxR) y *linker* (L-BoxR) de la proteína BoxR. Se representan en naranja y gris los motivos hélice-giro-hélice (HTH) y *Walker*, respectivamente.

Cabe destacar que la región C-BoxR contiene el típico motivo *Walker* o *P-loop* de unión a fosfato. La región central de BoxR (residuos 94 al 132), se corresponde con la región *linker* de BzdR implicada en la transmisión de información estructural entre los dominios N- y C-terminal (Durante-Rodríguez *et al.*, 2010).

El hecho de que la expresión del gen catabólico *boxD* en la cepa silvestre fuese inducible por benzoato mientras que en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBd*boxR*, la expresión de dicho gen fuese constitutiva (Fig 19), sugirió que el gen *boxR* codifica un represor transcripcional de los genes *box*. Por otro lado, el cluster *box* de *Azoarcus* sp. CIB está organizado en al menos dos operones divergentes (Fig 13), separados por una región de 328 pb que incluye los promotores que nombramos como P_D y P_X . Tras monitorizar la expresión de dichos promotores, midiendo la actividad β -galactosidasa de las fusiones traduccionales $P_D::lacZ$ y $P_X::lacZ$ en presencia o en ausencia del gen *boxR*, se comprobó que ambos promotores eran funcionales en *E. coli* y que su actividad está regulada negativamente por el gen *boxR* (Fig. 15)

Todos estos resultados en conjunto revelaron que el producto del gen *boxR* se comporta como un regulador transcripcional de los genes *box* en *Azoarcus* sp. CIB y es muy probable que un sistema regulador similar pueda ejercer el control transcripcional de los genes *box* en otras bacterias.

En la figura 61, se muestra un estudio filogenético de todos los miembros de la subfamilia de reguladores BzdR presentes en las bases de datos, el cual revela una buena correlación entre la posición taxonómica de cada organismo (β -, α - y δ -proteobacterias) y el nivel de identidad entre los ortólogos BoxR. El análisis filogenético también sugiere que en la evolución de los reguladores de la familia BzdR, las proteínas BoxR podrían haber dado lugar a los reguladores BzdR que han sido identificados sólo en algunas cepas de *Azoarcus/Aromatoleum*.

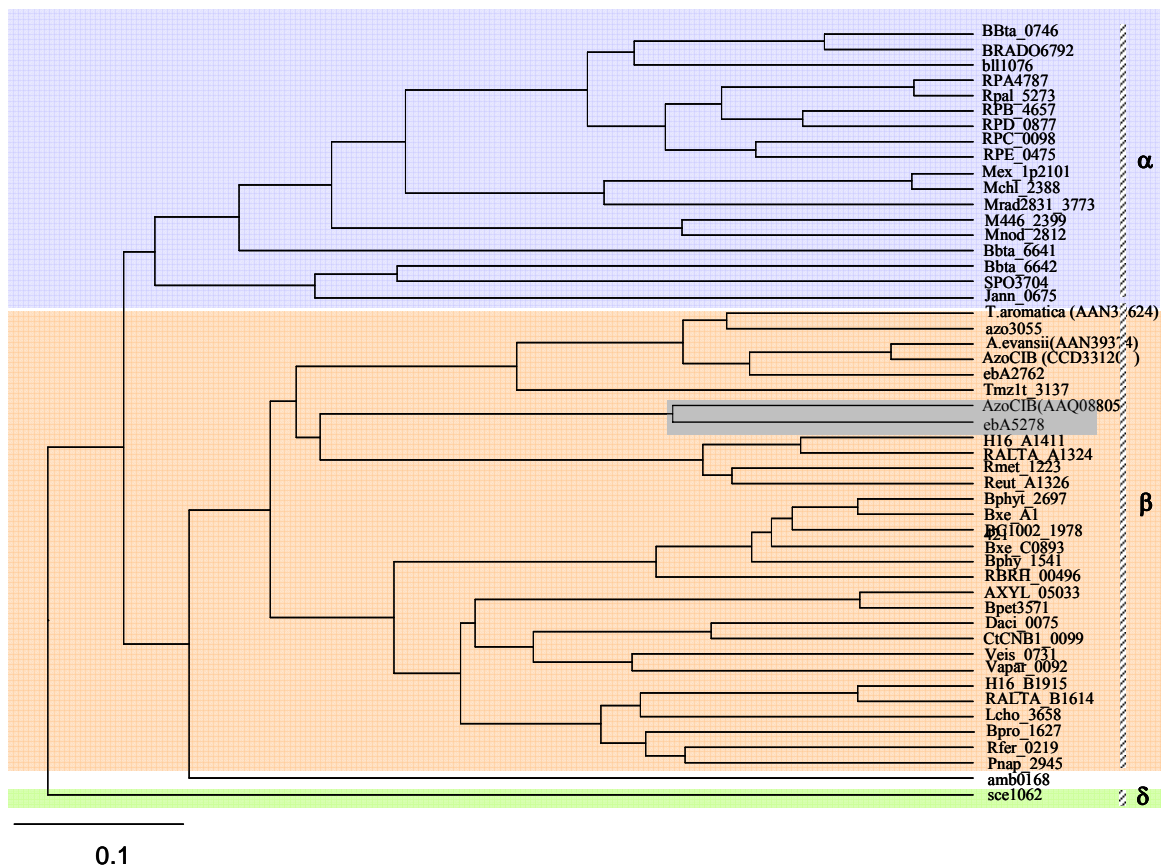


Figura 61. Árbol filogenético de los miembros de la subfamilia BzdR de reguladores transcripcionales. El alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas se realizó con el programa clustal W y el árbol filogenético se ha realizado y visualizado como se indica en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. La barra que indica la escala equivale a la sustitución de un aminoácido por cada 10. BoxR y BzdR (sombreado en gris), indican las proteínas reguladoras implicadas en los *clusters* aeróbicos (*box*) y anaeróbicos (*bzd*), respectivamente. α , β y δ , representan los subgrupos α - (azul), β - (rosa) y δ -(verde) de Proteobacterias, respectivamente. Las proteínas están indicadas por su correspondiente número de identificación del genoma o su número de acceso (en corchetes). Las abreviaturas de las cepas bacterianas son: A.evansii; *Azoarcus evansii*; amb, *Magnetospirillum magneticum* AMB-1; AXYL, *Achromobacter xylosoxidans*; Azo, *Azoarcus* sp. BH72; AzoCIB, *Azoarcus* sp. CIB; BBta; *Bradyrhizobium* sp. BTAi1; BC1002, *Burkholderia* sp. CGE1002; Bll, *Bradyrhizobium japonicum* USDA; Bpet, *Bordetella petrii*; Bphy, *Burkholderia phymatum*; Bphyt, *Burkholderia phytofirmans*; Bpro, *Polaromonas* sp. JS666; BRADO, *Bradyrhizobium* sp. ORS278; Bxe; *Burkholderia xenovorans*; CtCNB1, *Comamonas testosteroni*; Daci, *Delftia acidovorans*; EbA, *Aromatoleum aromaticum* EbN1; H16, *Ralstonia eutropha* sp. H16; Jann, *Jannaschia* sp. CCS1; Lcho, *Leptothrix cholodnii*; Mchl, *Methylobacterium chloromethanicum*; Mex, *Methylobacterium extorquens* AM1; Mnod, *Methylobacterium nodulans*; Mrad, *Methylobacterium radiotolerans*; M446, *Methylobacterium* sp. 4-46; Pnap, *Polaromonas naphthalenivorans*; RALTA, *Cupriavidus taiwanensis*; RBRH, *Burkholderia rhizoxinica*; Reut, *Cupriavidus necator* JMP134; Rfer, *Rhodiferax ferrireducens*; Rmet, *Ralstonia metallidurans*; RPA, *Rhodopseudomonas palustris* CGA009; Rpal, *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1; RPB, *Rhodopseudomonas palustris* HaA2; RPC, *Rhodopseudomonas palustris* BisB18; RPD, *Rhodopseudomonas palustris* BisB5; RPE, *Rhodopseudomonas palustris* BisA53; sce, *Sorangium cellulosum*; SPO, *Silicibacter pomeroyi*, T. aromatica, *Thauera aromatica*; Tmz1t, *Thauera* sp. MZ1T; Vapar, *Variovorax paradoxus*; Veis, *Verminephrobacter eiseniae*.

2.2. Caracterización molecular de la interacción del regulador BoxR con los promotores P_D y P_X

Previo al estudio de la interacción del producto del gen *boxR* con los promotores P_D y P_X , se identificó el sitio de inicio de la transcripción (+1) de ambos promotores mediante experimentos de extensión por cebador (Fig. 16). Como resultado de estos estudios se identificó una caja -35 idéntica en ambos promotores (TTGACG), la cual difiere en una base respecto a la consenso (TTGACA) y dos cajas -10 muy similares (TATTC/GT) que difieren en tres (P_D) y dos (P_X) bases respecto a la secuencia consenso de los promotores dependientes del factor σ^{70} de la RNA polimerasa de *E. coli* (Dombroski, 1997). La distancia que existe entre las cajas -10 y -35 del promotor P_X coincide con la distancia consenso (17 pb), mientras que en el caso del promotor P_D es de 16 pb (Fig. 40).

Con el objetivo de disponer de la suficiente cantidad de proteína BoxR para su purificación y posterior utilización en experimentos de interacción *in vitro* con el DNA, el gen *boxR* se clonó en un sistema de hiperexpresión bajo el control de un promotor fuerte y regulado, derivado del promotor P_{T5} del fago T5, generando el plásmido recombinante pQE32-His₆BoxR (Tabla 4); (Fig. 20). Aunque se llegaron a obtener fracciones puras de BoxR a concentraciones superiores a 1mg/ml, desafortunadamente la proteína presentó una baja estabilidad y formó agregados inactivos. Por esta razón, se decidió utilizar extractos celulares de la cepa *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-His₆BoxR) como fuente de la proteína BoxR activa. La interacción *in vitro* de la proteína BoxR con los promotores P_D y P_X , y la especificidad de la unión, se comprobó mediante experimentos de retardo en gel (Fig. 22 y Fig. 23). El dominio C-terminal de BoxR muestra una similitud significativa con el dominio C-terminal del regulador BzdR (Fig. 18) implicado en la interacción con la molécula inductora benzoil-CoA (Durante-Rodríguez *et al.*, 2010). Por otro lado, al igual que en la ruta *bzd* de degradación anaeróbica de benzoato, el benzoil-CoA es el primer intermediario de la ruta *box* de degradación aeróbica de benzoato. Estas dos observaciones sugerían que el benzoil-CoA podría ser la molécula inductora que controlase la expresión de los genes *box*. Esta hipótesis se comprobó tras la adición de benzoil-CoA a los ensayos de retardo en gel, observándose que inhibía la formación del complejo boxDR/BoxR. Por el contrario, la adición de otros compuestos aromáticos como benzoato o fenilacetil-CoA no causaba ningún efecto en la interacción de BoxR con los promotores P_D y P_X (Fig. 24). Estos

resultados sugerían que el benzoil-CoA es la molécula inductora de los genes *box* en *Azoarcus* sp. CIB.

Experimentos de *footprinting* con DNasa I, mostraron que la proteína BoxR protege la región intergénica *boxD-boxR* y esta protección desaparece específicamente en presencia del inductor benzoil-CoA (Fig. 25). Al igual que ocurre con BzdR en el promotor catabólico P_N de la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB (Barragán *et al.*, 2005; Durante-Rodríguez *et al.*, 2010), la unión de la proteína BoxR al DNA induce cambios en la estructura de éste, como lo demuestra la aparición de bandas de hipersensibilidad a la digestión con la DNasa I. Las bandas de hipersensibilidad están espaciadas a intervalos aproximados de 10 nucleótidos (Fig. 25), lo que se corresponde con una vuelta de hélice, y sugiere que BoxR se une a una sola cara de la doble hélice. La zona de protección que genera BoxR en los promotores P_D y P_X abarca tanto los sitios de inicio de la transcripción como también las secuencias -10 y -35 de reconocimiento del factor σ^{70} de la RNA polimerasa (RNAP) (Fig 25), lo que sugiere que BoxR podría inhibir la formación del complejo cerrado RNAP-DNA y estaría de acuerdo con su papel de represor sobre ambos promotores (Fig. 15). La región de los promotores protegida por BoxR contiene varias repeticiones directas de la secuencia TGC(A), secuencia que en algunos casos se organiza en estructuras palindrómicas más largas (Fig 17). La arquitectura de estos promotores, basada en repeticiones cortas directas, se asemeja a la de otros promotores regulados por miembros de la familia de reguladores transcripcionales HTH-XRE como es el caso del regulador SinR de *Bacillus subtilis* (Cervin *et al.*, 1998), el represor 434 del bacteriófago 434 (Sauer *et al.*, 1982) o la proteína Cro del bacteriófago λ (Ladero *et al.*, 2002). En este contexto, las repeticiones directas TGCA también están presentes en el promotor P_N que controla el operón anaeróbico *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB y habían sido propuestas como los sitios de reconocimiento de BzdR (Barragán *et al.*, 2005; Durante-Rodríguez *et al.*, 2010). Esta observación está de acuerdo con el hecho de que los reguladores BoxR y BzdR contengan un dominio hélice-giro-hélice (HTH) de unión a DNA muy similar (Fig. 17) y sugiere un mecanismo de reconocimiento del DNA diana análogo para los dos reguladores.

Todos estos resultados en conjunto muestran por primera vez que BoxR y el benzoil-CoA actúan como el regulador específico e inductor, respectivamente, que controlan la expresión de los genes de la ruta híbrida *box*. Teniendo en cuenta que el gen *boxR* se encuentra presente en todos los *clusters box* identificados (Fig. 59), el

sistema regulador BoxR/benzoil-CoA podría ser estrategia general en bacterias para el control transcripcional de la degradación aeróbica de benzoato a través de la ruta híbrida box. Por otro lado, este trabajo sugiere que el benzoil-CoA es el inductor que comparten todos los miembros de la subfamilia BzdR de reguladores transcripcionales.

En la figura 62, se representa un modelo de la regulación de los genes *box*, propuesto en base a los resultados que se han presentado en este trabajo y los resultados previos obtenidos con el cluster *box* de *A. evansii* que indicaban la co-transcripción de los genes *box* en dos operones divergentes (Gescher *et al.*, 2002).

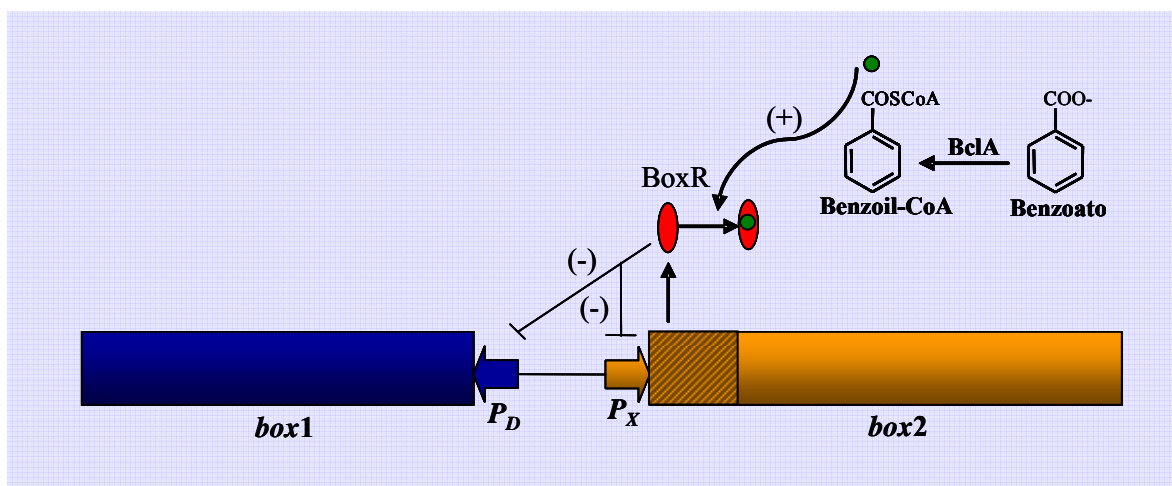


Figura 62. Modelo propuesto para la regulación de los genes *box* en *Azoarcus* sp. CIB. Con barras amarilla y azul se representan los operones (*box1* y *box2*) que conforman el cluster *box*, respectivamente. Las flechas azul y amarilla representan los promotores P_D y P_X , respectivamente. El gen *boxR*, se representa con un rayado diagonal. La proteína BoxR (óvalo rojo) reprime (-) los promotores P_D y P_X en ausencia de la molécula inductora benzoil-CoA (círculo verde). El benzoato es transformado en benzoil-CoA por medio de una benzoato-CoA ligasa, e interactúa con BoxR, impidiendo su unión a los promotores P_D y P_X , permitiendo así la inducción (+) de los genes *box*.

Cuando *Azoarcus* sp. CIB crece aeróbicamente en ausencia de benzoato, la expresión basal del operón *box2* genera una cantidad suficiente de proteína BoxR que se une a los promotores P_D y P_X y contribuye a mantener bajos niveles de actividad de dichos promotores y, por ende, los niveles de expresión basales de los operones *box1* y *box2* (Fig. 19). Así mismo, la expresión basal del gen *bclA* localizado en el operón *box1* (Fig. 62) genera una cantidad suficiente de ligasa BclA como para que se generen suficientes niveles del inductor benzoil-CoA cuando *Azoarcus* sp. CIB encuentra benzoato en el medio de cultivo. La formación de benzoil-CoA dispara la desrepresión de los genes *box* interaccionando con el represor BoxR e impidiendo su unión a los promotores P_D y P_X . La inducción de la expresión de los genes *box* permite la degradación eficiente del benzoato a través de las enzimas Box así como un incremento en los niveles de

regulador BoxR que permitirá una rápida y eficaz represión de la ruta cuando el benzoato ya no sea la fuente de carbono utilizada por *Azoarcus* sp. CIB.

3. Estudio del papel del oxígeno en la expresión de los genes del cluster box

Teniendo en cuenta que *Azoarcus* sp. CIB es un organismo anaerobio facultativo, la disponibilidad de oxígeno en el medio es un factor ambiental muy importante a la hora de controlar la expresión génica en esta bacteria. El papel del oxígeno en la expresión de genes implicados en la degradación de compuestos aromáticos ha sido estudiado en diferentes microorganismos (Ver apartado 3.2.1 de la Introducción) En el caso del *cluster bzd* de *Azoarcus* sp. CIB, se ha demostrado que el oxígeno inhibe la expresión de dichos genes, los cuales son activados en anaerobiosis por el regulador transcripcional AcpR (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006).

Para comprobar si el oxígeno también controlaba la expresión de los genes *box* en *Azoarcus* sp. CIB, se monitorizó la expresión de los genes *boxD* y *boxR* mediante RT-PCR a tiempo real en células creciendo en benzoato en ausencia o en presencia de oxígeno, y se comprobó que la expresión de ambos genes no se vio afectada por la disponibilidad de oxígeno en el medio (Fig. 26). Este resultado fue corroborado midiendo la actividad β -galactosidasa de las fusiones traduccionales $P_X::lacZ$ y $P_D::lacZ$ en células de *E. coli* CC118 en donde ambos promotores fueron activos y eficientemente reprimidos por BoxR en condiciones anaeróbicas (Fig. 27). En conclusión estos resultados revelaron que la actividad de los promotores P_D y P_X es independiente de la disponibilidad de oxígeno. Una expresión independiente de los niveles de oxígeno ya había sido descrita previamente para algunas rutas aromáticas anaeróbicas como es el caso de los genes *bcr* de *M. magnetotacticum* TS-6 (Shinoda *et al.*, 2004) o los genes *bss* de *Thauera* sp. DNT-1 (Shinoda *et al.*, 2005), aunque el significado biológico de la expresión aeróbica de rutas anaeróbicas era desconocido hasta la fecha.

Con la fin de entender el significado de la expresión de los genes *box* en condiciones anaeróbicas, se monitorizó el crecimiento anaeróbico en benzoato de la cepa silvestre *Azoarcus* sp. CIB y de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdbclA que carece del gen *bclA* activo que codifica la benzoato-CoA ligasa aeróbica. Curiosamente, la cepa mutante presentó una fase de latencia de crecimiento alrededor de 10 h más larga que la de cepa silvestre (Fig. 28) y dicho fenotipo no fue observado en otras fuentes de

carbono no aromáticas tales como succinato o glutarato (datos no mostrados). Estas observaciones sugieren que el producto del gen *bclA* facilita la inducción de la degradación anaeróbica de benzoato, lo cual está de acuerdo con el hecho de que el benzoil-CoA, producto de la reacción que cataliza la enzima BclA, también sea el inductor y el primer intermediario de la ruta *bzd*. De esta manera, se podría proponer que una acción sinérgica de las benzoato-CoA ligasas aeróbica (BclA) y anaeróbica (BzdA) en la formación de la molécula inductora benzoil-CoA facilitaría la inducción de los genes *bzd* en condiciones anaeróbicas y requeriría, por ello, de la expresión anaeróbica del gen *bclA*.

Por otro lado, un problema importante para bacterias que degradan compuestos aromáticos anaeróbicamente como en el caso de *Azoarcus* sp. CIB, es la extrema sensibilidad al oxígeno por parte de la benzoil-CoA reductasa, la cual se inactiva irreversiblemente después de muy pocos segundos de exposición al mismo (Boll y Fuchs, 1995). Por esta razón, estas bacterias han desarrollado estrategias de detoxificación de las trazas de oxígeno cuando crecen en condiciones anaeróbicas. Así, por ejemplo, se ha postulado que la enzima ciclohexa-1,5-diene-1-carbonil-CoA oxidasa, la cual se induce significativamente en bacterias que crecen anaeróbicamente en benzoato, representa una herramienta enzimática para eliminar rápidamente las trazas de oxígeno molecular. (Thiele *et al.*, 2008). La expresión de la ruta *box*, la cual tiene una alta afinidad por el oxígeno molecular y por lo tanto podría ser funcional bajo condiciones microaeróbicas (Fuchs, 2008), podría ser otra estrategia de detoxificación de oxígeno y, al mismo tiempo, contribuir también a incrementar el rendimiento energético del consumo anaeróbico de benzoato, ya que parte de este podría ser metabolizado a través de la ruta *box*. Por otro lado, la expresión anaeróbica de rutas aeróbicas podría ser beneficiosa en bacterias anaerobias facultativas, como algunas cepas del género *Azoarcus*, que habitan en ambientes cuyos gradientes de oxígeno fluctúan constantemente (Fuchs, 2008; Carmona *et al.*, 2009). En este sentido, teniendo en cuenta que el benzoil-CoA es el intermediario común tanto de la ruta anaeróbica como de la ruta aeróbica de degradación del benzoato, la expresión de la ruta *box* sería beneficiosa si tras una repentina exposición al oxígeno el benzoil-CoA formado por la ruta anaeróbica puede ser usado directamente y transformado en metabolitos centrales por una ruta aeróbica más favorable energéticamente.

4. Regulación cruzada entre las rutas *box* y *bzd* de degradación de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Como se ha mostrado en el apartado 3.1 de los Resultados, el gen *boxR* se expresa tanto en condiciones aeróbicas como en condiciones anaeróbicas en *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 26). Por su parte, el gen *bzdR* que codifica el regulador transcripcional específico de los genes *bzd*, también se expresa en ambas condiciones (Durante-Rodríguez *et al.*, 2008) y los niveles de expresión no difieren significativamente de los del gen *boxR* (Fig. 26). Además, los reguladores transcripcionales BoxR y BzdR de las rutas *box* y *bzd*, respectivamente, comparten una alta identidad de secuencia y una organización modular muy similar (Fig. 18), por otro lado, BoxR y BzdR comparten características similares de unión al DNA (Fig. 16), ambos reguladores utilizan benzoil-CoA como molécula inductora (Fig. 23 y 24) y parecen compartir una estrategia similar de represión solapando con las cajas -10 y -35 de los correspondientes promotores catabólicos de las rutas *box* y *bzd*. Todas estas observaciones nos permitieron plantear la hipótesis de una regulación cruzada entre la ruta aeróbica y la ruta anaeróbica de degradación de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB.

Experimentos *in vitro* de retardo en gel indicaron que BoxR y BzdR se unen a sus promotores heterólogos P_N y P_X/P_D , respectivamente (Fig. 29, Panel A y Panel B), con una eficiencia de unión similar a la mostrada con los promotores de sus rutas correspondientes (Fig. 29, Panel C y Fig. 21). Experimentos *in vivo* basados en el análisis de los niveles de actividad β -galactosidasa, demostraron que el regulador BoxR inhibía la actividad del promotor P_N en condiciones anaeróbicas de forma equivalente a la inhibición causada por su regulador específico BzdR. De forma similar, el regulador BzdR inhibió la actividad de los promotores P_X (Fig. 30, Panel B) y P_D (Fig. 30, Panel C) en condiciones aeróbicas, con la misma eficiencia que el represor BoxR de la ruta aeróbica (Fig. 27). Todos estos resultados indicaron que BoxR y BzdR son capaces de unirse y reprimir la actividad tanto del promotor P_N de la ruta anaeróbica, como de los promotores P_X y P_D , de la ruta aeróbica sugiriendo que ambos reguladores podrían controlar de forma conjunta la expresión de los genes *box* y *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB.

El hecho de que la actividad de los promotores P_N y P_D en la cepa doble mutante *Azoarcus* sp. CIB *dbboxRbzdR* bajo condiciones de no inducción (alanina) sea similar a la de la cepa silvestre creciendo en condiciones de inducción (benzoato) y alrededor de cien veces superior a la actividad de los promotores P_N y P_D en la cepa silvestre creciendo en alanina (Fig. 31), confirmó que BoxR y BzdR actúan de forma sinérgica

para controlar eficientemente la represión de los dos operones catabólicos de las rutas *box* y *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB. Por otro lado, los valores de expresión de P_N en las cepas *Azoarcus* sp. CIB*dbboxR* y *Azoarcus* sp. CIB*dbzdR* indicaron que el promotor P_N estaba reprimido con una mayor eficiencia por BzdR que por BoxR (Fig. 31), lo cual sugiere que BzdR es el principal represor de los genes *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB. En el caso del promotor P_D , los valores de actividad determinados en las cepas mutantes *Azoarcus* sp. CIB*dbboxR* y *Azoarcus* sp. CIB*dbzdR* (Fig. 31), revelaron que tanto BoxR como BzdR juegan un papel relevante en el control del promotor P_D en la cepa CIB.

Todos estos resultados en conjunto indican la existencia de una regulación transcripcional cruzada entre las rutas aeróbica y anaeróbica de degradación de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB. Existen algunos sistemas descritos de regulación cruzada entre distintas rutas de degradación de compuestos aromáticos en el mismo organismo. Así por ejemplo los reguladores BenM (ruta *orto*) y XylS (ruta *meta*) están ambos implicados en la activación de la ruta de degradación del benzoato de *Pseudomonas putida*, (Cowles *et al.*, 2000). En *Acinetobacter bailyi* ADP1, BenM y CatM controlan sinérgicamente la activación de los genes *ben* y *cat* para la degradación de benzoato y la represión de los genes *pca* para la degradación de protocatecuato (Bleichrodt *et al.*, 2010; Brzostowicz *et al.*, 2003; Ezezika *et al.*, 2006). En *Rhodococcus jostii* RHA1, dos sistemas reguladores de dos componentes BphS1T1 y BphS2T2 inducen la activación de los genes implicados en la degradación de bifenilos (Takeda *et al.*, 2010). En *Pseudomonas putida* 86, el regulador XylS y su ortólogo OxoS controlan la activación de los operones encargados de la degradación de quinolina (Carl y Fetzner, 2005). También se han descrito algunos casos de regulación cruzada entre elementos reguladores pertenecientes a diferentes organismos como en el caso de los promotores *Ptbul* y *PtbMA* de los operones que codifican la tolueno monooxigenasa en *Burkholderia pickettii* PK01 y *Burkholderia* sp. JS150, y sus respectivos reguladores TbuT y TbmR (Ambos de la familia XylR/DmpR). (Leahy *et al.*, 1997). Otro ejemplo, lo constituyen los promotores P_{mox} y P_{tox} de los operones de degradación de tolueno en *P. mendocina* XR1 y *P. putida* DOT-T1E, los cuales pueden estar activados indistintamente por los sistemas reguladores de dos componentes TmoS/TmoT o TodS/TodT (Ramos-González *et al.*, 2002). Sin embargo, la fecha no se conocía ningún mecanismo de regulación cruzada entre una ruta de degradación aeróbica y otra aneróbica, siendo la acción sinérgica de represión de los reguladores BoxR y BzdR

sobre los promotores catabólicos P_N y P_D , el primer ejemplo de este tipo descrito en bacterias.

5. Aspectos adaptativos y evolutivos de los genes ortólogos *boxR* y *bzdR*

Las proteínas BoxR y BzdR de *Azoarcus* sp. CIB son ortólogas y actúan conjuntamente en control eficaz de la expresión de los clusters *box* y *bzd*. Esta redundancia genética plantea la cuestión acerca de la ventaja que le supone a *Azoarcus* sp. CIB la presencia en su genoma de una copia del gen *boxR* y otra copia del gen *bzdR*. En primer lugar una redundancia genética o funcional de reguladores es una sencilla solución evolutiva para un mejor control de los circuitos de regulación (Teichmann y Babu, 2004), y puede ayudar a contrarrestar las fluctuaciones en los distintos parámetros bioquímicos y en los mecanismos moleculares implicados en la regulación génica (Silva-Rocha y de Lorenzo, 2010). Por otro lado, la existencia de los genes ortólogos *boxR* y *bzdR* en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB podría favorecer la viabilidad celular en algunas condiciones de crecimiento en las que la bacteria no metaboliza benzoato. Así, cuando se comparó la viabilidad celular de la cepa silvestre con la de cepa doble mutante *Azoarcus* sp. CIBd*boxRbzdR* en una fuente de carbono no selectiva (e.g. glutarato) se observó que la viabilidad celular disminuyó considerablemente en la cepa doble mutante (aproximadamente dos ordenes de magnitud) (Fig. 32). Por el contrario, las cepas con mutación única *boxR* o *bzdR* presentaron tan solo un aligera disminución en viabilidad celular con respecto a la de la cepa silvestre (Fig. 32). Estos resultados sugieren que la presencia de los genes *boxR* y *bzdR* en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB contribuye a la viabilidad de la célula, no sólo controlando la expresión basal de los genes *box/bzd* en ausencia de benzoato sino preparando una salvaguarda que le permite a la célula, en el caso de producirse un fallo ocasional en un gen regulador, controlar los genes *box/bzd* con el regulador ortólogo. No obstante, teniendo en cuenta que el gen *boxR* también se encuentra presente en algunas bacterias que carecen del cluster *box*, como en *R. palustris* (Larimer *et al.*, 2004), o en algunas cepas de *Methylobacterium* spp, no se puede descartar el hecho de que este regulador pueda controlar otro tipo de funciones en la célula bacteriana que repercutan en la viabilidad de la misma.

Algunas bacterias como *T. aromatica* y cepas de *Magnetospirillum* spp que degradan benzoato aeróbicamente, mediante la ruta *box*, y anaeróbicamente, a través de la ruta *bzd*, comparten la misma benzoato-CoA ligasa (gen *bclA*) para ambas rutas y además tienen una sola copia del gen *boxR* asociada al cluster *box* en sus genomas. Al

contrario, las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *A. aromaticum* EbN1, contienen dos parejas regulador/ligasa diferentes, una asociada a la ruta aeróbica (regulador BoxR/ligasa BclA) y otra a la ruta anaeróbica (regulador BzdR/ligasa BzdA) (Barragán *et al.*, 2005; Rabus *et al.*, 2005). Esta observación sugiere que estas cepas de *Azoarcus* pueden haber reclutado en su genoma un circuito de regulación adicional, homólogo al de la ruta box, para controlar la expresión de los genes *bzd*. En ese sentido, en esta tesis se ha comprobado que el represor BoxR no es capaz de reprimir eficientemente el promotor anaeróbico P_N , siendo el represor BzdR el principal represor de los genes *bzd* (Fig. 31). A pesar de que las proteínas BoxR y BzdR pertenezcan a la misma subfamilia BzdR de reguladores transcripcionales, los reguladores anaeróbicos BzdR de cepas de *Azoarcus/Aromatoleum* se agrupan en una rama del árbol filogenético separada de la de los reguladores BoxR de estas mismas bacterias (Fig. 61). Esta observación sugiere que aunque ambos tipos de reguladores puedan tener un ancestro común, se han separado y adaptado a su correspondiente ruta metabólica.

Las secuencias de nucleótidos de los genes *boxR* y *bzdR* de *Azoarcus* sp. CIB, difieren en 379 nt del total de 894 nt, lo cual sugiere que la duplicación de estos genes no ocurrió recientemente o que ambos genes tienen diferentes orígenes bacterianos. En este sentido, se llevó a cabo un análisis del CAI (*Codon Adaptation Index*), el cual permite inferir el grado de adaptación de los genes al genoma del microorganismo (Sharp y Li, 1987). Los valores próximos a 1 revelan una mayor identidad en el uso de codones del gen analizado con el uso de codones promedio del genoma (calculado con todas las ORFs codificantes de proteínas del genoma), lo que sugiere una mayor adaptación del gen en cuestión al genoma de la célula huésped. De esta manera, mientras el contenido GC del gen *boxR* (66.4%) coincide con el contenido GC del genoma (65.8%) y muestra un elevado valor del CAI (0.81), el contenido GC del gen *bzdR* (62.8%) difiere del promedio GC del cromosoma de *Azoarcus* sp. CIB y muestra un valor CAI bajo (0.66). A su vez, el gen *bzdA* también muestra un CAI (0.69) significativamente menor al de otros genes *bzd* y al de su gen homólogo de la ruta aeróbica *bclA* (0.8). Teniendo en cuenta que las variaciones en el contenido GC y en el CAI han sido tomadas como indicadores de eventos de transferencia horizontal de genes (Puigbo *et al.*, 2008), es probable que los genes *bzdR* y *bzdA* puedan haber sido reclutados por el *cluster* catabólico *bzd* de alguna cepa de *Azoarcus* a partir del *cluster* *box* de un organismo diferente. El gen *bzdR* reclutado podría haber evolucionado posteriormente hacia un control más eficaz de degradación anaeróbica de benzoato pero

conservando parcialmente el control sobre la ruta aeróbica box, lo cual podría explicar la regulación cruzada demostrada con los resultados de esta tesis doctoral. La regulación cruzada entre las rutas aeróbica y anaeróbica de degradación de benzoato podría reflejar una estrategia biológica para incrementar la viabilidad celular en organismos que, al igual que *Azoarcus* sp. CIB, sobreviven en ambientes sujetos a cambios en las concentraciones de oxígeno.

6. Estudios sobre la regulación sobreimpuesta mediada por fuentes de carbono en la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Los resultados discutidos anteriormente revelan que sumado a la regulación específica mediada por BzdR, existe un tipo de regulación cruzada en la cual el regulador transcripcional BoxR contribuye a un control más estricto de la actividad del promotor P_N . Sobreimpuesta a la regulación específica, existe una regulación global que responde a diferentes señales medioambientales, una de ellas es el oxígeno, capaces de afectar la expresión de los genes en los microorganismos. En este contexto, se describió que la proteína AcpR es indispensable para la activación de los genes *bzd* en condiciones anaeróbicas de crecimiento de las células de *Azoarcus* sp. CIB (ver apartado 2.2.1 de la Introducción) (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006).

Por otro lado, el control del catabolismo dependiente de la disponibilidad de fuentes de carbono es uno de los mecanismos globales de regulación más extendidos en bacterias, confiriendo una ventaja adaptativa al establecer prioridades en el metabolismo del carbono. Este tipo de regulación, conocido como represión catabólica por carbono (CCR), engloba toda una serie de procesos reguladores que aseguren la máxima eficiencia energética cuando la bacteria crezca en un medio con diferentes fuentes de carbono, de forma que en presencia de una fuente de carbono preferente no se induzcan rutas de degradación de fuentes de carbono no preferentes, incluso estando sus correspondientes inductores presentes en el medio (Cases y de Lorenzo, 2005; Gorke y Stulke, 2008; Rojo, 2010; Bains *et al.*, 2009). El catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos también está sometido al fenómeno CCR, aunque se desconoce la base molecular que interviene en su control. Así, en *Azoarcus* sp. CIB los genes *bzd* están sujetos a la represión que ejercen algunas fuentes de carbono preferenciales, como el succinato y otros ácidos orgánicos, sobre el promotor P_N en la degradación anaeróbica del benzoato (López-Barragán *et al.*, 2004; Lopez Barragán *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta la fecha se desconocían los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en la represión catabólica por fuentes de carbono sobre el promotor P_N . Identificar y caracterizar algunos de estos mecanismos constituyó uno de los objetivos principales de esta tesis.

Como se ha indicado en la Introducción, la β -Proteobacteria *Acidovorax* sp. KKS102 contiene en su genoma el operón *bph*, responsable de la degradación aeróbica

de PCB/bifenilos y cuyo promotor (*pE*) está sometido a represión catabólica por succinato, acetato y fumarato. El gen *bphQ* codifica un regulador de respuesta perteneciente a la familia FixJ/NarL de reguladores transcripcionales y activa el promotor *pE* en presencia de fuentes de carbono no preferenciales siendo el único ejemplo descrito hasta la fecha en β -Proteobacterias de un regulador implicado en una respuesta CCR del catabolismo de compuestos aromáticos (Ohtsubo *et al.*, 2006). Con este precedente se llevó a cabo una búsqueda en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB encontrándose un ortólogo del gen *bphQ*, el cual se encuentra localizado en posición 3' a un gen ortólogo al gen *bphP* de *Acidovorax* sp. KKS102 (Ohtsubo *et al.*, 2006), que codifica una presunta proteína histidina quinasa. Estos dos genes denominados *accR* (*aromatic carbon catabolite regulador*) y *accS* (*aromatic carbon catabolite sensor*), constituyen el presunto sistema regulador de dos componentes AccSR que podría mediar la respuesta CCR en *Azoarcus* sp. CIB cuando este microorganismo se cultiva anaeróbicamente en benzoato en presencia de otras fuentes de carbono tales como ciertos ácidos orgánicos.

6.1. El regulador de respuesta AccR controla la CCR de la ruta *bzd*

El gen *accR* codifica una proteína de 212 aminoácidos, la cual presenta una identidad en su secuencia $\geq 50\%$ con el regulador de *Acidovorax* sp. KKS102 BphQ. La cepa portadora del gen *accR* deletado (*Azoarcus* sp. CIB $\Delta accR$), mostró un crecimiento similar al de la cepa silvestre cultivada en benzoato en ausencia de oxígeno, lo que sugería que el gen *accR* no codificaba un activador del promotor P_N . Por otro lado, ensayos de RT-PCR a tiempo real demostraron que el promotor P_N está sujeto a represión catabólica por succinato, confirmando resultados previos (Lopez Barragán *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando se analizó la actividad de P_N los niveles detectados en la cepa *Azoarcus* sp. CIB $\Delta accR$ creciendo en condiciones de represión catabólica, fueron similares a los de la cepa silvestre creciendo en condiciones de inducción. (Fig. 33). Cuando dicha cepa mutante fue complementada con el gen *accR*, este fue capaz de restaurar el fenotipo de represión catabólica sobre P_N , similar al de la cepa silvestre (Fig. 33). Estos resultados demostraron que el gen *accR* está implicado en el control de la CCR sobre los genes *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB. Por otro lado, estos datos sugirieron que el producto génico de *accR* ejerce un control negativo sobre P_N , causando represión del operón catabólico *bzd* en presencia de fuentes de carbono no preferentes, tales como el succinato. Este resultado difiere claramente de lo reportado en *Acidovorax* sp. KKS102,

en donde el control de la represión catabólica ejercida por ácidos orgánicos sobre el operón *bph*, está sujeto a la activación del promotor catabólico *pE* a través del regulador de respuesta BphQ (Ohtsubo *et al.*, 2006).

Cuando se llevó a cabo un alineamiento de la proteína AccR con otros reguladores de respuesta (Fig. 63), se puso de manifiesto que AccR pertenecía a la familia FixJ/NarL, cuyos miembros destacan por su diversidad de funciones biológicas. AccR mostró una identidad significativa con reguladores de respuesta tales como BphQ de *Acidovorax* sp KKS102 (53% de identidad), StyR de *Pseudomonas. fluorescens* (45% de identidad), activador transcripcional de los genes responsables de la degradación aeróbica del estireno, FixJ de *Bradyrhizobium japonicum* (46% identidad) y NarL de *Escherichia coli* (29 % de identidad), implicados en la fijación de nitrógeno y la respiración de nitrato, respectivamente. BvgA de *Bordetella pertusis* (27% de identidad), regulador de factores de virulencia. También se encontró un alto grado de identidad con posibles ortólogos AccR en *Azoarcus* sp. KH32C; 88% de identidad, “*Aromatoleum aromaticum*” EbN1; 80% de identidad y *Azoarcus* sp. BH72 N° de; 78% de identidad.

Los reguladores pertenecientes a la familia FixJ/NarL, se caracterizan por tener dos dominios claramente diferenciados. En el caso de AccR se encuentran separados por un *linker* de 23 aminoácidos (Fig 40). El dominio N-terminal de los reguladores de la familia FixJ contienen un dominio REC (*receiver*), el cual cataliza las reacciones de fosforilación y defosforilación, por otro lado, el dominio C-terminal contiene un dominio HTH de unión a DNA.

Aunque *in vivo*, los reguladores de respuesta, normalmente reciben el grupo fosfato de la histidina quinasa específica del sistema de dos componentes, los dominios *receiver* pueden catalizar su propia autofosforilación *in vitro* usando moléculas donadoras de fosfato adecuadas tales como el acetil fosfato o el carbamoil fosfato (Jeon *et al.*, 2001; Lacal *et al.*, 2008; Lukat *et al.*, 1992) Mediante experimentos de espectrometría de masas MALDI-TOF, se comprobó que la proteína AccR cataliza la reacción de fosforilación *in vitro* utilizando el carbamoil fosfato como molécula donadora (Fig. 34).

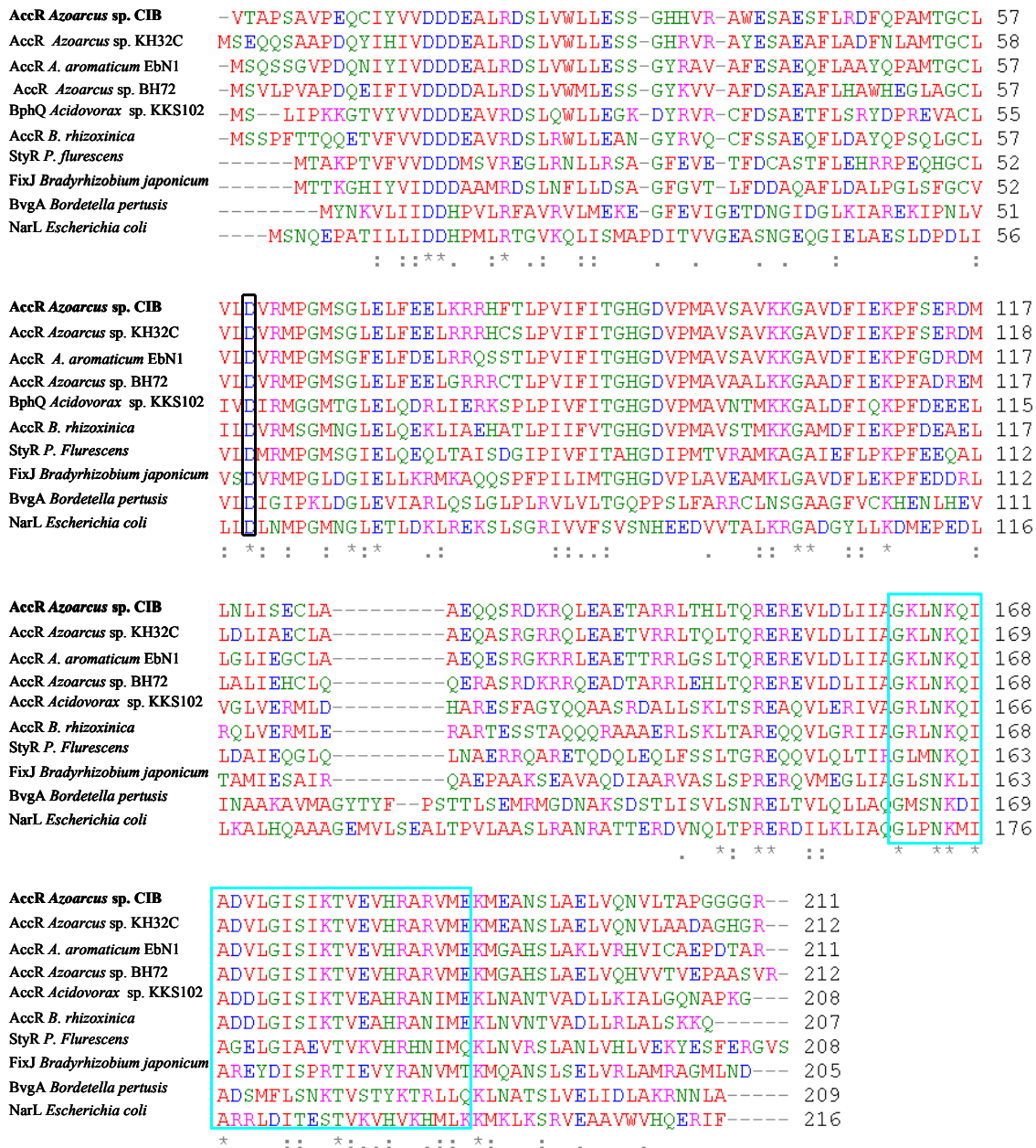


Figura 63. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de 10 proteínas pertenecientes a la familia FixJ de reguladores de respuesta. A la izquierda de la figura se indica el nombre de la proteína y el microorganismo al que pertenece. Los números de acceso en las bases de datos para cada una de las proteínas son los siguientes: AccR (*Azoarcus* sp. KH32C; BAL23772), AccR (*Aromatoleum aromaticum*; YP_157091), AccR (*Azoarcus* sp. BH72; YP_932880), BpHQ (*Acidovorax* sp. KKS102; BAE94501), AccR (*Burkholderia rhizoxinica*; YP_004029650), StyR (*Pseudomonas fluorescens*; AAC06272), FixJ (*Bradyrhizobium japonicum*; CAA40144), BvgA (*Bordetella pertusis*; YP_005589963), NarL (*Escherichia coli*; CAA48935). Los residuos de cada una de las secuencias están numerados a la derecha. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa de alineamiento múltiple ClustalW2. Los aminoácidos han sido representados mediante el código de una letra y los cuatro colores representan el grupo al que pertenecen: rojo = apolares; verde = polares sin carga; azul = ácidos; rosa = básicos. En la zona inferior del alineamiento, un asterisco (*) significa que los residuos de esa posición son idénticos en todas las secuencias; dos puntos (:) significa que existen sustituciones conservadas, acordes con el código de colores mencionado anteriormente; un punto (.) significa que existen sustituciones semiconservadas. Se ha recuadrado en color negro el residuo correspondiente al sitio de fosforilación predicho para proteínas alineadas y en azul claro el dominio HTH de unión a DNA, los cuales han sido caracterizados en las proteínas NarL, StyR, BvgA y FixJ.

Cuando se analizó el estado de oligomerización de la proteínas AccR, los resultados obtenidos por medio de ultracentrifugación analítica indicaron que la proteína AccR se encontraba en forma monomérica en solución (Fig. 35). En el caso de la proteína sometida a autofosforilación con carbamoil fosfato, se encontraron dos especies en la misma proporción, una de ellas (AccR) correspondiente al monómero y otra de ellas (AccR-P) correspondiente al dímero de la proteína. Estos resultados demostraron que la fosforilación induce un cambio de estado oligomérico de monómero a dímero en la proteína AccR. Sin embargo, los valores de índices de fricción fueron los mismos para ambas proteínas (Tabla 7), de lo cual se puede inferir que la fosforilación no causa un cambio significativo de la forma de la proteína y que, por lo tanto, las proteínas AccR y AccR-P serían proteínas ligeramente elongadas. El hecho de haber encontrado dos especies en los ensayos de ultracentrifugación analítica con la proteína AccR fosforilada está de acuerdo con la presencia de dos especies con distinto peso molecular en los ensayos de MALDI-TOF (Fig. 34), las cuales podrían generarse por la ausencia de una fosforilación total o por la defosforilación espontánea de AccR-P. En ese sentido, la vida media de la forma fosforilada de la proteína es un factor limitante en la activación de los RR. Así, han sido descritos rangos de vida media que van desde medio minuto en CheY de *Escherichia coli* hasta 180 minutos en Spo0F de *Bacillus subtilis* (Lukat *et al.*, 1991; Zapf, 1998).

Experimentos de retardo en gel, demostraron que la proteína AccR era incapaz de unirse directamente al promotor P_N (Fig. 36, Panel B), sin embargo, la proteína AccR-P retardó la sonda P_N a medida que se incrementó su concentración en el ensayo (Fig. 36, Panel B). Esta observación demuestra que la interacción de AccR con el promotor P_N es una interacción directa y dependiente del estado de fosforilación de la proteína. A la vez, este resultado sugiere que un cambio de estado oligomérico en AccR permite a la proteína unirse al DNA diana. En muchos RR, como FixJ, Spo0A, PhoB y StyR, la fosforilación induce al cambio de estado oligomérico de monómero a dímero por medio del dominio *receiver*, seguido de unión al DNA y activación o represión de la transcripción. En otros RR, como NtrC, la fosforilación induce la multimerización de la proteína (Gao y Stock, 2010).

Por otro lado, los experimentos de transcripción *in vitro*, confirmaron que tanto la interacción de AccR con el promotor P_N como la represión que ejerce AccR sobre la actividad de P_N observada en los experimentos *in vivo* son causadas directamente por AccR. (Fig. 39). La activación de los RR mediante fosforilación es indispensable para

que éstos tengan algún efecto sobre la actividad de sus respectivos promotores. Esto también se observa en nuestro sistema al comparar el efecto de las proteínas AccR y AccR-P en la represión de P_N , detectándose la inhibición de la actividad de P_N sólo en presencia de AccR-P (Fig. 39).

Los ensayos de *footprinting* con DNasa I, permitieron identificar la zona de interacción de la proteína AccR-P con el promotor P_N , la cual se encuentra localizada entre las posiciones -35 y -151 con respecto al sitio de inicio de la transcripción del promotor P_N (Fig. 37, Panel A). Esta zona, contiene dos repeticiones de la secuencia palindrómica 5'-ATGCAATCAAGTGCAT-3', cada una a un extremo de la zona protegida, la cual se haya delimitada por bandas de hipersensibilidad a la digestión por la DNasaI (Fig. 37, Panel B). Por otro lado, mientras que la proteína AccR-P fue capaz de retardar la migración de las sondas P_{N2} y P_{N3} (versiones truncadas del promotor P_N que contenían cada una de las dos repeticiones de la secuencia palindrómica) (Fig. 38, Panel A y PanelB), una sustitución en las primeras 5 bases de dicha secuencia de nucleótidos, fue suficiente para impedir la unión de la proteína AccR-P al promotor P_N (Fig. 38, PanelC). Estos resultados, permitieron postular la secuencia ATGCA-N₆-TGCAT (donde N corresponde a cualquiera de las cuatro bases nitrogenadas), como la región operadora del regulador de respuesta AccR.

Respecto al mecanismo de represión de AccR-P sobre P_N una posibilidad sería que AccR actuase inhibiendo la formación del complejo cerrado RNAP-DNA, teniendo en cuenta que la zona de protección a la digestión de la DNasaI en los ensayos de *footprinting* (Fig. 37), incluye la caja -35 de interacción del factor σ^{70} de la RNA polimerasa de *E. coli*. Otra posibilidad sería que AccR impidiese la interacción del activador AcpR con el promotor P_N , ya que la cajas operadora que fue descrita para la proteína AcpR se encuentran localizada entre las posiciones -42.5 y -39.5 (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006), muy cerca de la región operadora de AccR, y solapa con la región de P_N que protege la proteían AccR. Ensayos de retardo en gel (datos no mostrados), en presencia de FNR* y AccR-P mostraron la formación de los dos complejos AccR-P/ P_N y FNR*/ P_N , demostrando que no existe unión simultánea de ambos reguladores y que puede existir una competición entre activador y represor por la unión al DNA. No obstante, no se pueden descartar otros mecanismos adicionales más complejos que podrían implicar reguladores globales como por ejemplo la proteína IHF, la cual se ha visto que interacciona con el promotor P_N (datos no mostrados) y su posible caja operadora solapa con una de las cajas de AccR. La proteína IHF se une al

DNA generando una curvatura en el mismo (Yang y Nash, 1989), y es bien conocida su implicación en el control de rutas de degradación de compuestos aromáticos, algunas de las cuales incluyen reguladores de respuesta similares a AccR como es el caso de StyR de *P. florecens* o TodT de *P. putida* (Lacal *et al.*, 2006; Leoni *et al.*, 2005). El mecanismo de represión de AccR sobre el promotor P_N será objeto de futuras investigaciones.

El hecho de que la región operadora de AccR sea totalmente distinta a la que había sido propuesta para BphQ (Ohtsubo *et al.*, 2006), sugiere que las proteínas AccR y BphQ tienen distintos mecanismos de interacción con el DNA. Por otro lado, se ha comprobado la importancia del estado fosforilado de AccR para unirse y reprimir el promotor P_N , sin embargo en el caso de BphQ la interacción con el promotor pE del catabolismo de PCB/bifenilos, se reportó como independiente del estado fosforilado de la proteína BphQ (Ohtsubo *et al.*, 2006). Todas estas observaciones permiten sugerir que la CCR en *Acidovorax* sp. KKS102 y en *Azoarcus* sp. CIB, aunque esté controlada por reguladores similares, esta mediada por mecanismos moleculares diferentes. Un análisis *in silico* de los promotores catabólicos que controlan otras rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB, ha permitido la identificación de posibles regiones operadoras de AccR en los promotores P_{BI} y P_A , de la ruta de mbd de degradación del 3-metilbenzoato. Ensayos de retardo en gel, han revelado que AccR-P se une a los promotores P_{BI} y P_A con la misma afinidad que al promotor P_N (datos no mostrados). También se han encontrado cajas operadoras de AccR en el promotor P_D de la ruta box de degradación aeróbica del benzoato que, como se ha comprobado en el apartado 3 de los Resultados de esta tesis, también se expresa en condiciones anaeróbicas. Ensayos de actividad de P_D en condiciones de represión catabólica en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB $\Delta accR$ y en la cepa parental CIB (datos no mostrados), demuestran que AccR controla también la represión catabólica de los genes *box* en condiciones anaeróbicas. Estas observaciones permiten sugerir que AccR es un regulador global de rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos. Sin embargo, abordajes más robustos como la proteómica o la transcriptómica, de la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB $\Delta accR$, podrían ayudar a definir mejor el regulador AccR y si éste regulador está implicado también en controlar la CCR de rutas del catabolismo aeróbico en *Azoarcus* sp. CIB. Estos estudios permitirán profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la CCR en β -Proteobacterias.

6.2. Estudios de las relaciones estructura/función de la proteína AccR: mecanismos de activación del regulador

Los reguladores que controlan los promotores catabólicos en rutas aeróbicas de degradación de compuestos aromáticos han sido estudiados en detalle tanto a nivel de su estructura como de su función (Tropel y van der Meer, 2004), sin embargo en rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos, el único regulador que ha sido ampliamente estudiado a nivel de estructura y función es la proteína BzdR que controla los genes *bzd* implicados en la degradación del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB (Durante-Rodríguez *et al.*, 2010). En esta tesis se profundizó en el estudio de las relaciones estructura/función del regulador de respuesta AccR para conocer el mecanismo molecular de su activación.

Dado que se conocía la estructura tridimensional de algunos de los miembros de la familia NarL/FixJ de reguladores de respuesta que presentan similitud de secuencia significativa con AccR, se utilizaron dichas estructuras para la construcción de modelos de la estructura tridimensional de ambos dominios de la proteína AccR. Para el modelo de la región N-terminal de AccR (residuos 1-122), se utilizó como molde la estructura tridimensional de regulador StyR de *P. fluorescens*, (Milani *et al.*, 2005), por ser la proteína que compartía una mayor identidad de secuencia (50%) con el dominio N-AccR.

El modelo tridimensional para N-AccR predice un plegamiento de tipo $(\alpha\beta)_5$ observado también en otros reguladores de respuesta (Robinson *et al.*, 2003), constituido por cinco cadenas β paralelas, que constituyen una lámina β central (topología $\beta_2 \beta_1 \beta_3 \beta_4 \beta_5$), rodeada de cinco hélices α (α_2 , α_3 y α_4 en un lado, y α_1 y α_5 en el otro lado de la lámina central) (Fig. 64. Panel A) Según el modelo, el residuo de fosforilación (Asp₆₀) se encontraría en el extremo C-terminal de la cadena β_3 (Fig. 64, Panel A). La lámina β_1 , localizada cerca del extremo N-terminal de la proteína, está seguida por dos residuos Asp (Asp₁₆ y Asp₁₇), altamente conservados que estarían implicados en la unión al Mg²⁺ (Fig. 64. Panel A).

Cuando se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con la proteína AccRD60E, cuyo residuo de fosforilación (Asp₆₀) fue sustituido por un Glu, se observó que dicha sustitución era suficiente para que la proteína se uniese al DNA retardando la migración de la sonda P_N (Fig. 41) Por otro lado, cuando se realizaron ensayos de transfosforilación entre la HK AccS y la proteína AccRD60E, no se observó la transferencia de fosfato al regulador mutante (Fig. 50). Estos resultados demostraron

que la proteína AccRD60E se une al DNA de forma constitutiva e independiente de fosforilación. Cuando se analizó la actividad β -galactosidasa de la cepa *E. coli* AFMCPN, que contiene en su cromosoma la fusión traduccional $P_N::lacZ$, la actividad del promotor P_N fue reprimida en presencia de la proteína AccRD60E (Fig. 42, Panel A). Esta observación demuestra que la proteína AccRD60E no sólo se une de forma constitutiva al promotor P_N , sino que además reprime de la misma manera su actividad. Estos resultados, en conjunto, demuestran que una única sustitución en el dominio *receiver* de AccR, mimetiza las propiedades de la proteína parental en estado fosforilado y genera un regulador constitutivamente activo. Resultados similares ya habían sido descritos previamente en otros reguladores de respuesta como NtrC, DCTD y OmpR (Klose *et al.*, 1993; Lan y Igo, 1998). Otras sustituciones en el sitio de fosforilación, como por ejemplo la sustitución de un Asp por una Lys, también generan reguladores de respuesta capaces de unirse al DNA de forma independiente a la fosforilación, como en el caso de la proteína RegAD63K de *Rhodobacter capsulatus* (Hemschemeier *et al.*, 2000). Sin embargo estas sustituciones no siempre generan reguladores de respuesta constitutivos, como se ha demostrado en experimentos *in vivo* con los reguladores de respuesta VirG o CheY, en los cuales la sustitución del sitio de fosforilación por otro aminoácido causó la inactivación de las proteínas (Bourret *et al.*, 1990; Pazour *et al.*, 1992).

La confirmación de que la proteína AccRD60E se comportara como un represor constitutivo de P_N en *Azoarcus* se obtuvo cuando se expresó en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB $\Delta accR$ y no presentó ningún efecto en células cultivadas en succinato o glutarato pero sí impidió el crecimiento en benzoato (Fig. 42, Panel B). Esta observación permitió corroborar *in vivo* los resultados que se habían obtenido *in vitro* de interacción con el promotor P_N , e indica que la proteína AccRD60E es un “superrepresor” de los genes *bzd*, lo que impide que la bacteria pueda utilizar benzoato anaeróbicamente.

Estudios estructurales de RR pertenecientes a la familia FixJ, sugieren que la fosforilación del dominio N-terminal es transmitida por el bucle entre la cadena $\beta 4$ y la hélice $\alpha 4$, generando un desplazamiento de la hélice $\alpha 4$ crucial para la formación del dímero activo (Milani *et al.*, 2005). El residuo semiconservado Thr₁₀₇, localizado en el medio de la cadena $\beta 5$ al igual que el altamente conservado Lys₁₁₀, que delimita el extremo C-terminal de cadena $\beta 5$, estarían implicados en los cambios de estado oligomérico tras la fosforilación de la proteína (Milani *et al.*, 2005).

La región $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ también está involucrada en la dimerización de RR que son dímeros tanto en estado no fosforilado como fosforilado (Hong *et al.*, 2007; O'Hara *et al.*, 1999). El hecho de que C-AccR sea un monómero en solución no implica, sin embargo, que no pueda adoptar una conformación dimérica tras la unión a más cajas operadoras en el DNA. En este sentido, se ha descrito que la unión al DNA promueve la dimerización en algunos miembros de la familia NarL/FixJ (Gao y Stock, 2010). Por otro lado, el hecho de que C-AccR sea capaz de interactuar con el promotor P_N sugiere que en la proteína parental AccR el dominio *receiver* (N-AccR) actúa como un represor del dominio C-AccR impidiendo su unión al DNA. La fosforilación del dominio N-AccR y el consiguiente cambio conformacional inducido, liberaría la represión del dominio C-AccR el cual podría interactuar con el DNA. Una activación (desrepresión) intramolecular del dominio de unión a DNA por fosforilación del dominio *receiver* ya ha sido descrita en otros RR (Maris *et al.*, 2002)

Para construir el modelo tridimensional de la región C-AccR (residuos 145-212), se utilizó como molde la estructura tridimensional del dominio C-terminal de la proteína FixJ de *Sinorhizobium meliloti* (Kurashima-Ito *et al.*, 2005), que presenta un 55% de identidad con la secuencia de C-AccR. El modelo tridimensional de C-AccR consiste en 5 hélices α , de las cuales las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$ constituyen el motivo HTH, siendo $\alpha 4$ la hélice encargada del reconocimiento del DNA (Fig. 64, Panel B).

Para demostrar que C-AccR constituye un dominio estructural independiente y que su función es la de unión al DNA, se clonó y expresó por separado del resto de la proteína (Fig. 43, Panel A). Experimentos de retardo en gel demostraron que la proteína C-AccR era capaz de unirse al DNA, retardando la migración de la sonda P_N (Fig. 43, Panel B). Cuando se analizó su estado oligomérico mediante experimentos de ultracentrifugación analítica, se detectó una única especie compatible con el monómero de la proteína (Fig. 44). Estos resultados sugieren que en AccR, al igual que en NarL de *E. coli* (Maris *et al.*, 2002), la dimerización está mediada por el dominio N-AccR.

Un modelado de la estructura 3D de la proteína AccR completa basado en la estructura de la proteína StyR de *P. fluorescens*, predice la existencia de una larga hélice α que resulta de la prolongación de la hélice $\alpha 5$ del dominio N-AccR, la cual correspondería con la región *linker* que separa los dominios N-AccR y C-AccR (residuos 122 al 145) y que presenta una baja identidad de secuencia de aminoácidos con otros reguladores de respuesta. Sin embargo, se ha demostrado que las regiones *linker*, tienen gran importancia en las estrategias de comunicación entre dominios

protéicos y en la modulación de la activación o inhibición de las proteínas (Mattison *et al.*, 2002). En este sentido, el papel de la región *linker* de AccR podría ser facilitar la desrepresión del dominio de unión al DNA tras los cambios de estado oligomérico inducidos por la fosforilación del dominio *receiver*.

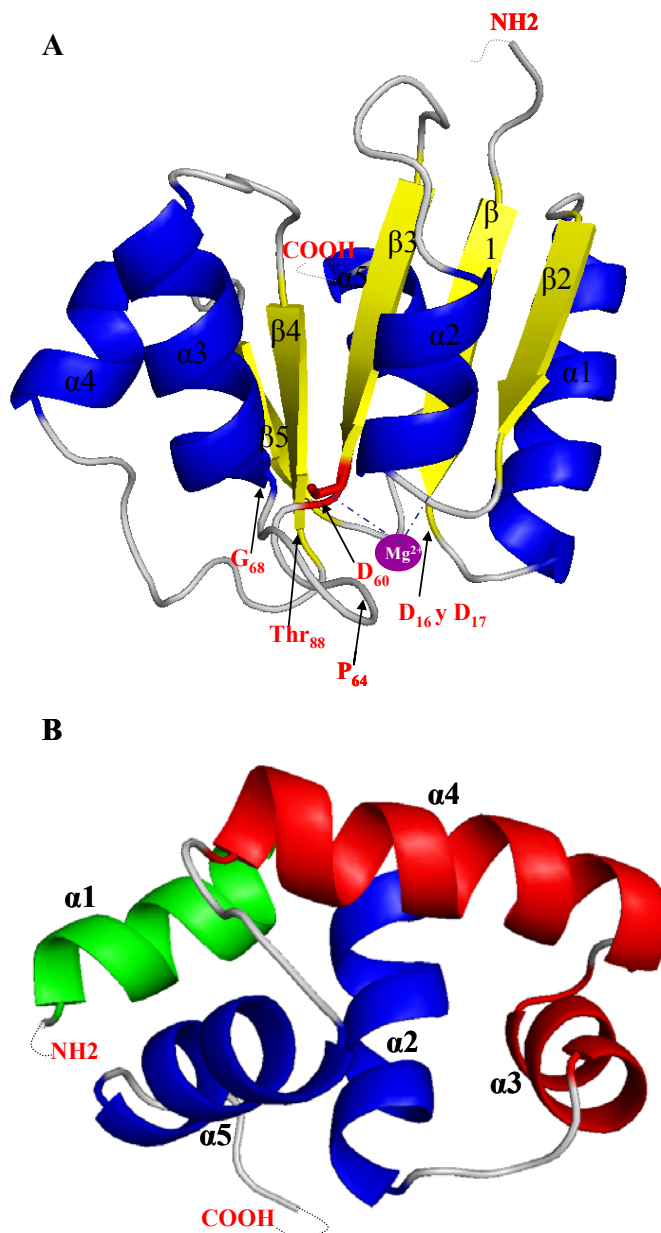


Figura 64. Modelos tridimensionales propuestos para las regiones N-terminal y C-terminal de AccR. La estructura tridimensional de N-AccR y C-AccR fue modelada mediante la aplicación Swiss Model Server (Arnold *et al.*, 2006; Schwede *et al.*, 2003; Guex y Peitsch, 1997) **A) Estructura tridimensional de la región N-AccR.** La estructura tridimensional fue modelada usando como molde la estructura conocida del dominio N-terminal de la proteína StyR de *Pseudomonas fluorescens* (Código PDB 1YIO). En azul se representan las cinco hélices α , las cadenas β han sido representadas en amarillo. El sitio de fosforilación (Asp60) se señala en rojo. También se han señalado los residuos implicados en la interacción con el ion Mg^{2+} (círculo morado) **B) Estructura tridimensional de la región C-AccR.** Para modelar la estructura tridimensional de la región C-AccR se utilizó como molde la estructura conocida del dominio C-terminal de la proteína FixJ de *Sinorhizobium meliloti* (Código PDB 1X3U). El motivo HTH (hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$) se muestra en rojo. Los correspondientes extremos N- y C-terminal están marcados como NH2 y COOH, respectivamente.

Teniendo en cuenta todos los resultados presentados en esta tesis sobre el regulador AccR, se propone el siguiente modelo de activación de dicho RR (Fig. 63). En su estado inactivo (no fosforilado), la proteína AccR es un monómero en el que el dominio *receiver* mantiene inhibido el dominio de unión al DNA. La fosforilación en el residuo Asp₆₀ del dominio *receiver* de la proteína, conlleva a un cambio de estado oligomérico a dímero y la desrepresión del dominio de unión al DNA, generando una proteína AccR-P activa que causa la represión de la actividad del promotor P_N.

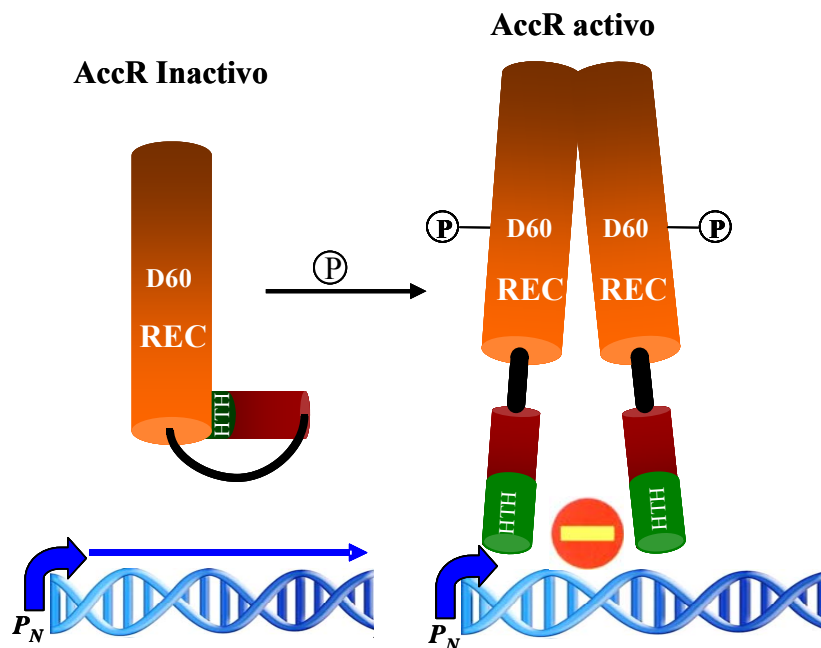


Figura 65. Modelo de activación del regulador de respuesta AccR. La proteína AccR es un monómero en estado inactivo (no fosforilado), en el que el dominio *receiver* (REC) (naranja), inhibe al dominio C-AccR (granate), impidiendo su unión al promotor P_N. La proteína AccR cataliza su autofosforilación in vitro en el residuo Asp₆₀ (D60) en presencia de carbamoil fosfato. La fosforilación induce un cambio de estado oligomérico de monómero a dímero, que a su vez permite la exposición del dominio HTH (verde) de AccR al contacto con el DNA, causando represión en la actividad del promotor P_N.

6.3. Caracterización de la proteína Histidina quinasa AccS

El gen *accS* se localiza *upstream* del gen *accR* y codifica una presunta histidina quinasa (903 aminoácidos), que posee una compleja arquitectura modular, con distintos dominios estructurales que probablemente coordinen funciones diferentes (Fig. 46). La región N-terminal de la proteína AccS está constituida por una región periplásmica (residuos 38-252) que se encuentra delimitada por dos dominios transmembrana TM1 (residuos 15-37) y TM2 (residuos 253-275). La existencia de una región periplásmica sensora permite clasificar a AccS como una HK extracelular o periplásmica (Mascher *et al.*, 2006). No obstante, la región C-terminal, de AccS (residuos 288-903) es citoplásmica y está constituida por un dominio sensor y un dominio autoquinasa (Fig.

46). El dominio sensor citoplásmico está constituido por 3 motivos PAS, los cuales se han visto implicados en el reconocimiento de una gran variedad de señales medioambientales en una gran cantidad de proteínas sensoras (Krell *et al.*, 2010; Taylor y Zhulin, 1999). Por lo tanto, la localización de los diferentes dominios sensores de AccS permite predecir que se trata de una proteína receptora de señales tanto extracelulares (periplásmicas) como citoplásmicas (Cheung y Hendrickson, 2010). El dominio sensor citoplásmico, está conectado al dominio autoquinasa (residuos 671-903). Este dominio, poseen un motivo HisKA, también conocido como dominio DHP, en el cual se encuentra la His₆₈₁, presuntamente implicada en la fosforilación de la proteína. El motivo HisKA, está conectado al motivo catalítico HATPasa, el cual cataliza la unión e hidrólisis del ATP. Aunque los dominios HisKA y HATPasa están altamente conservados en HKs (Stewart, 2010), algunas variaciones en los residuos que rodean la histidina catalítica del dominio HisKA han permitido llevar a cabo una clasificación de la superfamilia de las proteínas histidina quinasa (Grebe y Stock, 1999). Según esta clasificación, la proteína AccS, se ubica dentro de la subfamilia HPK4.

El hecho de que el promotor P_N , en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB $\Delta accS$ cultivada en condiciones de represión catabólica (benzoato más succinato), tenga la misma actividad que en condiciones de inducción (benzoato) (Fig. 45), al igual que lo observado cuando se analizó la actividad de P_N en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB $\Delta accR$ (Fig. 33), demuestra que los dos genes *accS* y *accR* son indispensables y están relacionados funcionalmente en el control de la CCR que ejercen algunas fuentes de carbono preferenciales, como el succinato, sobre la expresión de los genes *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB.

Los ensayos de transfosforilación *in vitro* demostraron una transferencia de fosfato rápida y eficaz entre la proteína AccS fosforilada y el regulador de respuesta AccR (Fig. 50), lo que demuestra que estas dos proteínas constituyen la histidina quinasa y el regulador de respuesta, respectivamente, del sistema regulador de dos componentes AccSR en *Azoarcus* sp. CIB. En *Sinorhizobium meliloti* el gen *sma0113*, codifica una HK implicada en CCR mediante la inhibición que causa el succinato en algunos sistemas de transporte como el de los azúcares. Si bien el gen *sma0114*, codifica un regulador de respuesta y se localiza justo *downstream* al gen *sma0113*, no ejerce ningún control en CCR, sugiriendo que Sma0114 no es el regulador específico del sistema de dos componentes al que pertenece la HK Sma0113. En *Acidovorax* sp. KKS102, por el contrario, el regulador BphQ implicado en la CCR sobre el metabolismo

de los bifenilos no parece estar regulado por el producto del gen adyacente, *bphP*, que codifica una presunta HK (Ohtsubo *et al.*, 2006). Por lo tanto, el sistema regulador de dos componentes de *Azoarcus* sp. CIB es el primero que se describe en el que tanto la HK como el RR están implicados en el control de la CCR en bacterias.

En algunas HKs como por ejemplo RegB (Elsen *et al.*, 2004), NarX y NarQ (Schroder *et al.*, 1994; Cavicchioli *et al.*, 1995), FixJ (Boesten y Priefer, 2004), EnvZ (Yoshida *et al.*, 2007) y ArcB (Alvarez y Georgellis, 2010) se ha demostrado que el módulo autoquinasa es activo e independiente del resto de módulos funcionales de la proteína. Para demostrar si éste también era el caso en la proteína AccS, se clonó y expresó de forma independiente el módulo autoquinasa (AccS₆₅₃₋₉₀₃) (Fig. 47). Ensayos de autofosforilación *in vitro* con la proteína truncada AccS₆₅₃₋₉₀₃ que contiene el dominio autoquinasa, demostraron que AccS cataliza las reacciones de autofosforilación, (Fig. 48) defosforilación (Fig. 49), así como la transfosforilación específica del regulador de respuesta AccR (Fig. 50). La vida media de la proteína fosforilada fue de unos 40 minutos (Fig. 49). Estos valores de tiempos máximos de autofosforilación y vida media del estado fosforilado se encuentran dentro del rango descrito para otras HKs (Bird *et al.*, 1999; Elsen *et al.*, 2004; Georgellis *et al.*, 1997; Krell *et al.*, 2010; Lacal *et al.*, 2006) y son un reflejo del equilibrio entre las reacciones de fosforilación y defosforilación del dominio autoquinasa.

Si bien, la caracterización de las propiedades enzimáticas de autofosforilación y defosforilación de la proteína AccS se han determinado con la versión de la proteína que contiene sólo el dominio autoquinasa, ensayos similares con la proteína parental que contiene las regiones periplásmica y citoplásmica ayudarían a conocer si estas actividades enzimáticas están moduladas por los dominios sensores periplásmicos y/o citoplásmico y las señales extracelulares/citoplásmicas reconocidas por éstas.

Como se ha mencionado anteriormente, AccS transfosforila específicamente al regulador de respuesta AccR. La velocidad de transfosforilación de AccS₆₅₃₋₉₀₃-P a AccR fue demasiado rápida para ser medida con exactitud en nuestros análisis y alcanzó entre el 95-98% de transferencia en tan sólo 10 segundos de ensayo (Fig. 50). Similares velocidades de transferencias de fosfato han sido observadas en otras HKs como RegB (Potter *et al.*, 2002; Bird *et al.*, 1999; Comolli *et al.*, 2002), RegS (Emmerich *et al.*, 1999) y BarA (Pernestig *et al.*, 2001). Por otro lado, AccS no fue capaz de fosforilar al regulador mutante AccRD60E, sugiriendo que el residuo Asp60 es la diana de la fosforilación (Fig. 50)

La vida media del estado fosforilado de los reguladores de respuesta, es uno de los factores más importantes para controlar la intensidad y la duración de la respuesta mediada por los sistemas reguladores de dos componentes. En este sentido, la defosforilación del RR fosforilado puede ser controlada por la actividad fosfatasa de la HK correspondiente (Gao y Stock, 2010). Para determinar si el dominio autoquinasa de AccS también controla la defosforilación de AccR-P se realizaron ensayos de transfosforilación y posterior incubación con distintas relaciones molares HK:RR. El incremento de la concentración de la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃, dio lugar a la reducción de la vida media del estado fosforilado del regulador AccR-P. Así, se observó que cuando la relación molar de AccR-P/AccS era de 1:1 en el ensayo, la vida media de AccR-P era de 90 minutos, sin embargo, el incremento de la relación a 1:6 produce una disminución de la vida media de AccR-P a 10 minutos (Fig. 51). Estas observaciones sugieren que la actividad fosfatasa de AccS es capaz de catalizar la defosforilación de AccR, al igual que ocurre en otros sistemas de dos componentes tales como RegA/RegB (Potter *et al.*, 2002) y EnvZ/OmpR (Igo *et al.*, 1989).

Aunque la transferencia de fosfato entre las HKs y los reguladores de respuesta es considerada generalmente unidireccional desde la HK hacia su respectivo regulador de respuesta, en este trabajo se observó otra forma de defosforilación de AccR-P mediante transferencia reversa de fosfato de AccR-P a AccS (Fig. 52). La quelación del ión Mg⁺⁺ con EDTA impide tanto la actividad fosfatasa de AccS sobre AccR-P como la actividad transfosforilasa de AccS-P a AccR o la actividad autoquinasa de AccS-P, lo que conlleva a un reclutamiento del fosfato en AccS cuando se produce la transferencia reversa de éste en dirección AccR-P → AccS, al igual que se ha sugerido en el sistema UhpA-UhpB tras las observaciones de transferencia de fosfato desde el regulador de respuesta UhpA hacia una forma truncada de la HK UhpB en presencia de EDTA (Wright y Kadner, 2001). Sin embargo, la transferencia de fosfato en dirección AccR → AccS fue muy lenta en comparación con la transferencia de fosfato observada en dirección AccS → AccR (Fig. 52), lo que sugiere que la transferencia reversa de fosfato podría no tener un papel muy relevante *in vivo* en el sistema de dos componentes AccSR, al igual que se ha sugerido para la transferencia reversa de fosfato en dirección RegA → RegB (Potter *et al.*, 2002).

6.4. Estudios de las señales reconocidas por AccS: el *cluster acc* de *Azoarcus* sp. CIB

La vida en el mundo microbiano está caracterizada por continuas interacciones entre la célula bacteriana y su ambiente y la habilidad de una bacteria para reconocer y responder a las señales medioambientales garantiza su supervivencia (Mascher *et al.*, 2006). Dado que la β -Proteobacteria *Azoarcus* sp. CIB es un anaerobio facultativo que puede habitar en ambientes en donde la concentración de oxígeno es variable, parece lógico pensar que haya desarrollado sistemas reguladores capaces de reconocer y responder a los niveles de oxígeno y al estado redox de la célula. En este sentido es conocido que algunas HKs, como por ejemplo ArcB, RegB, EvgS y BvgS, responden a señales de óxido-reducción celular, mostrando inhibida su actividad autoquinasa en presencia de quinonas solubles y otros compuestos en estado oxidado (Malpica *et al.*, 2004; Wu y Bauer, 2010; Bock y Gross, 2002).

Para comprobar si AccS también respondía al estado redox celular se procedió a clonar y expresar una variante de la HK (AccS₂₈₈₋₉₀₃), desprovista de la región transmembrana y periplásmica y, por lo tanto, supuestamente soluble y que contenía el dominio sensor citoplásmico y el dominio autoquinasa. Aunque la proteína truncada AccS₂₈₈₋₉₀₃ se produjo a niveles mucho más bajos que AccS₆₅₃₋₉₀₃, fue posible su purificación como proteína soluble (Fig. 53). Ensayos de autofosforilación demostraron que AccS₂₈₈₋₉₀₃ presentaba actividad autoquinasa con un máximo de autofosforilación a los 45 minutos (Fig. 54, Panel A), por lo que el dominio sensor citoplásmico no parece ser un inhibidor de dicha actividad. La adición de compuestos en estado oxidado como el NADP⁺, la cloramina T ó las quinonas solubles ubiquinona-0 y menadiona, causó la inhibición de la actividad autoquinasa de la proteína especialmente cuando se omitía el agente reductor DTT del ensayo autoquinasa (Fig. 54 y Fig. 55). Estos resultados sugerían que éstas señales redox estaban siendo reconocidas por el dominio sensor de la proteína AccS lo que ocasionaba la inhibición de la actividad autoquinasa. Sin embargo cuando se llevaron a cabo los mismos ensayos con la proteína AccS₆₅₃₋₉₀₃ que sólo expresa el dominio autoquinasa, se observó que la autofosforilación de la proteína también era inhibida en presencia de NADP⁺, ubiquinona, menadiona o la cloramina T (Fig. 56 y Fig. 57). Estos resultados revelan que el dominio autoquinasa además de ser un módulo catalítico de las actividades enzimáticas de autofosforilación, defosforilación y transfosforilación, es un módulo de reconocimiento de señales redox. Aunque generalmente los agentes oxidantes parecen ser reconocidos por los dominios sensores

de dichas HKs, en el caso de BvgS, se han descrito sitios de reconocimiento de quinonas tanto en su dominios PAS como alrededor del sitio de fosforilación localizado en el dominio autoquinasa, (Bock y Gross, 2002). Los niveles de ubiquinona-0 y de menadiona necesarios para inhibir la actividad autoquinasa de la proteína AccS fueron muy similares, e incluso menores, que los previamente descritos para inhibir la actividad autoquinasa de otras HKs implicadas en el reconocimiento del estado redox de la célula tales como BvgS, ArcB y RegB (Bock y Gross, 2002; Wu y Bauer, 2010).

Las cisteínas de las HKs son residuos adecuados para el reconocimiento de señales redox debido a que el grupo tiol (-SH) puede ser oxidado a diferentes estados redox reversibles, como el disulfuro, el ácido sulfónico y el S-nitrosotiol (Green y Paget, 2004). La proteína RegB de *Rhodobacter capsulatus* reconoce tanto quinonas oxidadas como quinonas reducidas. Estudios realizados con la proteína RegB que portaba la mutación puntual C265S, permitieron sugerir que la ubiquinona regula la actividad de RegB a través de un efecto alostérico mediado por la unión del ligando y no por la formación de puentes disulfuro como resultado del poder oxidante de la ubiquinona (Wu y Bauer, 2010). Por el contrario, en la proteína ArcB de *Escherichia coli*, las quinonas actúan como oxidantes directos generando la formación de puentes disulfuro entre las Cisteínas 180 de un monómero y 241 de otro monómero, produciendo la formación de dímeros estables de ArcB que carecen de actividad autoquinasa (Malpica *et al.*, 2004). El dominio autoquinasa de la proteína AccS contiene tres residuos de cisteína, C₆₉₄, C₆₉₇ y C₈₆₃, los cuales aparecen conservados en proteínas ortólogas a AccS en otras β -Proteobacterias (Fig. 66), y que podrían estar implicados en el reconocimiento o respuesta a ciertos agentes oxidantes como las quinonas. Estudios futuros sobre la conformación nativa de la proteína AccS y algunos mutantes con las Cys conservadas, en condiciones reducidas y oxidadas permitirían conocer el mecanismo molecular que reconoce y responde al estado redox de la célula

Estudios de RT-PCR de los genes que se encuentran localizados *downstream* a los genes los *accSR* en el cromosoma de *Azoarcus* sp. CIB (datos no mostrados), demostraron que dichos genes, forman parte de un operón que incluye también los genes *accC* y *accD* (Fig. 66). El gen *accC* codifica un presunto citocromo C y podría estar implicado en la detección del estado redox de la cadena respiratoria del transporte de electrones. El gen *accD* codifica una presunta proteína quimiorreceptora con dominios transmembrana y periplásmicos. En posición 3' al operón *accSRCD* se localizan los genes *iorAB* que codifican una presunta α -cetoácido oxidoreductasa (Fig.

66). En posición 5' al operón *accSRCD* y transcrito de forma divergente se localiza el gen *accT* que codifica una presunta proteína de unión a dicarboxilatos (PBP). Los genes *acc* están conservados en el cromosoma de otras especies bacterianas, algunas de las cuales no degradan compuestos aromáticos anaeróbicamente y presentan una alta identidad con los genes *acc* de *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 66).

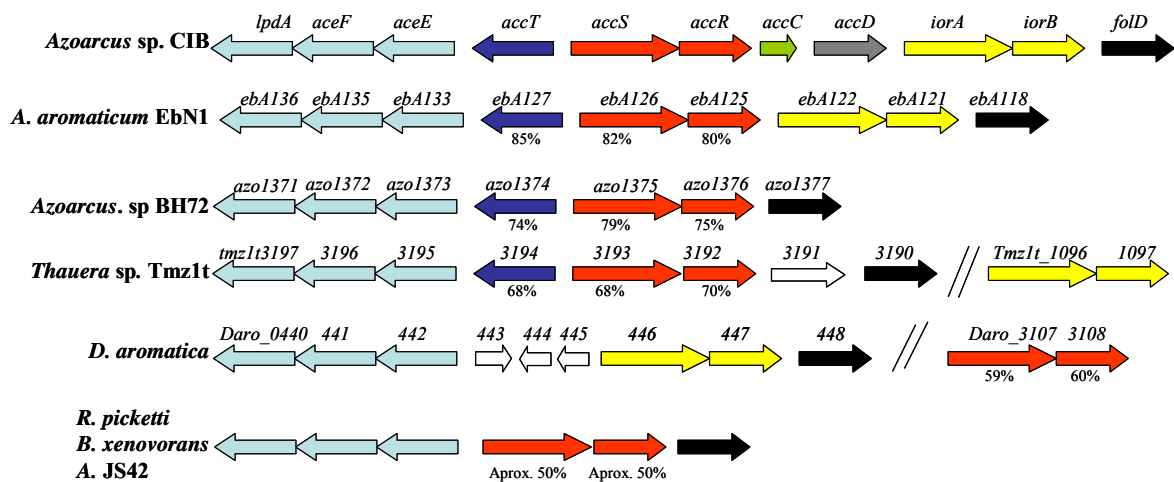


Figura 66. Alineamiento de los genes *acc* de *Azoarcus* sp. CIB con genes ortólogos de otras especies de β -Proteobacterias. En la parte superior de la figura, se muestran los genes *acc* y los genes flanqueantes de *Azoarcus* sp. CIB. Las flechas indican el sentido en el que se encuentran transcritos cada uno de los genes. Las flechas de color azul claro corresponden a los genes *aceEF**lpdA*, que codifican el complejo piruvato deshidrogenasa. En azul oscuro se representa el gen *accT* que codifica una presunta proteína PBP (*Periplasmic Binding Protein*) de un transportador de tipo ABC o TRAP de ácidos dicarboxílicos. En rojo se muestran los genes *accS* y *accR*. En verde se señala el gen *accC*, que codifica un presunto citocromo. En gris se muestra el gen *accD* que codifica una presunta proteína quimio receptora. En amarillo, se representan los genes *iorA* y *iorB* que codifican las subunidades A y B, respectivamente, de una presunta α -cetoácido oxidoreductasa. En negro, se señala el gen *folD*, que codifica una presunta 5,10-metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa. Siguiendo el mismo patrón de colores, se indican los genes ortólogos que se localizan en el genoma de otros organismos tales como *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (*A. aromaticum* EbN1), *Azoarcus* sp. BH72, *Thauera* sp. Tmz1t, *Dechloromonas aromatica* (*D. aromatica*), *Ralstonia picketti* (*R. picketti*), *Burkholderia xenovorans* (*B. xenovorans*) y *Acidovorax* sp. JS42 (*A. JS42*). Los porcentajes de identidad de los genes de otros organismos con los genes *accS*, *accR* y *accT* de *Azoarcus* sp. CIB, se indican en la parte inferior de cada uno de ellos.

Curiosamente, los genes *acc* se encuentran siempre asociados a los genes *aceEF**lpdA*, que codifican el complejo de la piruvato deshidrogenasa (Fig. 66) Esta enzima es uno de los puntos de regulación más importantes del metabolismo bacteriano, debido a su papel central en el control del estado redox de la célula, modulando el equilibrio NADH/NAD⁺ y ATP/ADP (Wang *et al.*, 2010). Como cabría esperar, el poder energético y reductor de la célula varía en condiciones de anaerobiosis y en presencia de fuentes de carbono aromáticas (Carmona *et al.*, 2009). Un objetivo de futuras investigaciones es conocer si el sistema de dos componentes AccSR está implicado en el control de la expresión de los genes *aceEF**lpdA*, al igual que lo hace el sistema

ArcAB en *E. coli* (de Graef *et al.*, 1999), lo que permitiría sugerir que el sistema AccSR constituye un sistema regulador de dos componentes que controla el estado de óxido-reducción en β -Proteobacterias.

Así, el estado de óxido-reducción generado en la célula como resultado del catabolismo anaerobio de los compuestos aromáticos podría ser una señal detectada por AccS en *Azoarcus* sp. CIB para impedir la represión de las rutas del catabolismo de aromáticos. Por otro lado, el reconocimiento de los ácidos orgánicos que causan tal represión cuando la cepa CIB se cultiva en presencia de succinato y dichos ácidos orgánicos podría ser considerado como otra señal que desencadena la activación del sistema AccSR y en consecuencia la represión del promotor P_N . Un análisis in silico de la comparación entre la secuencia de aminoácidos del dominio sensor citoplasmático de la proteína AccS reveló una identidad superior al 50% con hipotéticas HK sensoras de ácidos C-4 dicarboxílicos, como por ejemplo DctS de *Achromobacter xyloxidans*. Por otra parte, algunos estudios han demostrado el reconocimiento de ácidos C4-dicarboxílicos por parte de los módulos sensores de algunas HK's. En *E. coli*, por ejemplo, el motivo PAS de la región citoplasmática de la HK DcuS, une fumarato y otros ácidos C-4 dicarboxílicos, y transmite la información a otras dianas necesarias para el transporte y el metabolismo del fumarato y fuentes de carbono relacionadas (Janausch *et al.*, 2002; Kneuper *et al.*, 2005; Janausch *et al.*, 2004). Cuando se ensayó la actividad autoquinasa de la proteína AccS₂₈₈₋₉₀₃, en presencia de ácidos dicarboxílicos como el succinato, acetato o lactato, no se observó ninguna diferencia significativa con su actividad autoquinasa en ausencia de dichos compuestos (Fig.54, Panel C), lo que sugiere que la región citoplasmática de la proteína AccS no está implicada directamente en el reconocimiento de este tipo de ácidos orgánicos. No obstante no se puede descartar que alguno de los tres motivos PAS del dominio sensor citoplásmico de AccS esté implicado en el reconocimiento de señales derivadas del catabolismo de los ácidos dicarboxílicos. Sin embargo, y al igual que ocurre con otras HK's como por ejemplo DctB en *Rhizobium leguminosarum* (Reid y Poole, 1998), AccS podría reconocer los ácidos dicarboxílicos en su región periplásmica. Este reconocimiento podría ser directo o mediado por otras proteínas. Así, se han descrito HKs que pueden reconocer ácidos orgánicos mediante la interacción de sus dominios periplásmicos con otras proteínas accesorias, entre las cuales se encuentran proteínas de tipo PBP y quimiorreceptores (Mascher *et al.*, 2006). Es posible que en el caso de AccS, el reconocimiento de ácidos orgánicos en el periplasma dependa de la interacción con los productos de los genes

accT y *accD* (Fig. 66). El gen *accT* se encuentra muy conservado en diferentes especies pertenecientes a las β -Proteobacterias (Fig. 66) y codifica una presunta proteína PBP de un transportador de tipo ABC o TRAP de ácidos dicarboxílicos. El gen *accD*, codifica una proteína quimio receptora que presenta una alta identidad con la proteína quimiosensora Tar de *E. coli*, un sensor de membrana que contiene un dominio periplásmico sensor de aspartato y que puede interactuar con la HK EnvZ para regular actividades enzimáticas bifuncionales (Zhu y Inouye, 2003). Por lo tanto, AccT y AccD podrían ser proteínas auxiliares, implicadas en el reconocimiento de ácidos dicarboxílicos en *Azoarcus* sp. CIB, y formar parte de un complejo sistema de regulación de más de dos componentes, mediante la interacción con la región periplásmica y transmembranal de AccS. En ese sentido, se han descrito diferentes proteínas auxiliares de sistemas de dos componentes que actúan modulando la actividad autoquinasa, a través de interacciones con los dominios sensores, transmembranales o enzimáticos de las HKs (Buelow y Raivio, 2010).

En base a los resultados obtenidos en esta tesis, en la figura 67, se propone un modelo del sistema regulador Acc en *Azoarcus* sp. CIB. Las proteínas AccT y AccD estarían implicadas en el reconocimiento de ácidos dicarboxílicos tales como el succinato, en el periplasma de la célula y funcionarían como proteínas accesorias, interactuando con la región periplásmica de la histidina quinasa AccS. La señal sería transmitida hasta el dominio catalítico de la proteína, estimulando la actividad autoquinasa de la misma mediante la fosforilación del residuo His₆₈₁. Una vez fosforilada la proteína AccS, cataliza la reacción de transfosforilación directa al residuo D₆₀ del dominio *receiver* del regulador de respuesta AccR. La fosforilación de AccR induce la dimerización de la proteína, la cual contiene un motivo HTH en su extremo C-terminal, lo que le permite reconocer e interactuar con el promotor P_N , inhibiendo su actividad y causando la represión de los genes *bzd*, cuando *Azoarcus* sp. CIB se cultiva en benzoato y presencia de fuentes de carbono preferentes. Por otro lado, el dominio autoquinasa de la proteína AccS detecta directamente el estado redox de *Azoarcus* sp. CIB, reconociendo moléculas en estado oxidado, como el NADP⁺ y las quinonas que podrían generarse en el catabolismo anaeróbico del benzoato y que inhiben la actividad autoquinasa de la proteína AccS. La función del dominio sensor citoplásmico es desconocida hasta la fecha, pero podría estar reconociendo señales del metabolismo anaeróbico tales como citocromos en los que podría encontrarse AccC. Aunque la confirmación del modelo experimental propuesto será objeto de futuras investigaciones,

el trabajo que se presenta en esta tesis constituye el primer ejemplo que se describe en la literatura de un sistema regulador de dos componentes que controla la respuesta CCR en la degradación de compuestos aromáticos y muy probablemente, representa además un sistema regulador global que controla el estado de óxido-reducción en distintas β -Proteobacterias.

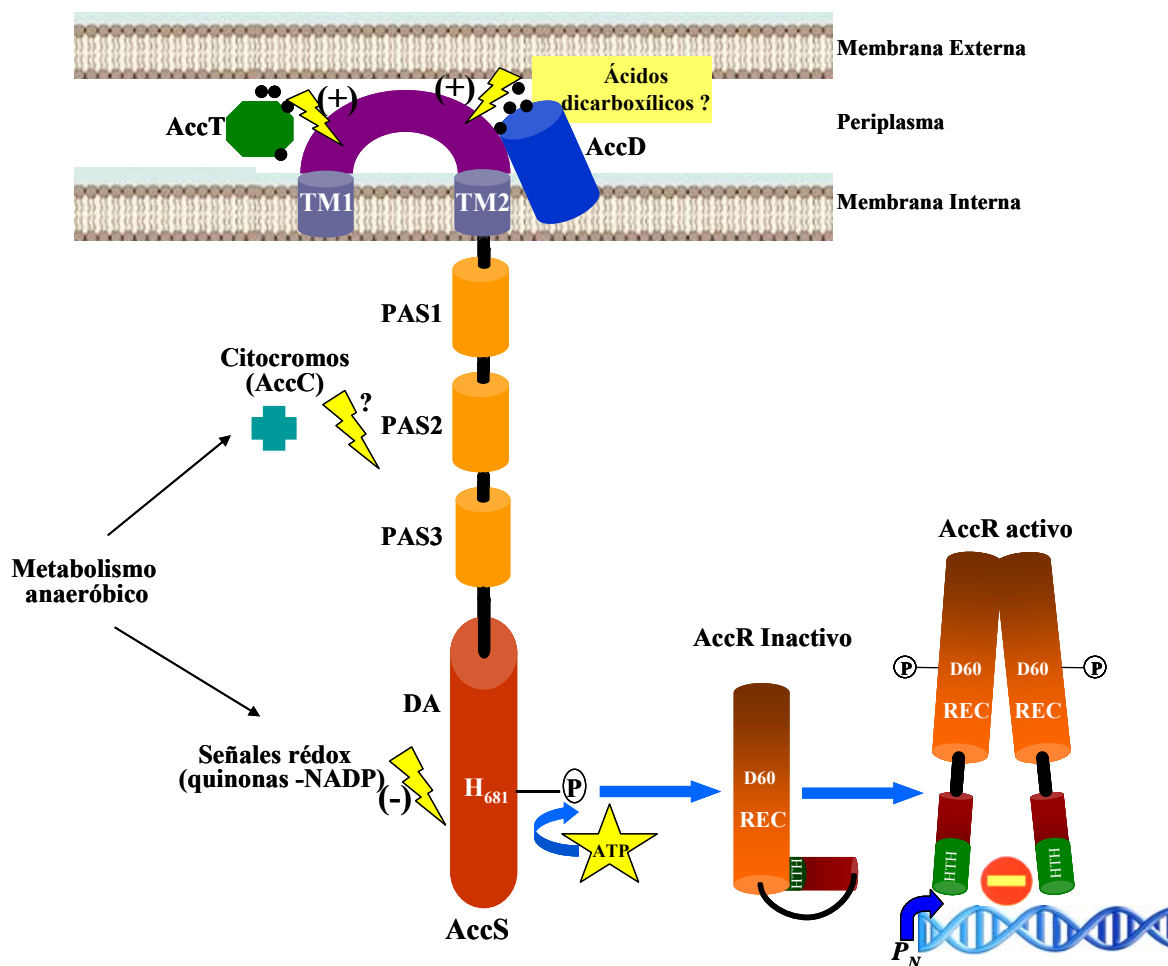


Figura 65. Modelo propuesto del sistema de regulación Acc en *Azoarcus* sp. CIB. En la parte superior de la figura, se representa la envuelta celular (membrana interna, periplasma y membrana externa). Las proteínas AccD (azul) y AccT (verde), reconocen ácidos dicarboxílicos (círculos negros) en el periplasma e interaccionan con la región periplásmica (morado) de la proteína AccS, delimitada por dos regiones transmembranas TM1 y TM2 (gris). La señal es transmitida por la región citoplásmica hasta el dominio autoquinasa (DA) (rojo), activando la fosforilación (+) que tiene lugar en presencia de ATP en el residuo His₆₈₁. Por otro lado, el dominio autoquinasa (DA), reconoce señales redox generadas en el metabolismo bacteriano (quinonas y NADP⁺), que inhiben su actividad (-). La región citoplásmica sensora de la proteína AccS incluye tres dominios PAS (naranja). Las señales que reconocen los dominios PAS de la proteína AccS se desconocen hasta la fecha (?), pero podrían ser moléculas derivadas del metabolismo anaeróbico como por ejemplo el citocromo AccC (azul claro). El fosfato (P), es transmitido al residuo D₆₀ del dominio *receiver* (REC; Naranja) del regulador de respuesta AccR, el cual, una vez fosforilado, cambia de estado oligomérico de monómero a dímero y por medio de su dominio HTH (verde), reconoce y reprime (-) la actividad del promotor P_N.

VI. CONCLUSIONES

A continuación se enumeran las conclusiones a las que ha dado a lugar el trabajo realizado en esta tesis:

1. Se ha identificado el *cluster box*, que codifica las enzimas necesarias para la degradación aeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB. La organización génica del *cluster box* de *Azoarcus* sp. CIB revela que está constituido por, al menos, dos operones divergentes, controlados por los promotores P_D y P_X .
2. El gen *boxR* de *Azoarcus* sp. CIB codifica un represor transcripcional de los promotores P_D y P_X , y es un parálogo del gen *bzdR* que codifica el represor transcripcional BzdR que controla los genes *bzd* responsables de la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB.
3. La región operadora de la proteína BoxR en los promotores P_D y P_X , solapa con las cajas -10 y -35 de interacción con la RNAP, así como con el sitio de inicio de la transcripción (+1), lo que está de acuerdo con la función represora observada para esta proteína. El benzoil-CoA es la molécula inductora que interactúa con el represor BoxR, impidiendo su unión a los promotores
4. Los promotores P_D y P_X son activos tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, y su actividad es eficientemente reprimida por el producto del gen *boxR* en ambas condiciones.
5. Los reguladores transcripcionales BoxR y BzdR también se unen y reprimen al promotor P_N y a los promotores P_D/P_X , respectivamente, indicando la existencia de una regulación transcripcional cruzada entre las rutas aeróbica y anaeróbica de degradación de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB y controlando la expresión basal de forma sinérgica de los clusters *box* y *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB,.
6. La presencia de los genes *boxR* y *bzdR* en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB constituye una ventaja adaptativa para la bacteria cuando no utiliza benzoato como fuente de carbono.
7. Los genes *accSR* codifican un sistema regulador de dos componentes, implicado en el control de la represión catabólica del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos por ácidos orgánicos en *Azoarcus* sp. CIB.
8. La fosforilación del regulador de respuesta AccR genera un cambio de estado oligomérico de monómero a dímero en la proteína, facilitando su interacción con el promotor P_N y la inhibición de la actividad de éste. La región operadora de

AccR incluye la secuencia palindrómica de reconocimiento ATGCA(N₆)TGCAT.

9. La sustitución del residuo Asp₆₀Glu genera una variante del represor AccR, incapaz de fosforilarse, pero que simula a la proteína parental fosforilada, actuando en la célula como un superrepresor de la transcripción de los genes *bzd* y, en consecuencia, impidiendo a *Azoarcus* sp.CIB metabolizar el benzoato en ausencia de oxígeno.
10. La región C-terminal de AccR (C-AccR) es un dominio funcional, capaz de unirse y reprimir al promotor P_N de forma. La región N-terminal de AccR (N-AccR) en su estado no fosforilado, funciona entonces como un represor del dominio C-AccR.
11. El dominio autoquinasa de la proteína AccS es un dominio funcional y cataliza las reacciones de autofosforilación, transfosforilación y defosforilación del regulador de respuesta AccR. La transferencia reversa de fosfato de AccR-P a AccS podría ser un mecanismo adicional de control de la fosforilación de la proteína AccR.
12. La actividad del dominio autoquinasa de AccS responde al estado redox del medio y dicha actividad se inhibe en presencia de ciertas moléculas en estado oxidado (quinonas, NADP⁺)
13. El análisis de la estructura primaria de la histidina quinasa AccS sugiere la existencia de dominios sensores periplásmicos y citoplásmicos que podrían interactuar con los productos de otros genes del *cluster acc*, constituyendo muy probablemente un complejo sistema regulador multicomponente implicado en el control y respuesta redox en *Azoarcus* sp. CIB y otras β -Proteobacterias.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abraham, W. R; B. Nogales; P. N. Golyschin; D. H. Pieper y K. N. Timmis. (2002) Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Current opinion in microbiology* 5: 246-253.

Achong, G. R; A. M. Rodriguez y A. M. Spormann. (2001) Benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T: cloning, sequencing, transcriptional organization, and its role in anaerobic toluene and m-xylene mineralization. *Journal of bacteriology* 183: 6763-6770.

Aitken, C. M; D. M. Jones y S. R. Larter. (2004) Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature* 431: 291-294.

Altschul, S. F; W. Gish; W. Miller; E. W. Myers y D. J. Lipman. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215: 403-410.

Alvarez, A. F. y D. Georgellis. (2010) In vitro and in vivo analysis of the ArcB/A redox signaling pathway. *Methods Enzymol* 471: 205-228.

Anders, H. J; A. Kaetzke; P. Kampfer; W. Ludwig y G. Fuchs. (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonas strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 45: 327-333.

Anderson, I; C. Risso; D. Holmes; S. Lucas; A. Copeland; A. Lapidus; J. F. Cheng; D. Bruce; L. Goodwin; S. Pitluck; E. Saunders; T. Brettin; J. C. Detter; C. Han; R. Tapia; F. Larimer; M. Land; L. Hauser; T. Woyke; D. Lovley; N. Kyrpides y N. Ivanova. (2011) Complete genome sequence of *Ferroglobus placidus* AEDII12DO. *Standards in genomic sciences* 5: 50-60.

Aravind, L; V. Anantharaman; S. Balaji; M. M. Babu y L. M. Iyer. (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS microbiology reviews* 29: 231-262.

Armengaud, J; K. N. Timmis y R. M. Wittich. (1999) A functional 4-hydroxysalicylate/hydroxyquinol degradative pathway gene cluster is linked to the initial dibenzo-p-dioxin pathway genes in *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Journal of bacteriology* 181: 3452-3461.

Arnold, K; L. Bordoli; J. Kopp y T. Schwede. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)* 22: 195-201.

Auburger, G. y J. Winter. (1996) Activation and degradation of benzoate, 3-phenylpropionate and crotonate by *Syntrophus buswellii* strain GA. Evidence for electron-transport phosphorylation during crotonate respiration. *Applied microbiology and biotechnology* 44: 807-815.

Bains, J. y M. J. Boulanger. (2007) Biochemical and structural characterization of the paralogous benzoate CoA ligases from *Burkholderia xenovorans* LB400: defining the entry point into the novel benzoate oxidation (box) pathway. *Journal of molecular biology* 373: 965-977.

Bains, J; R. Leon y M. J. Boulanger. (2009) Structural and biophysical characterization of BoxC from *Burkholderia xenovorans* LB400: a novel ring-cleaving enzyme in the crotonase superfamily. *The Journal of biological chemistry* 284: 16377-16385.

Barragán, M. J; B. Blazquez; M. T. Zamarro; J. M. Mancheno; J. L. Garcia; E. Diaz y M. Carmona. (2005) BzdR, a repressor that controls the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB, is the first member of a new subfamily of transcriptional regulators. *The Journal of biological chemistry* 280: 10683-10694.

Bartolome-Martin, D; E. Martinez-Garcia; V. Mascaraque; J. Rubio; J. Perera y S. Alonso. (2004) Characterization of a second functional gene cluster for the catabolism of phenylacetic acid in *Pseudomonas* sp. strain Y2. *Gene* 341: 167-179.

Biegert, T.; U. Altenschmidt; C. Eckerskorn y G. Fuchs. (1993) Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-Hydroxybenzoate-CoA ligase from a denitrifying *Pseudomonas* species. *Eur J Biochem* 213: 555-561.

Bird, T. H; S. Du y C. E. Bauer. (1999) Autophosphorylation, phosphotransfer, and DNA-binding properties of the RegB/RegA two-component regulatory system in *Rhodobacter capsulatus*. *The Journal of biological chemistry* 274: 16343-16348.

Blázquez, B; M. Carmona; J. L. Garcia y E. Diaz. (2008) Identification and analysis of a glutaryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp. CIB. *Environmental microbiology* 10: 474-482.

Bleichrodt, F. S; R. Fischer & U. C. Gerischer. (2010) The beta-ketoadipate pathway of *Acinetobacter baylyi* undergoes carbon catabolite repression, cross-regulation and vertical regulation, and is affected by Crc. *Microbiology* 156: 1313-1322.

Bock, A. y R. Gross. (2002) The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. *Eur J Biochem* 269: 3479-3484.

Boesten, B. y U. B. Priefer. (2004) The C-terminal receiver domain of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* FixL protein is required for free-living microaerobic induction of the *fnrN* promoter. *Microbiology (Reading, England)* 150: 3703-3713.

Boll, M. (2005) Dearomatizing benzene ring reductases. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 10: 132-142.

Boll, M. y G. Fuchs. (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur J Biochem* 234: 921-933.

Boll, M. y G. Fuchs. (2005) Unusual reactions involved in anaerobic metabolism of phenolic compounds. *Biological chemistry* 386: 989-997.

Bourret, R. B. (2010) Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Current opinion in microbiology* 13: 142-149.

Bourret, R. B; J. F. Hess y M. I. Simon. (1990) Conserved aspartate residues and phosphorylation in signal transduction by the chemotaxis protein CheY. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 41-45.

Breese, K; M. Boll; J. Alt-Morbe; H. Schagger y G. Fuchs. (1998) Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* 256: 148-154.

Brodskii, L. I; V. V. Ivanov; L. Kalaidzidis Ia; A. M. Leontovich; V. K. Nikolaev; S. I. Feranchuk y V. A. Drachev. (1995) [GeneBee-NET: An Internet based server for biopolymer structure analysis]. *Biokhimiia (Moscow, Russia)* 60: 1221-1230.

Brzostowicz, P. C; A. B. Reams; T. J. Clark y E. L. Neidle. (2003) Transcriptional cross-regulation of the catechol and protocatechuate branches of the beta-ketoadipate pathway contributes to carbon source-dependent expression of the *Acinetobacter* sp. strain ADP1 *pobA* gene. *Applied and environmental microbiology* 69: 1598-1606.

Buelow, D. R. y T. L. Raivio. (2010) Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol* 75: 547-566.

Busch, A; J. Lacal; A. Martos; J. L. Ramos y T. Krell. (2007) Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13774-13779.

Butler, J. E; Q. He; K. P. Nevin; Z. He; J. Zhou y D. R. Lovley. (2007) Genomic and microarray analysis of aromatics degradation in *Geobacter metallireducens* and comparison to a *Geobacter* isolate from a contaminated field site. BMC genomics 8: 180.

Carl, B. y S. Fetzner. (2005) Transcriptional activation of quinoline degradation operons of *Pseudomonas putida* 86 by the AraC/XylS-type regulator OxoS and cross-regulation of the PqorM promoter by XylS. Applied and environmental microbiology 71: 8618-8626.

Carmona, M. y E. Diaz. (2005) Iron-reducing bacteria unravel novel strategies for the anaerobic catabolism of aromatic compounds. Mol Microbiol 58: 1210-1215.

Carmona, M; M. T. Zamarro; B. Blazquez; G. Durante-Rodriguez; J. F. Juarez; J. A. Valderrama; M. J. Barragan; J. L. Garcia y E. Diaz. (2009) Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. Microbiol Mol Biol Rev 73: 71-133.

Casadaban, M. J. (1976) Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. Journal of molecular biology 104: 541-555.

Cases, I. y V. de Lorenzo. (2005) Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. Nature reviews 3: 105-118.

Cases, I; D. W. Ussery y V. de Lorenzo. (2003) The sigma54 regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. Environmental microbiology 5: 1281-1293.

Cavicchioli, R; I. Schroder; M. Constanti y R. P. Gunsalus. (1995) The NarX and NarQ sensor-transmitter proteins of *Escherichia coli* each require two conserved histidines for nitrate-dependent signal transduction to NarL. Journal of bacteriology 177: 2416-2424.

Cervin, M. A; R. J. Lewis; J. A. Brannigan y G. B. Spiegelman. (1998) The Bacillus subtilis regulator SinR inhibits spoIIG promoter transcription in vitro without displacing RNA polymerase. Nucleic acids research 26: 3806-3812.

Coates, J. D. y L. A. Achenbach. (2004) Microbial perchlorate reduction: rocket-fueled metabolism. Nature reviews 2: 569-580.

Coates, J. D; R. Chakraborty & M. J. McInerney. (2002) Anaerobic benzene biodegradation--a new era. Research in microbiology 153: 621-628.

Collier, D. N; P. W. Hager & P. V. Phibbs, Jr. (1996) Catabolite repression control in the *Pseudomonas*. Research in microbiology 147: 551-561.

Comolli, J. C; A. J. Carl; C. Hall & T. Donohue. (2002) Transcriptional activation of the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c(2) gene P2 promoter by the response regulator PrrA. *Journal of bacteriology* 184: 390-399.

Coschigano, P. W. (2000) Transcriptional analysis of the *tutE tutFDGH* gene cluster from *Thauera aromatica* strain T1. *Applied and environmental microbiology* 66: 1147-1151.

Coschigano, P. W. y B. J. Bishop. (2004) Role of benzylsuccinate in the induction of the *tutE tutFDGH* gene complex of *T. aromatica* strain T1. *FEMS microbiology letters* 231: 261-266.

Cowles, C. E; N. N. Nichols y C. S. Harwood. (2000) BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* 182: 6339-6346.

Cripps, R. E. (1973) The microbial metabolism of thiophen-2-carboxylate. *Biochem J* 134: 353-366.

Crosby, H. A.; E. K. Heiniger; C. S. Harwood y J. C. Escalante-Semerena. (2010) Reversible N epsilon-lysine acetylation regulates the activity of acyl-CoA synthetases involved in anaerobic benzoate catabolism in *Rhodopseudomonas palustris*. *Mol Microbiol* 76: 874-888.

Chee-Sanford, J. C; J. W. Frost; M. R. Fries; J. Zhou y J. M. Tiedje. (1996) Evidence for acetyl coenzyme A and cinnamoyl coenzyme A in the anaerobic toluene mineralization pathway in *Azoarcus tolulyticus* Tol-4. *Applied and environmental microbiology* 62: 964-973.

Cheung, J. y W. A. Hendrickson. (2010) Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current opinion in microbiology* 13: 116-123.

Dagley, S. (1978) Determinants of biodegradability. *Quarterly reviews of biophysics* 11: 577-602.

Daniels, C; P. Godoy; E. Duque; M. A. Molina-Henares; J. de la Torre; J. M. Del Arco; C. Herrera; A. Segura; M. E. Guazzaroni; M. Ferrer y J. L. Ramos. (2010) Global regulation of food supply by *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Journal of bacteriology* 192: 2169-2181.

Darley, P. I; J. A. Hellstern; J. I. Medina-Bellver; S. Marques; B. Schink & B. Philipp. (2007) Heterologous expression and identification of the genes involved in anaerobic degradation of 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) in *Azoarcus anaerobius*. *Journal of bacteriology* 189: 3824-3833.

de Graef, M. R; S. Alexeeva; J. L. Snoep y M. J. Teixeira de Mattos. (1999) The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 181: 2351-2357.

de Lorenzo, V. y J. Perez-Martin. (1996) Regulatory noise in prokaryotic promoters: how bacteria learn to respond to novel environmental signals. *Mol Microbiol* 19: 1177-1184.

de Lorenzo, V. y K. N. Timmis. (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* 235: 386-405.

Denef, V. J; J. A. Klappenbach; M. A. Patrauchan; C. Florizone; J. L. Rodrigues; T. V. Tsoi; W. Verstraete; L. D. Eltis y J. M. Tiedje. (2006) Genetic and genomic insights into the role of benzoate-catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Applied and environmental microbiology* 72: 585-595.

Denef, V. J; J. Park; T. V. Tsoi; J. M. Rouillard; H. Zhang; J. A. Wibbenmeyer; W. Verstraete; E. Gulari; S. A. Hashsham y J. M. Tiedje. (2004) Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Applied and environmental microbiology* 70: 4961-4970.

Deutscher, J. (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current opinion in microbiology* 11: 87-93.

Diaz, E. y M. A. Prieto. (2000) Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* 11: 467-475.

Dimroth, P. y B. Schink. (1998) Energy conservation in the decarboxylation of dicarboxylic acids by fermenting bacteria. *Archives of microbiology* 170: 69-77.

Dispensa, M; C. T. Thomas; M. K. Kim; J. A. Perrotta; J. Gibson y C. S. Harwood. (1992) Anaerobic growth of *Rhodopseudomonas palustris* on 4-hydroxybenzoate is dependent on AadR, a member of the cyclic AMP receptor protein family of transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 174: 5803-5813.

Dombroski, A. J. (1997) Recognition of the -10 promoter sequence by a partial polypeptide of sigma70 in vitro. *The Journal of biological chemistry* 272: 3487-3494.

Dörner, E. & M. Boll. (2002) Properties of 2-oxoglutarate: ferredoxin oxidoreductase from *Thauera aromatica* and its role in enzymatic reduction of the aromatic ring. *Journal of bacteriology* 184: 3975-3983.

Durante-Rodríguez, G; J. A. Valderrama; J. M. Mancheno; G. Rivas; C. Alfonso; E. Arias-Palomo; O. Llorca; J. L. García; E. Díaz y M. Carmona. (2010) Biochemical characterization of the transcriptional regulator BzdR from *Azoarcus* sp. CIB. *The Journal of biological chemistry* 285: 35694-35705.

Durante-Rodríguez, G; M. T. Zamarro; J. L. Garcia; E. Díaz y M. Carmona. (2006) Oxygen-dependent regulation of the central pathway for the anaerobic catabolism of aromatic compounds in *Azoarcus* sp. strain CIB. *Journal of bacteriology* 188: 2343-2354.

Durante-Rodríguez, G; M. T. Zamarro; J. L. Garcia; E. Diaz y M. Carmona. (2008) New insights into the BzdR-mediated transcriptional regulation of the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB. *Microbiology* 154: 306-316.

Dutta, R; L. Qin y M. Inouye. (1999) Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol Microbiol* 34: 633-640.

Egland, P. G; J. Gibson y C. S. Harwood. (1995) Benzoate-coenzyme A ligase, encoded by *badA*, is one of three ligases able to catalyze benzoyl-coenzyme A formation during anaerobic growth of *Rhodopseudomonas palustris* on benzoate. *Journal of bacteriology* 177: 6545-6551.

Egland, P. G; J. Gibson y C. S. Harwood. (2001) Reductive, coenzyme A-mediated pathway for 3-chlorobenzoate degradation in the phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Applied and environmental microbiology* 67: 1396-1399.

Egland, P. G. y C. S. Harwood. (1999) BadR, a new MarR family member, regulates anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in concert with AadR, an Fnr family member. *Journal of bacteriology* 181: 2102-2109.

Egland, P. G. y C. S. Harwood. (2000) HbaR, a 4-hydroxybenzoate sensor and FNR-CRP superfamily member, regulates anaerobic 4-hydroxybenzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *Journal of bacteriology* 182: 100-106.

Egland, P. G; D. A. Pelletier; M. Dispensa; J. Gibson y C. S. Harwood. (1997) A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6484-6489.

Elsen, S; L. R. Swem; D. L. Swem y C. E. Bauer. (2004) RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 263-279.

Elshahed, M. S; V. K. Bhupathiraju; N. Q. Wofford; M. A. Nanny y M. J. McInerney. (2001) Metabolism of benzoate, cyclohex-1-ene carboxylate, and cyclohexane carboxylate by "*Syntrophus aciditrophicus*" strain SB in syntrophic association with H₂-using microorganisms. *Applied and environmental microbiology* 67: 1728-1738.

Elshahed, M. S. y M. J. McInerney. (2001) Benzoate fermentation by the anaerobic bacterium *Syntrophus aciditrophicus* in the absence of hydrogen-using microorganisms. *Applied and environmental microbiology* 67: 5520-5525.

Emmerich, R; K. Panglungtshang; P. Strehler; H. Hennecke y H. M. Fischer. (1999) Phosphorylation, dephosphorylation and DNA-binding of the *Bradyrhizobium japonicum* RegSR two-component regulatory proteins. *Eur J Biochem* 263: 455-463.

Evans, W. C. & G. Fuchs. (1988) Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* 42: 289-317.

Ezezika, O. C.; L. S. Collier-Hyams; H. A. Dale; A. C. Burk & E. L. Neidle. (2006) CatM regulation of the benABCDE operon: functional divergence of two LysR-type paralogs in *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Applied and environmental microbiology* 72: 1749-1758.

Fernández, S; V. de Lorenzo y J. Perez-Martin. (1995) Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol Microbiol* 16: 205-213.

Ferrández, A; B. Minambres; B. Garcia; E. R. Olivera; J. M. Luengo; J. L. García y E. Díaz. (1998) Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *The Journal of biological chemistry* 273: 25974-25986.

Foussard, M; S. Cabantous; J. Pedelacq; V. Guillet; S. Tranier; L. Mourey; C. Birck y J. Samama. (2001) The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 3: 417-424.

Fries, M. R; J. Zhou; J. Chee-Sanford y J. M. Tiedje. (1994) Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied and environmental microbiology* 60: 2802-2810.

Fuchs, G. (2008) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 82-99.

Fuchs, G; M. Boll & J. Heider. (2011) Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nature reviews* 9: 803-816.

Fujita, Y. (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 73: 245-259.

Galperin, M. Y. (2010) Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current opinion in microbiology* 13: 150-159.

Galperin, M. Y; A. N. Nikolskaya y E. V. Koonin. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS microbiology letters* 203: 11-21.

Gallus, C. y B. Schink. (1994) Anaerobic degradation of pimelate by newly isolated denitrifying bacteria. *Microbiology (Reading, England)* 140 (Pt 2): 409-416.

Gao, R. y A. M. Stock. (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* 63: 133-154.

Gao, R. y A. M. Stock. (2010) Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity. *Current opinion in microbiology* 13: 160-167.

Georgellis, D; A. S. Lynch y E. C. Lin. (1997) In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 179: 5429-5435.

Gescher, J; W. Eisenreich; J. Worth; A. Bacher y G. Fuchs. (2005) Aerobic benzoyl-CoA catabolic pathway in *Azoarcus evansii*: studies on the non-oxygenolytic ring cleavage enzyme. *Mol Microbiol* 56: 1586-1600.

Gescher, J; W. Ismail; E. Olgeschlager; W. Eisenreich; J. Worth y G. Fuchs. (2006) Aerobic benzoyl-coenzyme A (CoA) catabolic pathway in *Azoarcus evansii*: conversion of ring cleavage product by 3,4-dehydroadipyl-CoA semialdehyde dehydrogenase. *Journal of bacteriology* 188: 2919-2927.

Gescher, J; A. Zaar; M. Mohamed; H. Schagger y G. Fuchs. (2002) Genes coding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *Journal of bacteriology* 184: 6301-6315.

Gibson, D. T. y R. E. Parales. (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 11: 236-243.

- Gibson, J; M. Dispensa; G. C. Fogg; D. T. Evans y C. S. Harwood. (1994)** 4-Hydroxybenzoate-coenzyme A ligase from *Rhodopseudomonas palustris*: purification, gene sequence, and role in anaerobic degradation. *Journal of bacteriology* 176: 634-641.
- Gibson, J. y S. Harwood, (2002)** Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. In: *Annu Rev Microbiol.* pp. 345-369.
- Gorke, B. y J. Stulke. (2008)** Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature reviews* 6: 613-624.
- Grebe, T. W. y J. B. Stock. (1999)** The histidine protein kinase superfamily. *Advances in microbial physiology* 41: 139-227.
- Green, J. & M. S. Paget. (2004)** Bacterial redox sensors. *Nature reviews* 2: 954-966.
- Gu, Y; L. Reshetnikova; Y. Li; Y. Wu; H. Yan; S. Singh & X. Ji. (2002)** Crystal structure of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the dynamic role of the LID domain in catalysis. *Journal of molecular biology* 319: 779-789.
- Guex, N. y M. C. Peitsch. (1997)** SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.
- Hagblom, M. M; V. K. Knight y L. J. Kerkhof. (2000)** Anaerobic decomposition of halogenated aromatic compounds. *Environ Pollut* 107: 199-207.
- Harayama, S; M. Kok y E. L. Neidle. (1992)** Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu Rev Microbiol* 46: 565-601.
- Harayama, S. y M. Reikik. (1989)** Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *The Journal of biological chemistry* 264: 15328-15333.
- Harrison, F. H. y C. S. Harwood. (2005)** The *pimFABCDE* operon from *Rhodopseudomonas palustris* mediates dicarboxylic acid degradation and participates in anaerobic benzoate degradation. *Microbiology (Reading, England)* 151: 727-736.
- Harwood, C. S. y R. E. Parales. (1996)** The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol* 50: 553-590.
- Heider, J; M. Boll; K. Breese; S. Breinig; C. Ebenau-Jehle; U. Feil; N. Gad'on; D. Laempe; B. Leuthner; M. E. Mohamed; S. Schneider; G. Burchhardt y G. Fuchs. (1998)** Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Archives of microbiology* 170: 120-131.
- Heider, J. y G. Fuchs. (1997)** Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem* 243: 577-596.

Hemschemeier, S. K; U. Ebel; A. Jager; A. Balzer; M. Kirndorfer y G. Klug. (2000) In vivo and in vitro analysis of RegA response regulator mutants of *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2: 291-300.

Herrero, M; V. de Lorenzo y K. N. Timmis. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* 172: 6557-6567.

Hess, A; B. Zarda; D. Hahn; A. Haner; D. Stax; P. Hohener y J. Zeyer. (1997) In situ analysis of denitrifying toluene- and m-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Applied and environmental microbiology* 63: 2136-2141.

Hong, E; H. M. Lee; H. Ko; D. U. Kim; B. Y. Jeon; J. Jung; J. Shin; S. A. Lee; Y. Kim; Y. H. Jeon; C. Cheong; H. S. Cho y W. Lee. (2007) Structure of an atypical orphan response regulator protein supports a new phosphorylation-independent regulatory mechanism. *The Journal of biological chemistry* 282: 20667-20675.

Huang, Z. J; I. Edery y M. Rosbash. (1993) PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature* 364: 259-262.

Igo, M. M; A. J. Ninfa; J. B. Stock y T. J. Silhavy. (1989) Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes and development* 3: 1725-1734.

Iwabuchi, T. y S. Harayama. (1998) Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7. *The Journal of biological chemistry* 273: 8332-8336.

Janausch, I. G; I. Garcia-Moreno; D. Lehnen; Y. Zeuner y G. Uden. (2004) Phosphorylation and DNA binding of the regulator DcuR of the fumarate-responsive two-component system DcuSR of *Escherichia coli*. *Microbiology* 150: 877-883.

Janausch, I. G; I. Garcia-Moreno y G. Uden. (2002) Function of DcuS from *Escherichia coli* as a fumarate-stimulated histidine protein kinase in vitro. *The Journal of biological chemistry* 277: 39809-39814.

Jeon, Y; Y. S. Lee; J. S. Han; J. B. Kim y D. S. Hwang. (2001) Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. *The Journal of biological chemistry* 276: 40873-40879.

Juárez, J. F.; M. T. Zamarro; M. J. Barragan; B. Blázquez; M. Boll; K. Kuntze; J. L. García; E. Díaz y M. Carmona. (2010) Identification of the *Geobacter metallireducens* bamVW two-component system, involved in transcriptional regulation of aromatic degradation. Applied and environmental microbiology 76: 383-385.

Kaniga, K; I. Delor y G. R. Cornelis. (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. Gene 109: 137-141.

Kawaguchi, K; Y. Shinoda; H. Yurimoto; Y. Sakai y N. Kato. (2006) Purification and characterization of benzoate-CoA ligase from *Magnetospirillum* sp. strain TS-6 capable of aerobic and anaerobic degradation of aromatic compounds. FEMS microbiology letters 257: 208-213.

Kiley, P. J. y W. S. Reznikoff. (1991) Fnr mutants that activate gene expression in the presence of oxygen. Journal of bacteriology 173: 16-22.

Klose, K. E.; D. S. Weiss y S. Kustu. (1993) Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. Journal of molecular biology 232: 67-78.

Kneuper, H; I. G. Janausch; V. Vijayan; M. Zweckstetter; V. Bock; C. Griesinger y G. Unden. (2005) The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of *Escherichia coli*. The Journal of biological chemistry 280: 20596-20603.

Koenig, K. y J. R. Andreesen. (1990) Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. Journal of bacteriology 172: 5999-6009.

Korner, H; H. J. Sofia y W. G. Zumft. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. FEMS microbiology reviews 27: 559-592.

Kovach, M. E; P. H. Elzer; D. S. Hill; G. T. Robertson; M. A. Farris; R. M. Roop, y K. M. Peterson. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166: 175-176.

Krause, A; A. Ramakumar; D. Bartels; F. Battistoni; T. Bekel; J. Boch; M. Bohm; F. Friedrich; T. Hurek; L. Krause; B. Linke; A. C. McHardy; A. Sarkar; S. Schneiker; A. A. Syed; R. Thauer; F. J. Vorholter; S. Weidner; A. Puhler; B. Reinhold-Hurek; O. Kaiser y A. Goesmann, (2006) Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nature biotechnology* 24: 1385-1391

Krell, T; J. Lacal; A. Busch; H. Silva-Jimenez; M. E. Guazzaroni y J. L. Ramos. (2010) Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol* 64: 539-559.

Kretzer, A; K. Frunzke y J. R. Andreesen. (1993) Catabolism of isonicotinate by *Mycobacterium* sp. INA1: extended description of the pathway and purification of the molybdoenzyme isonicotinate dehydrogenase. *Journal of general microbiology* 139: 2763-2772.

Kung, J. W; C. Loffler; K. Dorner; D. Heintz; S. Gallien; A. Van Dorselaer; T. Friedrich y M. Boll. (2009) Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17687-17692.

Kuntze, K; Y. Shinoda; H. Moutakki; M. J. McInerney; C. Vogt; H. H. Richnow y M. Boll. (2008) 6-Oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-coenzyme A hydrolases from obligately anaerobic bacteria: characterization and identification of its gene as a functional marker for aromatic compounds degrading anaerobes. *Environmental microbiology* 10: 1547-1556.

Kurashima-Ito, K; Y. Kasai; K. Hosono; K. Tamura; S. Oue; M. Isogai; Y. Ito; H. Nakamura y Y. Shiro. (2005) Solution structure of the C-terminal transcriptional activator domain of FixJ from *Sinorhizobium meliloti* and its recognition of the fixK promoter. *Biochemistry* 44: 14835-14844.

Lacal, J; A. Busch; M. E. Guazzaroni; T. Krell y J. L. Ramos. (2006) The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8191-8196.

Lacal, J; M. E. Guazzaroni; A. Busch; T. Krell y J. L. Ramos. (2008) Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the tod pathway operon promoter. *Journal of molecular biology* 376: 325-337.

Ladero, V; P. García; J. C. Alonso y J. E. Suarez. (2002) Interaction of the Cro repressor with the lysis/lysogeny switch of the *Lactobacillus casei* temperate bacteriophage A2. *The Journal of general virology* 83: 2891-2895.

Laempe, D; W. Eisenreich; A. Bacher y G. Fuchs. (1998) Cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-CoA hydratase [corrected], an enzyme involved in anaerobic metabolism of benzoyl-CoA in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* 255: 618-627.

Laempe, D; M. Jahn; K. Breese; H. Schagger y G. Fuchs. (2001) Anaerobic metabolism of 3-hydroxybenzoate by the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Journal of bacteriology* 183: 968-979.

Laempe, D; M. Jahn y G. Fuchs. (1999) 6-Hydroxycyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA dehydrogenase and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, enzymes of the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* 263: 420-429.

Lan, C. Y. y M. M. Igo. (1998) Differential expression of the OmpF and OmpC porin proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. *Journal of bacteriology* 180: 171-174.

Larimer, F. W; P. Chain; L. Hauser; J. Lamerdin; S. Malfatti; L. Do; M. L. Land; D. A. Pelletier; J. T. Beatty; A. S. Lang; F. R. Tabita; J. L. Gibson; T. E. Hanson; C. Bobst; J. L. Torres; C. Peres; F. H. Harrison; J. Gibson y C. S. Harwood. (2004) Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature biotechnology* 22: 55-61.

Leahy, J. G; G. R. Johnson y R. H. Olsen. (1997) Cross-regulation of toluene monooxygenases by the transcriptional activators TbmR and TbuT. *Applied and environmental microbiology* 63: 3736-3739.

Leoni, L; G. Rampioni; V. Di Stefano y E. Zennaro. (2005) Dual role of response regulator StyR in styrene catabolism regulation. *Applied and environmental microbiology* 71: 5411-5419.

Leuthner, B; C. Leutwein; H. Schulz; P. Horth; W. Haehnel; E. Schiltz; H. Schagger y J. Heider. (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol Microbiol* 28: 615-628.

Lin, B; H. W. Van Verseveld y W. F. Roling. (2002) Microbial aspects of anaerobic BTEX degradation. *Biomed Environ Sci* 15: 130-144.

Little, J. W; D. P. Shepley y D. W. Wert. (1999) Robustness of a gene regulatory circuit. *The EMBO journal* 18: 4299-4307.

Lochmeyer, C; J. Koch y G. Fuchs. (1992) Anaerobic degradation of 2-aminobenzoic acid (anthranilic acid) via benzoyl-coenzyme A (CoA) and cyclohex-1-enecarboxyl-CoA in a denitrifying bacterium. *Journal of bacteriology* 174: 3621-3628.

López-Barragán, M. J; M. Carmona; M. T. Zamarro; B. Thiele; M. Boll; G. Fuchs; J. L. Garcia y E. Díaz. (2004) The *bzd* gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. *Journal of bacteriology* 186: 5762-5774.

López Barragan, M. J; E. Díaz; J. L. García y M. Carmona. (2004) Genetic clues on the evolution of anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Microbiology* 150: 2018-2021.

Lovley, D. R. (2001) Bioremediation. Anaerobes to the rescue. *Science (New York, N.Y)* 293: 1444-1446.

Lovley, D. R. (2002) Analysis of the genetic potential and gene expression of microbial communities involved in the in situ bioremediation of uranium and harvesting electrical energy from organic matter. *Omics* 6: 331-339.

Lovley, D. R. (2003) Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature reviews* 1: 35-44.

Luengo, J. M; J. L. Garcia y E. R. Olivera. (2001) The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Mol Microbiol* 39: 1434-1442.

Lukat, G. S; B. H. Lee; J. M. Mottonen; A. M. Stock y J. B. Stock. (1991) Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *The Journal of biological chemistry* 266: 8348-8354.

Lukat, G. S; W. R. McCleary; A. M. Stock y J. B. Stock. (1992) Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 718-722.

Malpica, R; B. Franco; C. Rodriguez; O. Kwon y D. Georgellis. (2004) Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13318-13323.

Maris, A. E; M. R. Sawaya; M. Kaczor-Grzeskowiak; M. R. Jarvis; S. M. Bearson; M. L. Kopka; I. Schroder; R. P. Gunsalus y R. E. Dickerson. (2002) Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator. *Nature structural biology* 9: 771-778.

Marqués, S; I. Aranda-Olmedo y J. L. Ramos. (2006) Controlling bacterial physiology for optimal expression of gene reporter constructs. *Curr Opin Biotechnol* 17: 50-56.

Marschall, C; V. Labrousse; M. Kreimer; D. Weichart; A. Kolb y R. Hengge-Aronis. (1998) Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on sigma s and requires activation by cAMP-CRP. *Journal of molecular biology* 276: 339-353.

Martín, A. C; R. Lopez y P. García. (1995) Nucleotide sequence and transcription of the left early region of *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-1 coding for the terminal protein and the DNA polymerase. *Virology* 211: 21-32.

Martin, R. G. y J. L. Rosner. (1995) Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5456-5460.

Mascher, T; J. D. Helmann y G. Udden. (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 910-938.

Matsunaga, T; Y. Okamura; Y. Fukuda; A. T. Wahyudi; Y. Murase y H. Takeyama. (2005) Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *DNA Res* 12: 157-166.

Mattison, K; R. Oropeza & L. J. Kenney. (2002) The linker region plays an important role in the interdomain communication of the response regulator OmpR. *The Journal of biological chemistry* 277: 32714-32721.

McInerney, M. J; L. Rohlin; H. Mouttaki; U. Kim; R. S. Krupp; L. Rios-Hernandez; J. Sieber; C. G. Struchtemeyer; A. Bhattacharyya; J. W. Campbell y R. P. Gunsalus. (2007) The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7600-7605.

Mechichi, T; E. Stackebrandt; N. Gad'on y G. Fuchs. (2002) Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Archives of microbiology* 178: 26-35.

Milanesio, P; A. Arce-Rodriguez; A. Munoz; B. Calles y V. de Lorenzo. (2011) Regulatory exaptation of the catabolite repression protein (Crp)-cAMP system in *Pseudomonas putida*. Environmental microbiology 13: 324-339.

Milani, M; L. Leoni; G. Rampioni; E. Zennaro; P. Ascenzi y M. Bolognesi. (2005) An active-like structure in the unphosphorylated StyR response regulator suggests a phosphorylation- dependent allosteric activation mechanism. Structure 13: 1289-1297.

Miller, V. L. y J. J. Mekalanos. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. Journal of bacteriology 170: 2575-2583.

Miñambres, B; H. Martínez-Blanco; E. R. Olivera; B. Garcia; B. Diez; J. L. Barredo; M. A. Moreno; C. Schleissner; F. Salto y J. M. Luengo. (1996) Molecular cloning and expression in different microbes of the DNA encoding *Pseudomonas putida* U phenylacetyl-CoA ligase. Use of this gene to improve the rate of benzylpenicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. The Journal of biological chemistry 271: 33531-33538.

Mitrophanov, A. Y. y E. A. Groisman. (2008) Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. Genes & development 22: 2601-2611.

Mohamed, M. E y G. Fuchs. (1993) Purification and characterization of phenylacetate-coenzyme A ligase from a denitrifying *Pseudomonas* sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of phenylacetate. Archives of microbiology 159: 554-562.

Mohamed, M. E; A. Zaar; C. Ebenau-Jehle y G. Fuchs. (2001) Reinvestigation of a new type of aerobic benzoate metabolism in the proteobacterium *Azoarcus evansii*. Journal of bacteriology 183: 1899-1908.

Morales, G; J. F. Linares; A. Beloso; J. P. Albar; J. L. Martinez y F. Rojo. (2004) The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. Journal of bacteriology 186: 1337-1344.

Morales, G; A. Ugidos y F. Rojo. (2006) Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and cbb3-1 terminal oxidases. Environmental microbiology 8: 1764-1774.

Morasch, B; B. Schink; C. C. Tebbe y R. U. Meckenstock. (2004) Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. Archives of microbiology 181: 407-417.

Moreno-Ruiz, E; M. J. Hernaez; O. Martinez-Perez y E. Santero. (2003) Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogolitabida* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. Journal of bacteriology 185: 2026-2030.

Moreno, R. y F. Rojo. (2008) The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. Journal of bacteriology 190: 1539-1545.

Nishizawa, T; K. Tago; K. Oshima; M. Hattori; S. Ishii; S. Otsuka y K. Senoo. (2012) Complete genome sequence of the denitrifying and N₂O-reducing bacterium *Azoarcus* sp. strain KH32C. Journal of bacteriology 194: 1255.

Nogales, J; A. Canales; J. Jimenez-Barbero; J. L. García y E. Díaz. (2005) Molecular characterization of the gallate dioxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440. The prototype of a new subgroup of extradiol dioxygenases. The Journal of biological chemistry 280: 35382-35390.

Noller, A. C; M. C. McEllistrem; O. C. Stine; J. G. Morris, Jr.; D. J. Boxrud; B. Dixon y L. H. Harrison. (2003) Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. Journal of clinical microbiology 41: 675-679.

O'Hara, B. P.; R. A. Norman; P. T. Wan; S. M. Roe; T. E. Barrett; R. E. Drew y L. H. Pearl. (1999) Crystal structure and induction mechanism of AmiC-AmiR: a ligand-regulated transcription antitermination complex. The EMBO journal 18: 5175-5186.

Ohtsubo, Y; H. Goto; Y. Nagata; T. Kudo y M. Tsuda. (2006) Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading beta-proteobacteria, *Acidovorax* sp. KKS102. Mol Microbiol 60: 1563-1575.

Pan, C; Y. Oda; P. K. Lankford; B. Zhang; N. F. Samatova; D. A. Pelletier; C. S. Harwood y R. L. Hettich. (2008) Characterization of anaerobic catabolism of p-coumarate in *Rhodopseudomonas palustris* by integrating transcriptomics and quantitative proteomics. Mol Cell Proteomics 7: 938-948.

Pazour, G. J; C. N. Ta y A. Das. (1992) Constitutive mutations of *Agrobacterium tumefaciens* transcriptional activator virG. Journal of bacteriology 174: 4169-4174.

Pelletier, D. A. y C. S. Harwood. (1998) 2-Ketocyclohexanecarboxyl coenzyme A hydrolase, the ring cleavage enzyme required for anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *Journal of bacteriology* 180: 2330-2336.

Pelletier, D. A. y C. S. Harwood. (2000) 2-Hydroxycyclohexanecarboxyl coenzyme A dehydrogenase, an enzyme characteristic of the anaerobic benzoate degradation pathway used by *Rhodopseudomonas palustris*. *Journal of bacteriology* 182: 2753-2760.

Peres, C. M. y C. S. Harwood. (2006) BadM is a transcriptional repressor and one of three regulators that control benzoyl coenzyme A reductase gene expression in *Rhodopseudomonas palustris*. *Journal of bacteriology* 188: 8662-8665.

Pernestig, A. K; O. Melefors y D. Georgellis. (2001) Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 276: 225-231.

Peters, F; M. Rother y M. Boll. (2004) Selenocysteine-containing proteins in anaerobic benzoate metabolism of *Desulfococcus multivorans*. *Journal of bacteriology* 186: 2156-2163.

Peters, F; Y. Shinoda; M. J. McInerney y M. Boll. (2007) Cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-coenzyme A (CoA) hydratases of *Geobacter metallireducens* and *Syntrophus aciditrophicus*: Evidence for a common benzoyl-CoA degradation pathway in facultative and strict anaerobes. *Journal of bacteriology* 189: 1055-1060.

Petruschka, L; G. Burchhardt; C. Muller; C. Weihe y H. Herrmann. (2001) The cyo operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation. *Mol Genet Genomics* 266: 199-206.

Pflüger, K. y V. de Lorenzo. (2008) Evidence of in vivo cross talk between the nitrogen-related and fructose-related branches of the carbohydrate phosphotransferase system of *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* 190: 3374-3380.

Philipp, B. y B. Schink. (1998) Evidence of two oxidative reaction steps initiating anaerobic degradation of resorcinol (1,3-dihydroxybenzene) by the denitrifying bacterium *Azoarcus anaerobius*. *Journal of bacteriology* 180: 3644-3649.

Pieper, D. H.; V. A. Martins dos Santos y P. N. Golyshin. (2004) Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* 15: 215-224.

Pieper, D. H. y W. Reineke. (2000) Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 11: 262-270.

Potter, C. A; A. Ward; C. Laguri; M. P. Williamson; P. J. Henderson y M. K. Phillips-Jones. (2002) Expression, purification and characterisation of full-length histidine protein kinase RegB from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of molecular biology* 320: 201-213.

Prieto, M. A.; B. Galán; B. Torres; A. Ferrández; C. Fernández; B. Miñambres; J. L. García y E. Díaz. (2004) Aromatic metabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism of less-preferred carbon sources in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews* 28: 503-518.

Puigbo, P; I. G. Bravo y S. Garcia-Vallve. (2008) E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). *BMC bioinformatics* 9: 65.

Rabus, R. (2005) Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Applied microbiology and biotechnology* 68: 580-587.

Rabus, R; M. Kube; J. Heider; A. Beck; K. Heitmann; F. Widdel y R. Reinhardt. (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of microbiology* 183: 27-36.

Rabus, R. y F. Widdel. (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Archives of microbiology* 163: 96-103.

Ramos-González, M. I; M. Olson; A. A. Gatenby; G. Mosqueda; M. Manzanera; M. J. Campos; S. Vichez y J. L. Ramos. (2002) Cross-regulation between a novel two-component signal transduction system for catabolism of toluene in *Pseudomonas mendocina* and the TodST system from *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* 184: 7062-7067.

Ramos, J. L; S. Marqués y K. N. Timmis. (1997) Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu Rev Microbiol* 51: 341-373.

Rather, L. J; E. Bill; W. Ismail y G. Fuchs. (2010a) The reducing component BoxA of benzoyl-coenzyme A epoxidase from *Azoarcus evansii* is a [4Fe-4S] protein. *Biochimica et biophysica acta* 1814: 1609-1615.

Rather, L. J; E. Bill; W. Ismail y G. Fuchs. (2011a) The reducing component BoxA of benzoyl-coenzyme A epoxidase from *Azoarcus evansii* is a [4Fe-4S] protein. *Biochimica et biophysica acta* 1814: 1609-1615.

Rather, L. J; B. Knapp; W. Haehnel y G. Fuchs. (2010b) Coenzyme A-dependent aerobic metabolism of benzoate via epoxide formation. *The Journal of biological chemistry* 285: 20615-20624.

Rather, L. J; T. Weinert; U. Demmer; E. Bill; W. Ismail; G. Fuchs y U. Ermler. (2011b) Structure and mechanism of the diiron benzoyl-coenzyme A epoxidase BoxB. *The Journal of biological chemistry* 286: 29241-29248.

Reid, C. J. y P. S. Poole. (1998) Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of bacteriology* 180: 2660-2669.

Reinhold-Hurek, B; T. Hurek; M. Claeysens y M. van Montagu. (1993) Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. *Journal of bacteriology* 175: 7056-7065.

Robinson, V. L; T. Wu y A. M. Stock. (2003) Structural analysis of the domain interface in DrrB, a response regulator of the OmpR/PhoB subfamily. *Journal of bacteriology* 185: 4186-4194.

Rojo, F. (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS microbiology reviews* 34: 658-684.

Saraste, M; P. R. Sibbald y A. Wittinghofer. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in biochemical sciences* 15: 430-434.

Sauer, R. T; R. R. Yocum; R. F. Doolittle; M. Lewis y C. O. Pabo. (1982) Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. *Nature* 298: 447-451.

Schafer, A; A. Tauch; W. Jager; J. Kalinowski; G. Thierbach y A. Puhler. (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.

Schink, B; B. Philipp y J. Muller. (2000) Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Die Naturwissenschaften* 87: 12-23.

Schroder, I; C. D. Wolin; R. Cavicchioli y R. P. Gunsalus. (1994) Phosphorylation and dephosphorylation of the NarQ, NarX, and NarL proteins of the nitrate-dependent two-component regulatory system of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 176: 4985-4992.

Schuck, P; M. A. Perugini; N. R. Gonzales; G. J. Howlett y D. Schubert. (2002) Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophysical journal* 82: 1096-1111.

Schuck, P. y P. Rossmanith. (2000) Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers* 54: 328-341.

Schuhle, K. y G. Fuchs. (2004) Phenylphosphate carboxylase: a new C-C lyase involved in anaerobic phenol metabolism in *Thauera aromatica*. *Journal of bacteriology* 186: 4556-4567.

Schühle, K; J. Gescher; U. Feil; M. Paul; M. Jahn; H. Schagger y G. Fuchs. (2003) Benzoate-coenzyme A ligase from *Thauera aromatica*: an enzyme acting in anaerobic and aerobic pathways. *Journal of bacteriology* 185: 4920-4929.

Schühle, K; M. Jahn; S. Ghisla y G. Fuchs. (2001) Two similar gene clusters coding for enzymes of a new type of aerobic 2-aminobenzoate (anthranilate) metabolism in the bacterium *Azoarcus evansii*. *Journal of bacteriology* 183: 5268-5278.

Schwede, T; J. Kopp; N. Guex y M. C. Peitsch. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research* 31: 3381-3385.

Sharp, P. M. y W. H. Li. (1987) The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic acids research* 15: 1281-1295.

Shingler, V. (2003) Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environmental microbiology* 5: 1226-1241.

Shinoda, Y; J. Akagi; Y. Uchihashi; A. Hiraishi; H. Yukawa; H. Yurimoto; Y. Sakai y N. Kato. (2005) Anaerobic degradation of aromatic compounds by *magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 69: 1483-1491.

Shinoda, Y; Y. Sakai; H. Uenishi; Y. Uchihashi; A. Hiraishi; H. Yukawa; H. Yurimoto y N. Kato. (2004) Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Applied and environmental microbiology* 70: 1385-1392.

Silva-Rocha, R. y V. de Lorenzo. (2010) Noise and robustness in prokaryotic regulatory networks. *Annu Rev Microbiol* 64: 257-275.

Silva-Rocha, R; J. Tamames; V. M. dos Santos y V. de Lorenzo. (2011) The logicome of environmental bacteria: merging catabolic and regulatory events with Boolean formalisms. *Environmental microbiology* 13: 2389-2402.

Song, B; M. M. Haggblom; J. Zhou; J. M. Tiedje y N. J. Palleroni. (1999) Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 3: 1129-1140.

Spormann, A. M. y F. Widdel. (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. Biodegradation 11: 85-105.

Springer, N; W. Ludwig; B. Philipp y B. Schink. (1998) *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. Int J Syst Bacteriol 48 Pt 3: 953-956.

Stewart, R. C. (2010) Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways. Current opinion in microbiology 13: 133-141.

Svenningsen, S. L; N. Costantino; D. L. Court & S. Adhya. (2005) On the role of Cro in λ prophage induction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 4465-4469.

Szurmant, H.; R. A. White y J. A. Hoch. (2007) Sensor complexes regulating two-component signal transduction. Current opinion in structural biology 17: 706-715.

Takeda, H; J. Shimodaira; K. Yukawa; N. Hara; D. Kasai; K. Miyauchi; E. Masai y M. Fukuda. (2010) Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound degradation in a polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1. Journal of bacteriology 192: 4741-4751.

Takenaka, S; S. Murakami; R. Shinke; K. Hatakeyama; H. Yukawa y K. Aoki. (1997) Novel genes encoding 2-aminophenol 1,6-dioxygenase from *Pseudomonas* species AP-3 growing on 2-aminophenol and catalytic properties of the purified enzyme. The Journal of biological chemistry 272: 14727-14732.

Taylor, B. L. y I. B. Zhulin. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. Microbiol Mol Biol Rev 63: 479-506.

Teichmann, S. A. y M. M. Babu. (2004) Gene regulatory network growth by duplication. Nature genetics 36: 492-496.

Thiele, B; O. Rieder; N. Jehmlich; M. von Bergen; M. Muller y M. Boll. (2008) Aromatizing cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-coenzyme A oxidase. Characterization and its role in anaerobic aromatic metabolism. The Journal of biological chemistry 283: 20713-20721.

Tropel, D. y J. R. van der Meer. (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. Microbiol Mol Biol Rev 68: 474-500.

Ulrich, L. E; E. V. Koonin y I. B. Zhulin. (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in microbiology* 13: 52-56.

Uden, G; S. Achebach; G. Holighaus; H. G. Tran; B. Wackwitz y Y. Zeuner. (2002) Control of FNR function of *Escherichia coli* by O₂ and reducing conditions. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 4: 263-268.

Uden, G; S. Becker; J. Bongaerts; G. Holighaus; J. Schirawski y S. Six. (1995) O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Archives of microbiology* 164: 81-90.

Vaillancourt, F. H; J. T. Bolin y L. D. Eltis. (2006) The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 41: 241-267.

van der Meer, J. R; W. M. de Vos; S. Harayama y A. J. Zehnder. (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol Rev* 56: 677-694.

VerBerkmoes, N. C; M. B. Shah; P. K. Lankford; D. A. Pelletier; M. B. Strader; D. L. Tabb; W. H. McDonald; J. W. Barton; G. B. Hurst; L. Hauser; B. H. Davison; J. T. Beatty; C. S. Harwood; F. R. Tabita; R. L. Hettich y F. W. Larimer. (2006) Determination and comparison of the baseline proteomes of the versatile microbe *Rhodospseudomonas palustris* under its major metabolic states. *Journal of proteome research* 5: 287-298.

Vogels, G. D. y C. Van der Drift. (1976) Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriological reviews* 40: 403-468.

Walker, J. E; M. Saraste; M. J. Runswick y N. J. Gay. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal* 1: 945-951.

Wang, Q; M. S. Ou; Y. Kim; L. O. Ingram y K. T. Shanmugam. (2010) Metabolic flux control at the pyruvate node in an anaerobic *Escherichia coli* strain with an active pyruvate dehydrogenase. *Applied and environmental microbiology* 76: 2107-2114.

West, A. H. y A. M. Stock. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in biochemical sciences* 26: 369-376.

Widdel, F. y R. Rabus. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* 12: 259-276.

Wirth, R; A. Friesenegger y S. Fiedler. (1989) Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet* 216: 175-177.

Wischgoll, S; D. Heintz; F. Peters; A. Erxleben; E. Sarnighausen; R. Reski; A. Van Dorsselaer y M. Boll. (2005) Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. *Mol Microbiol* 58: 1238-1252.

Wöhlbrand, L; B. Kallerhoff; D. Lange; P. Hufnagel; J. Thiermann; R. Reinhardt y R. Rabus. (2007) Functional proteomic view of metabolic regulation in "*Aromatoleum aromaticum*" strain EbN1. *Proteomics* 7: 2222-2239.

Wolanin, P. M; P. A. Thomason y J. B. Stock. (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome biology* 3: REVIEWS3013.

Wright, J. S., 3rd y R. J. Kadner. (2001) The phosphoryl transfer domain of UhpB interacts with the response regulator UhpA. *Journal of bacteriology* 183: 3149-3159.

Wu, J. y C. E. Bauer. (2010) RegB kinase activity is controlled in part by monitoring the ratio of oxidized to reduced ubiquinones in the ubiquinone pool. *mBio* 1.

Yang, C. C. y H. A. Nash. (1989) The interaction of *E. coli* IHF protein with its specific binding sites. *Cell* 57: 869-880.

Yoshida, T. S. Phadtare y M. Inouye. (2007) Functional and structural characterization of EnvZ, an osmosensing histidine kinase of *E. coli*. *Methods in enzymology* 423: 184-202.

Zaar, A; W. Eisenreich; A. Bacher y G. Fuchs. (2001) A novel pathway of aerobic benzoate catabolism in the bacteria *Azoarcus evansii* and *Bacillus stearothermophilus*. *The Journal of biological chemistry* 276: 24997-25004.

Zaar, A; J. Gescher; W. Eisenreich; A. Bacher y G. Fuchs. (2004) New enzymes involved in aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *Mol Microbiol* 54: 223-238.

Zapf, J. (1998) Growth promotion by insulin-like growth factor I in hypophysectomized and diabetic rats. *Molecular and cellular endocrinology* 140: 143-149.

Zhou, J; M. R. Fries; J. C. Chee-Sanford y J. M. Tiedje. (1995) Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth of toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45: 500-506.

Zhu, Y. y M. Inouye. (2003) Analysis of the role of the EnvZ linker region in signal transduction using a chimeric Tar/EnvZ receptor protein, Tez1. *The Journal of biological chemistry* 278: 22812-22819.

Ziegelhoffer, E. C. y P. J. Kiley. (1995) In vitro analysis of a constitutively active mutant form of the *Escherichia coli* global transcription factor FNR. *Journal of molecular biology* 245: 351-361.