

**La molibdoenzima ARC en *Chlamydomonas reinhardtii*: Destoxificación y producción de NO**

**Tesis Doctoral**

**Alejandro Chamizo Ampudia**

**Córdoba, 2016**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



TITULO: *La molibdoenzima ARC en Chalmydomonas reinhardtii: Destoxificación y producción de NO*

AUTOR: *Alejandro Chamizo Ampudia*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





**TÍTULO DE LA TESIS:** La molibdoenzima ARC en *Chlamydomonas reinhardtii*: Destoxificación y producción de NO

**DOCTORANDO/A:** Alejandro Chamizo Ampudia

**Emilio Fernández Reyes**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba; y **Ángel Llamas Azúa**, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba

Informan que:

La presente Tesis Doctoral titulada “**La molibdoenzima ARC en *Chlamydomonas reinhardtii*: Destoxificación y producción de NO**” realizada por **D. Alejandro Chamizo Ampudia** se ha desarrollado en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba bajo nuestra dirección.

Esta Tesis Doctoral reúne todas las condiciones exigidas según la legislación vigente. Su evolución y desarrollo ha seguido el plan de trabajo inicialmente previsto, alcanzándose los objetivos previamente marcados. Durante la elaboración de la Tesis, el doctorando ha realizado una labor altamente satisfactoria dentro del grupo de investigación.





Los resultados obtenidos en esta tesis, han sido publicados en revistas internacionales de reconocido prestigio. Otros resultados están en espera de publicación en un futuro próximo.

Además, el doctorando ha publicado varios capítulos de libros, ha participado en diversos congresos nacionales e internacionales en el área de interés y ha realizado una estancia breve en un grupo de investigación extranjero de reconocido prestigio en el área en la que se enmarca la tesis.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Firma del/de los director/es

Fdo.: Emilio Fernández Reyes

Fdo.: Ángel Llamas Azúa



# **La molibdoenzima ARC en *Chlamydomonas reinhardtii*: Destoxificación y producción de NO**

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular

Alejandro Chamizo Ampudia

Licenciado en Bioquímica

LOS DIRECTORES,

Fdo.: Emilio Fernández Reyes  
Catedrático del Departamento de  
Bioquímica y Biología  
Molecular. Universidad de  
Córdoba

Fdo.: Ángel Llamas Azúa  
Profesor Titular del Departamento  
de Bioquímica y Biología  
Molecular. Universidad de  
Córdoba



**Emilio Fernández Reyes**, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba,

**INFORMA:**

Que el trabajo presentado como Tesis Doctoral por Don. Alejandro Chamizo Ampudia, titulado “La molibdoenzima ARC en *Chlamydomonas reinhardtii*: Destoxificación y producción de NO”, ha sido realizado bajo mi dirección en los laboratorios de este Departamento y reúne las condiciones exigidas según la legislación vigente.

Y para que conste, firmo el presente en

Córdoba, a        de        de 2015

Firma de los director/es

Fdo.: Emilio Fernández Reyes



**Ángel Llamas Azúa**, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba,

**INFORMA:**

Que el trabajo presentado como Tesis Doctoral por Don. Alejandro Chamizo Ampudia, titulado “La molibdoenzima ARC en *Chlamydomonas reinhardtii*: Destoxificación y producción de NO”, ha sido realizado bajo mi dirección en los laboratorios de este Departamento y reúne las condiciones exigidas según la legislación vigente.

Y para que conste, firmo el presente en

Córdoba, a        de        de 2015

Firma de los director/es

Fdo.: Ángel Llamas Azúa





Mediante la defensa de esta memoria se pretende optar a la obtención de la mención de “Doctorado Internacional”, habida cuenta que el doctorando reúne los requisitos exigidos para tal mención:

1. Se cuenta con los informes favorables de dos doctores expertos, con experiencia investigadora acreditada, pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación fuera de España.
2. En el Tribunal, que ha de evaluar la Tesis, existe un miembro de un instituto de educación superior o centro de investigación de un país distinto al nuestro.
3. Parte de la redacción y defensa de esta Memoria se realizará en una de las lenguas habituales para la comunicación científica en distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España.
4. El doctorando ha realizado una estancia de investigación en el Institut für Biochemie Universität zu Köln (Germany). La estancia, de un trimestre de duración, se realizó gracias a la concesión de una ayuda para la realización de estancias breves en otros centros I+D concedida por la universidad de Córdoba y el ceiA3.

El trabajo que engloba la presente Memoria se ha realizado durante el periodo de disfrute de una Beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.



**A mi hija,  
A mi mujer  
Y a mis padres**



## AGRADECIMIENTOS

Cuando empiezas a escribir los agradecimientos te das cuenta de la cantidad de gente que ha pasado por tu vida desde el momento en que decides realizar la tesis. En primer lugar, he tenido suerte por el grupo que elegí, ya que al comienzo de la tesis te encuentras con gente con tantos conocimientos que uno siente que no va a estar a la altura, pero en este grupo he tenido el gran placer, desde el principio, de conocer gente que me ha enseñado a entender la frase de Miguel de Unamuno que dice así, “El modo de dar una vez en el clavo es dar cien veces en la herradura”.

Este grupo me ha hecho descubrir muchos conceptos nuevos que he podido poner en práctica durante estos años, he tenido la oportunidad de aprender a utilizar muchas técnicas y además he mantenido muchas discusiones científicas, con las que me he sentido realizado. Por todo eso, en primer lugar quiero dar las gracias a Emilio, Ángel y Aurora. Ellos han sabido encauzar a este toro desbocado de ideas, y eso que, en algunas ocasiones, no ha sido demasiado fácil. Sobre todo quiero agradecer a los tres la paciencia y la fe que han depositado en mí desde el principio.

Otro pilar importante en esta tesis han sido los compañeros del laboratorio, con los que he trabajado codo con codo. Han sido muchos los buenos momentos que hemos pasado juntos y aunque los ha habido no tan buenos, me quedo con el espíritu de lucha, que ante las situaciones buenas o malas, nunca habéis tirado la toalla.

De mis compañeros, en primer lugar quiero dar las gracias a David, por ser una persona decidida y atrevida. De ti he aprendido el ímpetu para no amedrentarme ante ningún problema en el laboratorio, por mucho que las cosas se torcieran. A Manolo tengo muchísimas cosas que agradecerle, entre ellas el haber sido mi mentor, haberme acogido en su casa cuando hice la

estancia en Alemania y el enseñarme una de las cosas más importantes que me han enseñado hasta el momento , la ciencia y la vida personal no tienen por qué estar reñidas. A Emanuel, porque me encanta tu forma de darle la vuelta a las cosas para salirte siempre con la tuya, gracias a ti he podido aprender que cualquier cosa depende del punto de vista con la que se mire y agradecerte, también, esas discusiones científicas tan productivas. A José Javier, a ti tengo que agradecerte toda la ayuda que me diste, el cariño y sobre todo la gran capacidad de aguante que tanto envidio de ti, como te dije en su día, tú eres un pilar importantísimo de este laboratorio en el cual has dejado una grandísima huella. Maribel, a ti tengo que agradecerte tu ayuda en mis primeros pasos, cuando empecé en el laboratorio tan miedoso, también esa paciencia que tenías conmigo a la hora de atender mis estirpes y pedidos. Zahira, a ti te quiero agradecer esas charlas que teníamos de vez en cuando, tu apoyo en los momentos más bajos y, sobre todo, por esas discusiones con Emanuel por los colores que pegan y los que no. Fran, eres un tío de bandera, sabes siempre como animar el laboratorio, con ese chiste o gracia que saca una sonrisa a todo el mundo. Lo peor que llevo de ti es que seas del Madrid. José Luis, a ti tengo que agradecerte esas miradas de complicidad, esas muestras de ánimo, y esas discusiones por la hoja de reserva del HPLC en la que tú nunca te apuntabas. Victoria, a ti tengo que agradecerte el llevar esa sonrisa permanente pase lo que pase, esa capacidad de no discutir por nada y sobre todo, ese interés por querer aprenderlo todo. Rocío, a ti te agradezco lo recto que nos tenías a todos a la hora de mantener el laboratorio y esa disciplina militar a la hora de afrontar los problemas.

Quiero agradecer también a Conchi, ya que siempre me ha ayudado mucho en el papeleo que he necesitado, además de mirar siempre por los becarios.

Quiero agradecer a mi familia política (Suegros, Cuñadas y Cuñados) que desde el primer día que os conocí me hicierais sentir como uno más de

vuestra familia, aunque vosotros no os dierais cuenta me disteis muchas fuerzas para seguir con mi formación en esta ciudad. Por eso quiero agradecer todos esos gestos de apoyo que han hecho más llevadera la distancia con mi familia.

A mi hermano Ángel le tengo que agradecer que fuera mi guía en la vida. Gracias a ti soy una persona más fuerte ante los problemas. Desde pequeño siempre te has preocupado por mí, mirando siempre lo que hacía. Tú me has enseñado que ser el pequeño no implicaba que tuviera que rendirme a las imposiciones del mayor y que había que luchar aunque no siempre ganaras las guerras. En esta etapa de tesis no iba a ser diferente, me has animado con preguntas como “¿Cuándo vas a inventar algo?”. Por esto a ti hermano, decirte que has sido una persona muy importante en todo este tramo a la cual siempre he admirado, por eso quiero que sepas que un trocito de esta tesis es también tuya. Por supuesto a mi cuñada y sobrino por formar parte de esta última etapa.

De las tres personas a las que más tengo que agradecer que hoy este aquí, dos son mis padres. Decirles que les quiero, que sin ellos no hubiera llegado a donde estoy, sé que habéis sacrificado vuestra felicidad y economía para dejar ir a vuestro hijo muy joven en busca de una formación que le diera un futuro mejor; soy consciente de que no todos los padres son capaces de hacer lo que vosotros habéis hecho por mí. Vosotros me disteis la oportunidad de demostrar de lo que soy capaz, confiando siempre en mí incluso cuando todo lo veía negro. Por eso quiero deciros que esta tesis tiene una gran parte de vosotros, y sobre todo que vosotros sois una gran parte de mí.

El agradecimiento más grande se lo debo a una persona que conocí en primero de carrera y que lleva conmigo desde entonces, a ti Luisa te debo todo. A ti tengo que agradecerte que hayas creído siempre en mí, incluso cuando yo mismo no lo hacía, tu has mirado en mi interior descubriendo



facetas de mí que incluso yo desconocía, además de saber darme el empujoncito que necesito en algunos momentos. Gracias por enseñarme a vivir el presente, no el futuro y a mirar de vez en cuando al pasado, eso me ha traído mucha felicidad, y principalmente gracias por darme una hija que es el mayor logro que pueda tener un hombre en la vida.

A ti hija mía, te tengo que decir que has llenado mi corazón de ilusión. Desde la noticia de tu llegada se ha abierto un mundo nuevo para mí, que deseo explorar junto a ti y tu madre. También has sido en esta etapa última de la tesis la fuerza e inspiración que necesitaba.

Y por último decir que en este tiempo de escritura al mirar atrás uno se da cuenta de lo que significa la tesis, que resumo en esta frase: La tesis es una etapa más de la vida de un científico, pero es la etapa clave para conocerse como científico.

“Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido.

Es hora de comprender más y temer menos.”

*Marie Curie.*



# **ABSTRACT**



## **Abstract**

The ARC (amidoxime reducing component) protein was discovered in 2006 as a new molybdenum cofactor (Moco)-containing enzyme involved in the reduction of N-hydroxylated compounds (NHC). Proteins of this family are distributed throughout the three kingdoms of living organisms. In this thesis we have identified the ARC protein of *Chlamydomonas*, and the proteins that interact with it. The role of the ARC protein in regulating the metabolic pathway of nitrate assimilation is proposed, the confirmation of a prediction of its structure, and finally its capacity to store Moco have been addressed.

## **Chapter I**

The ARC protein is a new molybdoenzyme about which not much is known. This protein is 329 amino acids long with two conserved domains such as the  $\beta$ -barrel and the MOSC. This protein seems to have a role in detoxifying of N-hydroxy compounds such as hydroxylamine purine (HAP), which is a compound analogous to adenine and therefore mutagenic.

In this thesis, we have identified this ARC protein in *Chlamydomonas* as a molybdoenzyme. *Chlamydomonas* mutants affected in this protein are unable to develop the detoxification activity of HAP, which seems to depend on Moco.

Two other proteins responsible for the transfer of electrons from NADH to ARC were also identified. In bacteria this transfer occurs by a ferredoxin domain and a reductase protein (CYSJ), whereas in humans by Cytb5 and Cytb5-R. In *Chlamydomonas*, we have studied *in vivo* this capability of transfer for the six ferredoxins and five Cytb5 from the alga, and

verified *in vitro* that Cytb5-R together with ARC and Cytb5-1 were able to reduce HAP with electrons from NADH.

By gel filtration, the interaction of the proteins ARC, Cytb5 and Cytb5-R was found to have a stoichiometry of 1: 2: 1, where there are two cytochrome b5 to save the two electrons provided by NADH to the Cytb5-R.

ARC protein binds Moco, as determined by fluorescence analysis of FormA, and ICP-MS. ARC activity *in vitro* is enhanced about 10 times in the presence of Zn by increasing its maximum velocity, though the  $K_m$  also increases.

By *in vitro* mutagenesis of each of the cysteines in the ARC protein it is shown that C252 binds Moco, which indicates that the ARC protein belongs to the family of sulfite oxidase and nitrate reductase.

Moreover, *in vitro* mutagenesis of additional 14 conserved amino acids, of which only nine mutants maintained a correct folding of the ARC protein, suggests that F210 and R276 interacts with the Moco, D182 and R211 are related to the active site, and W128, L139, E224 and E267 to in the interaction with other proteins.

A possible structure of the protein ARC can be obtained with bioinformatics programs and the residues within it fit with the proposed location and the expected ARC phenotype when mutated.

## **Chapter II**

The ARC protein interacts with a Cytb5-1 and Cytb5-R. This structure formed by 3 proteins shows similarity to the NR, as it bears a Moco group, heme and another FAD group excepting the Moco active site, particular for

each enzyme, and the dimerization domain, only present in NR. Moreover, there are no studies utilizing ARC mutants, so in this chapter we performed the following steps.

First, we tried to identify ARC mutants of *Chlamydomonas* in the mutant collection available in the group, but no clear mutants were obtained. Therefore a design technique of miRNA to interfere with *ARC* gene expression was undertaken. Two antisense mutants were isolated.

These antisense mutants were affected in their growth in nitrate medium, but not in ammonium. In addition, their NR activity increased, which results in an active nitrite excretion without effects on nitrite reductase activity. In turn, NR mutants showed an enhanced *ARC* expression. In the wild type, *ARC* expression increased in nitrate, but especially in nitrite. While, in the *ARC* antisense mutants, the NR increased its expression and activity with nitrite.

Moreover, the alignment of NR with Cytb5-1 and Cytb5-R shows a high homology, suggesting that NR and ARC could interact. A typical Michaelis kinetics is found for assays activity using different concentrations of NR with ARC together. Furthermore, nitrite inhibits competitively ARC activity with benzamidoxime, so that nitrite might be ARC substrate.

The interaction of ARC and NR seems to occur and to use nitrite as a substrate. Nitric oxide production cannot occur *in vivo* with a NR deletion mutant, but it can occur with a NR mutant provided its diaphorase activity is functional. By chemoluminesce, it is shown that NR can produce nitric oxide from nitrite, but not with nitrite in the presence of nitrate. However, in this condition of nitrite plus nitrate, ARC plus NR, can produce efficiently nitric oxide from nitrite, with electrons provided by NAD(P)H-NR.





# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO.....</b>	<b>3</b>
<i>I.1.1 Importancia del nitrógeno .....</i>	<i>3</i>
<i>I.1.2 Transporte de nitrógeno inorgánico.....</i>	<i>5</i>
I.1.2.1 Transporte de nitrato y nitrito. ....	5
I.1.2.2 Transporte de amonio.....	7
<i>I.1.3 Asimilación intracelular de nitrógeno inorgánico.....</i>	<i>8</i>
I.1.3.1 Asimilación de nitrato .....	8
I.1.3.1.1 Reducción de nitrato a nitrito por la Nitrato Reductasa ...	10
I.1.3.1.2 Reducción de nitrito a amonio por la Nitrito Reductasa (NiR) .....	11
I.1.3.1.3 Asimilación de amonio por el ciclo GS/GOGAT.....	12
<i>I.1.4 Regulación de la asimilación de nitrógeno inorgánico .....</i>	<i>13</i>
I.1.4.1 Moléculas señalizadoras del estado nitrogenado .....	13
I.1.4.2 El Óxido Nítrico (NO) .....	15
I.1.4.3 Regulación por Óxido Nítrico.....	18
I.1.4.4 Regulación por fosforilación.....	20
I.1.4.5..... Factores de transcripción implicados en la regulación de la asimilación de nitrógeno.....	21
<b>I.2 MOLIBDENO .....</b>	<b>25</b>
<i>I.2.1. El Molibdeno, importancia, distribución y disponibilidad.....</i>	<i>25</i>
<i>I.2.2. El cofactor de Mo .....</i>	<i>26</i>
I.2.2.1 Biosíntesis del cofactor de molibdeno .....	29
I.2.2.1.1. Paso 1, conversión de GTP en cPMP.....	31
I.2.2.1.2. Paso 2, síntesis de molibdopterina .....	31
I.2.2.1.3. Paso 3, adenilación de la molibdopterina.....	32
I.2.2.1.4. Paso 4, la inserción de molibdeno.....	33
I.2.2.1.5. Inserción del cofactor de Mo en las molibdoenzimas .....	33
I.2.2.2. Molibdoenzimas.....	34
I.2.2.2.1. Nitrato reductasa .....	35
I.2.2.2.2. Sulfito oxidasa.....	37
I.2.2.2.3. Xantina deshidrogenasa.....	38
I.2.2.2.4. Aldehído oxidasa.....	39
I.2.2.2.5. Componente reductor de amidoxima (ARC).....	40

1.2.3. Deficiencia de cofactor de Mo en eucariotas .....	42
1.2.3.1...Desarrollo de terapias para paliar la deficiencia de cofactor de Mo.....	45
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>53</b>
<b>CHAPTER I: THE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII MOLYBDENUM COFACTOR ENZYME CRARC HAS A ZN-DEPENDENT ACTIVITY AND PROTEIN PARTNERS SIMILAR TO THOSE OF ITS HUMAN HOMOLOGUE .....</b>	<b>55</b>
<b>1.1 Introduction .....</b>	<b>58</b>
1.2 Results.....	63
1.2.1. The <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Moco mutants are sensitive to HAP .....	63
1.2.2. Cytb5, but not Fd, is involved in HAP resistance in <i>Chlamydomonas</i> .....	64
1.2.3. The identification of the second crARC partner .....	68
1.2.4. The <i>in vitro</i> HAP reduction by crARC depends on Cytb5-1 and Cytb5-R .....	74
1.2.5. Protein interaction studies of crARC, Citb5-1 and Citb5-R....	75
1.2.6. The crARC system has a Zn-dependent activity .....	78
1.2.7. The crARC stability with the time and with the temperature .	79
1.2.8. A fully conserved cysteine is essential for crARC activity.....	81
1.2.9. The study of diferents crARC mutants.....	83
<b>Discussion of Chapter I.....</b>	<b>93</b>
1.3. Discussion.....	95
<b>CHAPTER II: A DUAL SYSTEM FORMED BY THE ARC AND NR MOLYBDOENZYMES MEDIATES NITRITE-DEPENDENT NO PRODUCTION IN <i>CHLAMYDOMONAS</i> .....</b>	<b>105</b>
<b>2.1 Introduction .....</b>	<b>107</b>
2.2. Results.....	109
2.2.1. The search of ARC deletion/ insertional mutants.....	109
2.2.2. The <i>NIA1</i> and <i>ARC</i> expression is similar.....	111
2.2.3. The nitrite effect in the <i>ARC</i> expression and activity.....	115
2.2.4. NR can supply electrons for ARC activity.....	118

2.2.5. Study of NR and ARC interaction .....	120
2.2.6. ARC-NR catalyzes NO production from nitrite.....	122
2.2.7. ARC-NR catalyzes NO production from nitrite.....	125
<b>Discussion of Chapter II.....</b>	<b>129</b>
2.3. Discussion.....	131
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>137</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>143</b>
M.1. COMPUESTOS QUÍMICOS Y ESTIRPES.....	<b>145</b>
M.1.1. Estirpes de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	145
M.1.2. Estirpes bacterianas.....	146
M.2. VECTORES.....	<b>147</b>
M.2.1. Vectores de clonación .....	147
M.2.2. Vectores de expresión de proteínas .....	147
M.3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	<b>148</b>
M.3.1. Medios de <i>Chlamydomonas</i> .....	148
M.3.2. Medios de bacterias .....	150
M.3.2.1. Medio LB.....	150
M.3.2.2. Medio VB .....	150
M.3.2.3. Medio para células competentes .....	151
M.3.2.4. Conservación de bacterias.....	151
M.3.3. Test de crecimiento con estirpes de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> con HAP .....	151
M.3.4. Test de crecimiento con estirpes de <i>Escherichia coli</i> con HAP	152
M.3.5. Test de resistencia en Bacterias.....	152
M.3.6. Excreción de nitrito en <i>Chlamydomonas</i> en medio rico en Nitrato .....	152
M.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA .....	<b>153</b>
M.4.1. Transformación genética de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	153
M.4.2. Transformación genética de <i>Escherichia coli</i> .....	153
M.4.2.1. Preparación de células competentes.....	153
M.4.2.2. Transformación de células competentes .....	154
M.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	<b>155</b>
M.5.1. Actividad NAD(P)H de ARC.....	155

M.5.2. Actividad BVH-ARC (Bencil Viológeno con ARC) .....	155
M.5.3. Actividad NAD(P)H-Nitrato Reductasa (NAD(P)H-NR).....	156
M.5.4. Actividad BVH-NR .....	156
M.5.5. Determinación de la actividad NAD(P)H de flavin reductasas	157
<b>M.6. MEDIDAS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....</b>	<b>158</b>
M.6.1. Cuantificación de NO mediante fluorescencia medida con DAF- FM DA.....	158
M.6.2. Cuantificación de NO mediante el Analizador de Óxido Nítrico (NO <sub>x</sub> ) .....	159
<b>M.7. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....</b>	<b>160</b>
M.7.1. Extracción de RNA total de <i>Chlamydomonas</i> .....	160
M.7.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i> mediante lisis alcalina .....	161
<b>M.8. CUANTIFICACIÓN, MANIPULACIÓN Y TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS     DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....</b>	<b>162</b>
M.8.1. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	162
M.8.1.1. Cuantificación espectrofotométrica .....	162
M.8.1.2. Cuantificación electroforética. ....	162
M.8.2. Electroforesis en geles de agarosa .....	162
M.8.2.1. Separación de fragmentos de DNA.....	162
M.8.2.2. Visualización de los ácidos nucleicos .....	163
M.8.2.3. Rescate de DNA de geles de agarosa mediante congelación .. .....	163
M.8.3. Digestión de moléculas de DNA .....	164
M.8.4. Desfosforilación de extremos de moléculas de DNA .....	164
M.8.5. Clonación de moléculas de DNA .....	164
M.8.5.1. Ligación de fragmentos de DNA generados mediante enzimas de restricción.....	164
M.8.5.2. Ligación de fragmentos de DNA generados mediante PCR... .....	165
M.8.6. Secuenciación de DNA.....	165
<b>M.9. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....</b>	<b>165</b>
M.9.1. PCR estándar .....	166
M.9.2. PCR con Polimerasa de alta fidelidad.....	167
M.9.3. Síntesis de cDNA.....	167
M.9.4. PCR cuantitativa a tiempo real.....	168

M9.4.1. Diseño de cebadores y especificidad de las reacciones .....	169
M.9.4.2. RT-PCR a tiempo real con mezcla de reacción casera .....	170
M.9.4.3. RT-PCR a tiempo real con el kit comercial “SsoFast™ EvaGreen® Supermix” (BioRad) .....	172
M.9.4.4. Análisis, normalización y validación de los datos .....	173
<b>M.10. ESTRATEGIA DE SILENCIAMIENTO MEDIANTE MIRNA .....</b>	<b>174</b>
<b>M.11. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN ESCHERICHIA COLI.....</b>	<b>175</b>
<i>M.11.1. Expresión de CrARC y mutantes puntuales .....</i>	<i>175</i>
M.11.1.1. Clonación de crARC en pQE80L (como ejemplo de clonación) .....	175
M.11.1.2. Clonación de crARC mutantes puntuales en pQE80L....	176
M.11.1.3. Clonación de citb5s y CysJ de Chlamydomonas .....	177
M.11.1.4. Clonación de hmARCs de humanos .....	178
<i>M.11.2. Clonación de la nitrato Reductasa en pQE80L .....</i>	<i>178</i>
<i>M.11.3. Purificación de las proteínas recombinantes 6xHis mediante     cromatografía de afinidad.....</i>	<i>178</i>
M.11.3.1. Obtención del extracto crudo .....	178
M.11.3.2. Cromatografía de afinidad .....	179
M.11.3.3 Preparación de geles, electroforesis y tinción de proteínas en geles de poliacrilamida .....	180
<b>M.12. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....</b>	<b>182</b>
<i>M.12.1. Determinación de proteínas .....</i>	<i>182</i>
M.12.1.1. Determinación colorimétrica (Bradford) .....	182
M.12.1.2. Determinación espectrofotométrica a 280 nm .....	182
<i>M.12.2. Determinación de molibdopterina (MPT) .....</i>	<i>183</i>
<i>M.12.3. Determinación por HPLC de HAP y Adenina .....</i>	<i>184</i>
<i>M.12.4. Determinación por HPLC de Benzamidoxima y Benzamidina</i>	<i>185</i>
<i>M.12.5. Determinación de cantidad de Hemo en los citocromos b5 ...</i>	<i>186</i>
<i>M.12.6. Determinación de cantidad de FAD en las reductasas.....</i>	<i>186</i>
<i>M.12.7. Determinación de cantidad de Mo y Zinc por ICP-OES .....</i>	<i>186</i>
<i>M.12.8. Determinación del peso molecular por cromatografía.....</i>	<i>187</i>
<i>M.12.9. Separación de proteínas por cromatografía de intercambio     aniónico.....</i>	<i>188</i>
<b>M.13. ESTUDIOS DE ESTRUCTURA TERCIARIA Y CUATERNARIA DE     MUTANTES DE CRARC.....</b>	<b>189</b>
<b>M.14. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>189</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

<b>Figura I.1.</b> Fuentes de nitrógeno inorgánico usadas en plantas. ....	4
<b>Figura I.2.</b> Ruta de asimilación de nitrato a esqueletos carbonados en plantas. ....	9
<b>Figura I.3.</b> Características estructurales y diferentes actividades de la NR de eucariotas.....	10
<b>Figura I.4.</b> Características estructurales de NiR de eucariotas.....	11
<b>Figura I.5.</b> Esquema del ciclo GS/NADPH-GOGAT y GDH.....	13
<b>Figura I.6.</b> Representación esquemática de las principales fuentes de producción de NO. ....	17
<b>Figura I.7.</b> Estructura química deL cofactor de Mo.....	28
<b>Figura I.8.</b> Esquema de la ruta de biosíntesis del cofactor de molibdeno en eucariotas.....	30
<b>Figura I.9.</b> Regulación de NR por 14-3-3 en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	37
<b>Figura I.10.</b> Complejo ARCO. ....	41
<b>Figura I.11.</b> Comparación de la organización de los dominios de las molibdoenzimas eucariotas. ....	42
<b>Figura I.12.</b> Esquema global del metabolismo del cofactor de molibdeno. ..	44
<b>Figura I.13.</b> Efecto del tratamiento de ratones defectivos en el gen <i>MOCS1</i> con cPMP. ....	47



## RESULTS AND DISCUSSION

### CHAPTER I

<b>Figure 1.1.</b> Schematic structure of Moco, .....	60
<b>Figure 1.2.</b> The domains of proteins hmARC, crARC and YcbX.....	62
<b>Figure 1.3.</b> HAP toxicity in the <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Moco mutants. .....	63
<b>Figure 1.4.</b> HAP toxicity of <i>E. coli</i> strains expressing proteins.. ..	67
<b>Figure 1.5.</b> Multiple-sequence alignment of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> and human Cytb5 proteins. ....	69
<b>Figure 1.6.</b> UV-visible absorption spectra and purity of recombinant crARC, YcbX, Cytb5-1, Cytb5-R and crCysJ.....	73
<b>Figure 1.7.</b> Studies of interaction between ARC, Cytb5-1 and Cytb5-R. ....	76
<b>Figure 1.8.</b> The crARC system has a Zn-dependent activity.....	79
<b>Figure 1.9.</b> The ARC stability.. ..	80
<b>Figure 1.10.</b> Multiple-sequence alignment of ARC proteins.....	82
<b>Figure 1.11.</b> HAP reduction and Moco contents of crARC and their mutants. .....	83
<b>Figure 1.12.</b> Multiple-sequence alignment of ARC proteins.....	84
<b>Figure 1.13.</b> Fluorescence spectrum of the 13 crARC mutants.....	85
<b>Figure 1.14.</b> Predicted In silico crARC protein structure with Swiss- PdbViewer and Swiss-model program. T.....	86
<b>Figure 1.15.</b> HAP reduction activity by crARC wild-type and mutants.....	87
<b>Figure 1.16.</b> The Moco content in the isolated mutants.. ..	87
<b>Figure 1.17.</b> The behavior of ARC mutants.. ..	88
<b>Figure 1.18.</b> Prediction of the structure of the active center of the protein crARC with Swiss-PdbViewer and Swiss-model program. ....	100
<b>Figure 1.19.</b> Scheme of the <i>Chlamydomonas</i> ARC system.....	101

### CHAPTER II

<b>Figure 2.1.</b> Schematic primers localization in the ARC gene region.. ..	110
<b>Figure 2.2.</b> The growth, the NR activity and NIA1 transcript in the ARC mutants. ....	112
<b>Figure 2.3.</b> Nitrite excretion activity.. ..	113
<b>Figure 2.4.</b> Nitrite Reductase activity.....	114

<b>Figure 2.5.</b> ARC expression in several nitrogen sources and strains.. .....	115
<b>Figure 2.6.</b> ARC in vitro activity.....	116
<b>Figure 2.7.</b> Calculation of the Inhibition constant $K_i$ , $K_m$ and $V_{max}$ of ARC.. .....	117
<b>Figure 2.8.</b> Recombinantly expressed proteins.....	118
<b>Figure 2.9.</b> Alignment of <i>Chlamydomonas</i> crNR, Cytb5-1Cytb5-R proteins. .....	119
<b>Figure 2.10.</b> <i>Chlamydomonas</i> ARC and NR in the benzamidoxime reduction activity.....	120
<b>Figure 2.11.</b> Effect of ARC on NR activity.....	121
<b>Figure 2. 12.</b> <i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> Nitric oxide production.....	123
<b>Figure 2.13.</b> $H_2O_2$ test in the <i>E. coli</i> bacterium. ....	124
<b>Figure 2.14.</b> ARC activities with different reductases.. .....	126
<b>Figure 2.15.</b> Different conformations of the NR dimer.....	134
<b>Figure 2.16.</b> Scheme of the possible interaction between NR domains and ARC.....	135

## MATERIAL Y METODOS

<b>Figura M.1.</b> Bote específico para medir óxido nítrico.. .....	159
<b>Figura M.2.</b> Esquema de la preparación de una placa para RT-PCR.....	170
<b>Figura M.3.</b> Representación esquemática del vector pQE-80.....	176

# **TABLAS**

## **INTRODUCCIÓN**

<b>Tabla I.1.</b> Las familias de las molibdoenzimas en eucariotas y su distribución. .....	35
--	----

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **CHAPTER I**

<b>Table 1.1.</b> Cofactor content of recombinant proteins used in this work. ....	70
<b>Table 1.2.</b> Determination of flavin reductase activity of Cytb5-R and crCysJ. .....	72
<b>Table 1.3.</b> HAP reduction by the crARC system <sup>a</sup> .....	74

## **MATERIAL Y METODOS**

<b>Tabla M.1.</b> Estirpes de <i>Chlamydomonas</i> usadas en este trabajo. ....	145
<b>Tabla M.2.</b> Estirpes de <i>Escherichia coli</i> usadas en este trabajo.....	146
<b>Tabla M.3.</b> Vectores de clonación usados en este trabajo.....	147
<b>Tabla M.4.</b> Vectores de expresión de proteínas. ....	147
<b>Tabla M.5.</b> Condiciones usadas en la PCR estándar.....	166
<b>Tabla M.6.</b> Composición de las reacciones de PCR a tiempo real.....	171
<b>Tabla M.7.</b> Condiciones de amplificación utilizadas en la RT-PCR .....	172
<b>Tabla M.8.</b> Condiciones de amplificación utilizadas en la RT-PCR con kit comercial. ....	172
<b>Tabla M.9.</b> Datos para la cuantificación de todas las proteínas purificadas.	183
<b>Tabla M.10.</b> Cebadores usados. ....	190

## Abreviaturas generales

**aa:** Aminoácidos, amino acids

**ARC:** Componente de Reducción de Amidoxima, Amidoxime Reducing Component

**BVH:** Bencil viológeno reducido, Benzyl viologen

**cdNA:** DNA complementario, complementary DNA

**CisJ:** Reductasa de *Escherichia coli*, Reductase of *Escherichia coli*

**Cytb5:** Citocromo b5, Cythochrome b5

**Cytb5-R:** Citocromo b5-Reductasa, Cytochrome b5 Reductase

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico, Deoxyribonucleic acid

**dNTP:** desoxi-nucleótido trifosfato, Deoxynucleotide triphosphates

**Da:** Daltons

**DAF-FM DA:** Diaminofluorescein-FM diacetate

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

**DTT:** 1,4-dithiothreitol

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid

**FAD:** Flavine-adenine dinucleotide

**FeCN:** Ferricianure

**HAP:** 6-N-Hydroxy Amino Purine

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución, High Performance Liquid Chromatography

**ICP-OES:** Espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo, Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy

**IPTG:** Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactósido

**MCP:** Proteína portadora de Moco, Moco carrier protein

**PSI:** índice de solubilización de potasio, Phosphorus Solubilization Index

**TFB:** Buffer estándar de transformación, standard transformation buffer

**Moco:** Cofactor de molibdeno, Molybdenum cofactor

**MOPS:** 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid

**MPT:** Molibdopterina, molybdopterin

**NAD(P)H:** Nicotín-adenín dinucleótido (fosfato) reducido, Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate)

**NHC:** Compuesto N-hidroxilado, **N-hydroxylated compounds.**

**NO:** Óxido Nítrico, Nitric **Oxide**

**NR:** Nitrato reductasa, Nitrate **Reductase**

**Pa:** Pascal (unidad de presión, unity of pressure)

**pb:** Pares de bases, base pairs

**PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida, **Polyacrylamide gel electrophoresis**

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, **Polymerase Chain Reaction**

**PEG:** Polyethylene glicol

**PMS:** Phenazine methosulfate

**PMSF:** Phenylmethylsulfonyl fluoride

**psi:** Libras por pulgada cuadrada, **pound per square inch**

**PTIO:** 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide

**RESDA:** Amplificación dirigida sobre sitios diana de enzimas de restricción, **Restriction Enzyme Site Directed Amplification**

**RNA:** Ácido ribonucleico, **Ribonucleic acid**

**SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate

**TEMED:** N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

**Tris:** 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

**UTR:** Región no traducida, **untranslated región**

**UV:** Ultravioleta, **ultraviolet**

**Wco:** Cofactor de wolframio, tungsten cofactor

**X-Gal:** 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

**YcbX:** ARC de *Escherichia coli*

## **Abreviaturas de organismos usados**

**A. thaliana:** *Arabidopsis thaliana*

**C. crescentus:** *Caulobacter crescentus*

**C. reinhardtii:** *Chlamydomonas reinhardtii*

**E. coli:** *Escherichia coli*

**G. violaceus:** *Gloeobacter violaceus* PCC 7421

**Human:** *Homo Sapiens*

**S. coelicolor:** *Streptomyces coelicolor* A3



# **INTRODUCCIÓN**





## **I.1 Asimilación de nitrógeno**

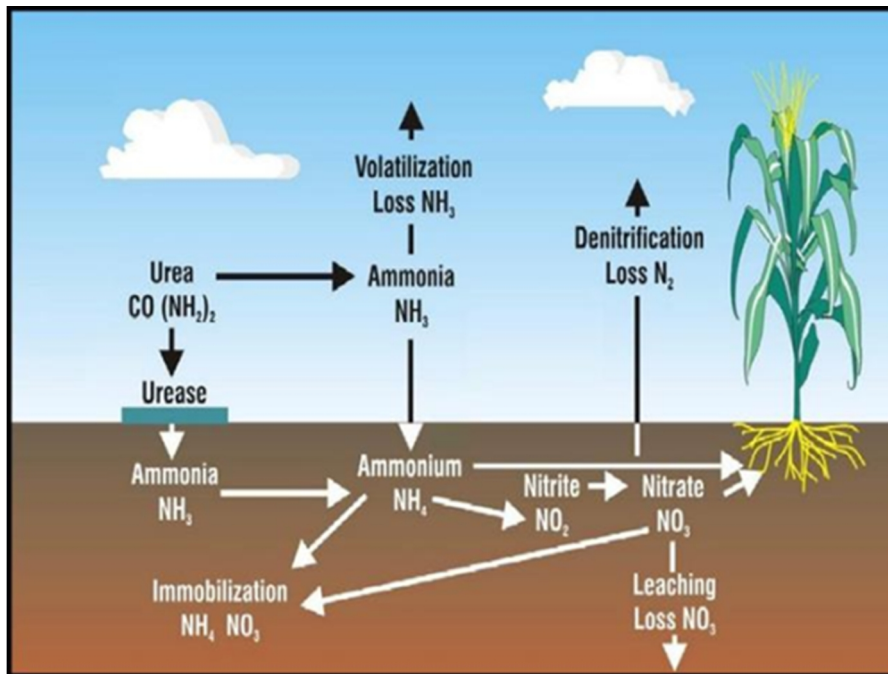
### **I.1.1 Importancia del nitrógeno**

El nitrógeno es uno de los elementos cuantitativamente más importantes para los seres vivos ya que junto con el carbono, el hidrógeno y el oxígeno constituyen más del 95 % de la masa de la mayoría de los organismos. El nitrógeno es especialmente importante en moléculas básicas para la vida como los ácidos nucleicos y las proteínas. Así pues, su asimilación es de suma importancia para la supervivencia de todos los organismos. De hecho, de todos ellos, sólo los fotosintéticos y algunos hongos, levaduras y bacterias pueden asimilar nitrógeno inorgánico.

Una de las fuentes más importantes de nitrógeno es la atmósfera, ya que está compuesta por más del 75% de nitrógeno, éste se encuentra como  $N_2$ , que sólo es asimilable, con un alto coste energético, por algunos procariontas. Los microorganismos capaces de asimilarlo pueden establecer simbiosis con ciertos tipos de plantas, donde la planta necesita del amonio producido (mediante la fijación y reducción del  $N_2$  por las bacterias) mientras que la bacteria requiere de los azúcares obtenidos por fotosíntesis en la planta. El resto de organismos capaces de asimilar el nitrógeno inorgánico desde el medio únicamente pueden hacerlo en sus formas oxidadas y reducidas, es decir, pueden asimilarlo principalmente cuando se encuentra como nitrato y amonio (Figura I.1).

Por otra parte, en las plantas, el nitrógeno suele ser el factor limitante para su crecimiento y desarrollo. Por ello, para aumentar el rendimiento de las cosechas, desde hace años, se emplean grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados (Hirsch and Sussman, 1999) de modo abusivo en muchos casos, lo que conlleva un fuerte impacto medioambiental y de salud pública.

En cuanto al nitrato, se estima que sólo un tercio de la cantidad total presente en los suelos es asimilado por los cultivos mientras que el resto se pierde por lixiviación dando lugar a la eutrofización de las aguas continentales y oceánicas (Cherfas, 1990), con el consiguiente problema medioambiental que esto conlleva.



**Figura I.1.** Fuentes de nitrógeno inorgánico usadas en plantas (tomado de <http://www.madrimasd.org/blogs/universo>).

Cabe destacar que, si bien se ha descrito un efecto negativo de los compuestos de nitrógeno oxidados a nivel de salud pública (García and Bosch, 1988; Marschner and Rimmington, 1988; Møller et al., 1989), también se reconocen efectos positivos del nitrato en la dieta (Lundberg et al., 2009).

Además, el elevado coste de producción que tienen la cantidad de fertilizantes necesarios para poder satisfacer las demandas de una población

mundial creciente hace necesaria una mejor comprensión de los mecanismos de la asimilación de nitrato en plantas.

Debido a esto se hace imprescindible entender las rutas de asimilación de nitrógeno. El primer paso es conseguir el desarrollo de cultivos mejores adaptados, en los que la productividad sea mayor y el aporte de fertilizantes sea menor. Las rutas de asimilación, propuestas hasta la fecha, poseen mecanismos reguladores tanto positivos (nitrato) como negativos (amonio) que influyen en la asimilación de nitrato (Fernandez and Galvan, 2008). También es necesario conocer cómo se regulan los transportadores implicados (Galván et al., 1996; Rexach et al., 2000; Gonzalez-Ballester et al., 2004; Loqué et al., 2007). De esta manera se podría optimizar el funcionamiento de los procesos concretos, sin afectar a otras rutas metabólicas implicadas en el correcto desarrollo de los organismos vegetales.

### **I.1.2 Transporte de nitrógeno inorgánico**

El nitrógeno inorgánico, tan importante para ciertos organismos, es introducido al interior de la célula mediante transportadores específicos de nitrato, nitrito y amonio. Una vez dentro, se distribuye para su metabolización y/o almacenamiento (Fernández et al., 2009).

#### **I.1.2.1 Transporte de nitrato y nitrito.**

Los transportadores de nitrato/nitrito se pueden clasificar en tres familias en base a la homología de secuencia que presenten: NRT1(NPF), NRT2 y NAR1 (Fernandez and Galvan, 2008).

Los conocidos como NRT1, que recientemente han sido renombrados como NPF (Léran et al., 2014), son transportadores de nitrato de baja afinidad a excepción de CHL1 (AtNRT1.1) que presenta afinidad dual por el nitrato, además de ser receptor o sensor por lo que se denomina tranceptor, siendo su afinidad alta cuando se fosforila (Tsay et al., 2007; Gojon et al., 2011).

Por su parte, NRT2 está presente en procariotas y eucariotas (Forde, 2000). Esta familia engloba los transportadores de nitrato con alta afinidad más importantes en hongos, levaduras, algas y plantas (Galvan and Fernández, 2001; Crawford and Forde, 2002; Siverio, 2002). Algunos de los transportadores de este grupo son sistemas de dos componentes ya que requieren de otra proteína para ser funcionales. Ésta proteína denominada NAR2, se encuentra anclada a la membrana mediante un dominio transmembrana, y se considera indispensable para la funcionalidad de NRT2.1 y NRT2.2, aunque no para otros posibles transportadores NRT2 (Quesada et al., 1994; Galván et al., 1996; Tong et al., 2005; Orsel et al., 2006). En *Chlamydomonas* existen seis miembros NRT2 que se engloban en cuatro sistemas de transporte en función de la afinidad y la especificidad que tengan hacia el sustrato (Fernandez and Galvan, 2007).

Por último, en la familia NAR1 se encuentran las proteínas relacionadas con los transportadores denominados FNT (Formate Nitrite Transporters) (Rexach et al., 2000). Estos transportadores se encuentran en algunos eucariotas como hongos, levaduras, algas y protozoos, pero no están en plantas (Mariscal et al., 2006). En *Arabidopsis* se ha identificado otro transportador encargado del transporte de nitrito al cloroplasto, como es el HPP, que pertenece a una nueva familia de transportadores conservada en cianobacterias y cloroplastos de plantas (Maeda et al., 2014). Por su parte, *Chlamydomonas* es considerado el organismo eucariota con mayor número de miembros de *NAR1* hasta la fecha (*NAR1.1-6*) (Mariscal et al., 2006). Al menos se ha descubierto que uno de sus miembros, NAR1.1, está implicado en el transporte de nitrito al cloroplasto (Rexach et al., 2000), aunque posiblemente algunos otros miembros tengan también la misma función (Mariscal et al., 2006).

La regulación transcripcional, postraduccional y espacial de estas familias de transportadores confiere a la célula un correcto aporte de nitrógeno desde nitrato en función de las condiciones ambientales.

### **I.1.2.2 Transporte de amonio**

A pesar de ser la fuente de nitrógeno preferentemente para las algas el amonio es poco abundante en los entornos naturales, ya que su asimilación supone un menor coste energético en comparación con la que requiere la asimilación de nitrato o nitrito (Bloom et al., 1992).

En la mayoría de los organismos se han identificado dos sistemas de transporte diferentes de amonio: de baja afinidad (LAATS), relacionado con canales de  $K^+$  de difusión pasiva (Ullrich et al., 1984; Wang et al., 1993; Crawford and Forde, 2002), y de alta afinidad (HAATS). Siendo este último el responsable del transporte activo de amonio y que parece estar acoplado a un antiporte de  $H^+$  (Howitt and Udvardi, 2000; von Wirén et al., 2000b).

Los HAATS se han descrito a nivel molecular en diversos organismos como plantas, levaduras, hongos, bacterias y animales donde forman la superfamilia AMT/MEP/Rh. En esta superfamilia se distinguen la familia AMT/MEP, formada por los transportadores de amonio de plantas, algas, hongos, levaduras y bacterias (Marini et al., 1997; Thomas et al., 2000; von Wirén et al., 2000a; Crawford and Forde, 2002; Loqué and von Wirén, 2004) y la familia de glicoproteínas Rh, presente principalmente en animales. *Chlamydomonas* presenta ambas familias (Soupene et al., 2002). Estas proteínas Rh son transportadores de baja afinidad para  $NH_3$  y funcionan como canales bidireccionales de  $CO_2$  (Soupene et al., 2002; Soupene et al., 2004).

Respecto a las AMTs, se han descrito cuatro subfamilias en plantas. La mayoría de los transportadores se engloban en la subfamilia AMT1 (von Wirén et al., 2000a; Crawford and Forde, 2002; Loqué and von Wirén, 2004).

En *Chlamydomonas* están presentes ocho miembros de la subfamilia AMT1 con distinta localización y regulación (Gonzalez-Ballester et al., 2004).

En cuanto a la ruta del amonio, una vez dentro de la célula, tiene que dirigirse al cloroplasto para su asimilación por el ciclo GS-GOGAT (Howitt and Udvardi, 2000; von Wirén et al., 2000b). También el amonio producido en la mitocondria, mediante la fotorrespiración, puede ser expulsado al citosol para su posterior asimilación (Córdoba et al., 1987; von Wirén et al., 2000b; Britto et al., 2001b; Britto et al., 2001a; Glass, 2003). Por último, la vacuola puede funcionar como almacén de amonio cuando las concentraciones de éste aumentan hasta niveles tóxicos para la célula.

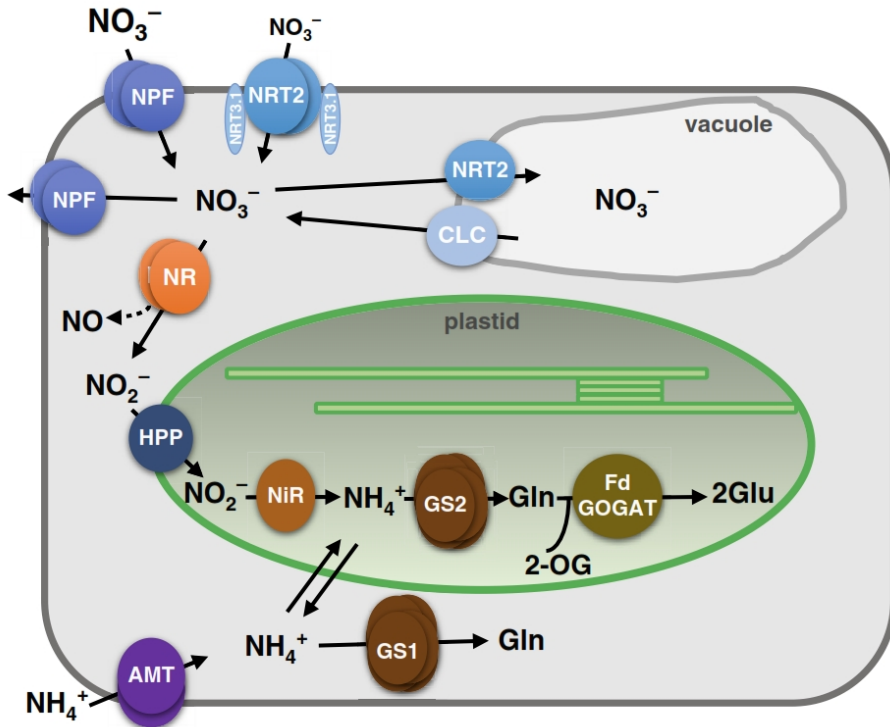
A pesar de este intenso flujo de amonio intracelular, únicamente existen pruebas moleculares de la presencia de transportadores que medien este tránsito en el caso de la vacuola. Además, se han descrito dos transportadores, AtTIP2.1 y AtTIP2.3 que no pertenecen a la familia AMT, sino que son aquaporinas que se inducen en presencia de una fuente nitrogenada rica (Loqué et al., 2005). La falta de datos moleculares para el resto de los casos ha llevado a pensar que esos flujos se dan de forma pasiva, bien a favor de gradiente por difusión del nitrógeno cuando se encuentra como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), o bien mediante canales de difusión pasiva de  $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4^+$ . Sin embargo, estudios *in silico* parecen indicar que existen transportadores que poseen péptidos señal para el cloroplasto, como es el caso de CrAMT1.2 (González-Ballester et al., 2005a).

### **I.1.3 Asimilación intracelular de nitrógeno inorgánico**

#### **I.1.3.1 Asimilación de nitrato**

La asimilación de Nitrato requiere de cuatro etapas. La primera etapa es el transporte de nitrato al interior de la célula, como comentamos anteriormente. Una vez dentro de la célula el nitrato requiere para su

asimilación dos eventos de reducción y un paso de incorporación a esqueletos carbonados para dar aminoácidos.



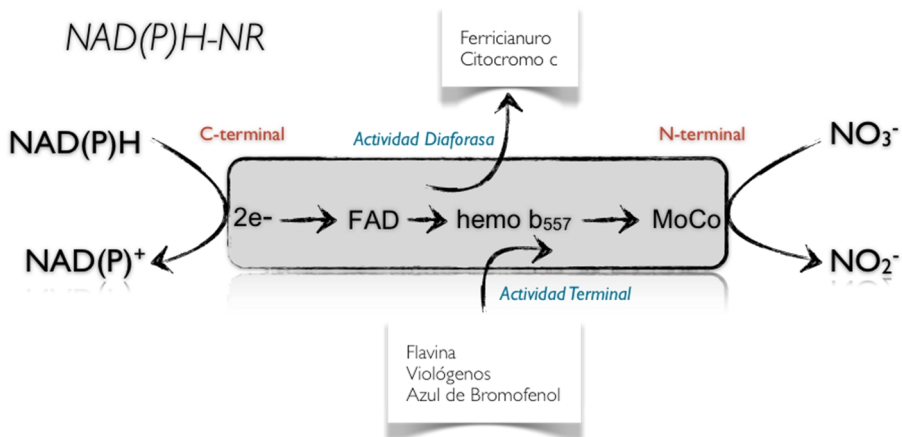
**Figura I.2.** Ruta de asimilación de nitrato a esqueletos carbonados en plantas. Tomado de (Krapp, 2015). En el caso de *Chlamydomonas* NAR1.1 en vez de HPP y NAR2 en lugar de NRT3.1.

El primer paso de reducción es citosólico y lo lleva a cabo la Nitrato Reductasa (NR) produciéndose nitrito. El nitrito producido es transportado al cloroplasto donde tiene lugar otra reducción, hasta amonio, que es catalizada por la nitrito reductasa (NiR). Finalmente, el amonio se integra en esqueletos carbonados mediante el ciclo GS/GOGAT. A continuación se detalla una breve descripción de las enzimas implicadas en estos pasos (Figura I.2).



### I.1.3.1.1 Reducción de nitrato a nitrito por la Nitrato Reductasa

En organismos eucariotas la enzima NR consiste en una enzima homodimérica, es decir, está compuesta por dos polipéptidos de unos 100-120 KDa cada uno. Cada monómero contiene los grupos prostéticos FAD, citocromo  $b_{557}$  (hemo) y cofactor de Mo, localizados en tres dominios funcionales diferentes (Zhou and Kleinhofs, 1996; Moura et al., 2004) (Figura I.3).



**Figura I.3.** Características estructurales y diferentes actividades de la NR de eucariotas. Únicamente se representa una subunidad. En el esquema se representa el flujo de electrones y la reacción que se lleva a cabo.

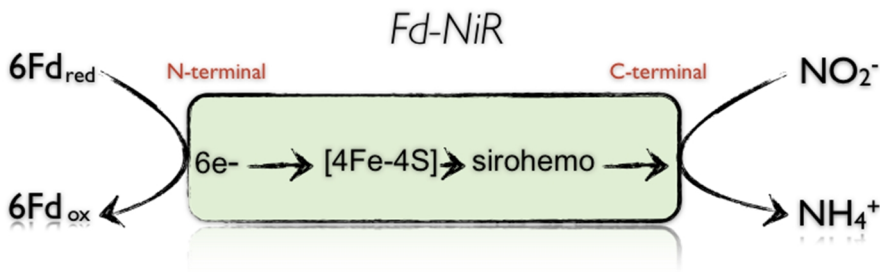
La Nitrato Reductasa posee, además de la actividad fisiológica, otras dos actividades que se pueden ensayar *in vitro* por separado. La primera es la actividad NAD(P)H-deshidrogenasa o diaforasa, que cataliza la transferencia de electrones desde piridín nucleótido hasta aceptores artificiales de electrones como el ferricianuro o citocromo c. Esta actividad no requiere cofactor de Mo. La segunda es conocida como actividad terminal, cataliza la

transferencia de electrones desde donadores artificiales como flavinas, azul de bromofenol o viológenos (reducidos químicamente con ditionito) hasta el  $\text{NO}_3^-$ . En esta actividad no está implicado el FAD.

La mayoría de los organismos tienen un único gen de la NR, *NIA1* (Fu and Marzluf, 1987; Fernández et al., 1989; Johnstone et al., 1990; Siverio, 2002), aunque algunas especies de plantas como *Oryza sativa* o *Arabidopsis thaliana* poseen dos, *NIA1* y *NIA2* (Kleinhofs and Warner, 1990; Campbell, 1999).

### I.1.3.1.2 Reducción de nitrito a amonio por la Nitrito Reductasa (NiR)

El paso de nitrito a amonio se da en el cloroplasto, siendo la enzima encargada de este proceso la NiR. En algas, cianobacterias y plantas la NiR es un monómero de aproximadamente 63 KDa que contiene una agrupación sulfoférrica, tipo [4Fe-4S], y un sirohemo como grupos prostéticos (Figura I.4).



**Figura I.4.** Características estructurales de NiR de eucariotas. Representación esquemática del flujo de electrones y la reacción que cataliza.

En plantas y algas la enzima se localiza en el estroma de los cloroplastos de las células fotosintéticas y en los plastidios de los tejidos no fotosintéticos. Los seis electrones necesarios para reducir el nitrito a amonio los obtiene de una ferredoxina reducida ( $\text{Fd}_{\text{red}}$ ) como consecuencia del transporte electrónico fotosintético (Vega et al., 1980; Wray and Fido, 1990).

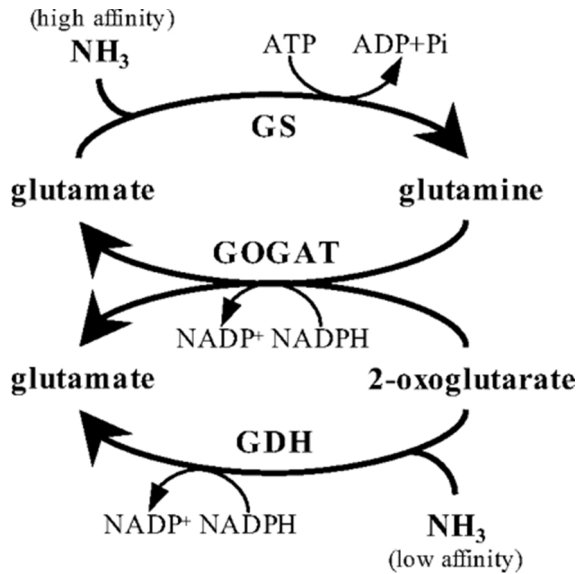
En las raíces de plantas y en *Chlamydomonas* en oscuridad, ciertas isoformas de la enzima Fd-NADP<sup>+</sup> reductasa son las encargadas de generar Fd<sub>red</sub> a partir del NADPH generado en el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (Jin et al., 1998; Monza and Marquez, 2004).

La NiR puede estar codificada por dos genes, como ocurre en muchas plantas, donde cada uno de estos genes es responsable de las isoformas de raíces y hojas, o por un gen, como es el caso de *Chlamydomonas* (Monza and Marquez, 2004; Fernández et al., 2009).

### **I.1.3.1.3 Asimilación de amonio por el ciclo GS/GOGAT**

Una vez se obtiene el amonio intracelular, independientemente de que sea producido por el propio metabolismo celular o por el transporte directo desde el exterior, su incorporación a esqueletos carbonados tiene lugar a través del ciclo GS/GOGAT. Este ciclo consta de dos enzimas que funcionan en tándem, la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT).

La GS cataliza la incorporación de amonio a una molécula de glutamato para dar glutamina. Esta glutamina puede ser usada por la GOGAT en la transferencia reductiva de un grupo amino al 2-oxoglutarato, dando lugar a dos moléculas de glutamato. Una de estas moléculas es utilizada para reiniciar el ciclo mientras que la otra se emplea en la síntesis de otros aminoácidos y compuestos nitrogenados (Hirel et al., 1984; Monza and Marquez, 2004). En plantas y en *Chlamydomonas* existen dos isoformas que difieren en su localización intracelular, la GS1 citosólica, y la GS2 plastídica (Lam et al., 1996; Monza and Marquez, 2004). Además, también existen dos proteínas monoméricas con actividad GOGAT localizadas en el cloroplasto (NAD(P)H-GOGAT y Fd-GOGAT).



**Figura I.5.** Esquema del ciclo GS/NADPH-GOGAT y GDH.

Estas enzimas podrían funcionar de modo compensatorio, produciendo glutamato, en diferentes condiciones de crecimiento (autotróficas o heterotróficas) donde los donadores de electrones varían. Así, Fd-GOGAT es más abundante en la luz en cultivos sincronizados y en amonio (Cullimore and Sims, 1981; Márquez et al., 1986; Martínez-Rivas et al., 1991).

Por otra parte, aunque el ciclo GS-GOGAT es la vía de asimilación de amonio más importante, existen otras enzimas como la glutamato deshidrogenasa (Lam et al.) o la asparragina sintetasa (AS) que pueden asimilar amonio en condiciones muy concretas, como puede ser una fotorrespiración intensa (Lam et al., 1996) (Figura I.5).

## **I.1.4 Regulación de la asimilación de nitrógeno inorgánico**

### **I.1.4.1 Moléculas señalizadoras del estado nitrogenado**

En el proceso de asimilación de nitrato, es el propio nitrato el que actúa como activador de la ruta mientras que el amonio lo hace como represor.

En algunos organismos se cree que el nitrato puede funcionar como molécula señal, ejerciendo su función activadora directamente, señal positiva (Crawford, 1995; Stewart and Bledsoe, 2003). Aunque hay mutantes que son incapaces de reducir nitrato causan la sobreexpresión de los transcritos de *NIA1*, *NIII* y *NRT2s* sin necesidad aparente de la presencia de nitrato (Pouteau et al., 1989; LaBrie et al., 1992; Kronenberger et al., 1993; Fernández et al., 1998). Además, se ha demostrado que concentraciones residuales de nitrato son capaces de conducir a la activación de la expresión de los genes implicados en su asimilación (Llamas et al., 2002; Rexach et al., 2002; Navarro et al., 2003). En base a ésta línea de estudio, en los últimos años se han descrito factores de transcripción que median esta respuesta debida al nitrato. Ejemplos de este caso lo encontramos en NIT2 en *Chlamydomonas* (Camargo et al., 2007) o en NLP7 en *Arabidopsis* (Castaings et al., 2009).

En el caso de la señal negativa, se ha descrito en procariotas que la glutamina y el 2-oxoglutarato son los encargados de mediar esta represión. De la misma forma, en hongos y levaduras se piensa que la concentración de glutamina intracelular juega el papel de señal represora, aunque parecen existir otras vías independientes (Marzluf, 1997; ter Schure et al., 2000; Siverio, 2002). En cuanto a las plantas, se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares de esta regulación negativa por amonio, pero el uso de inhibidores de la asimilación de amonio parece indicar que ciertos aminoácidos como glutamina, glutamato o asparragina tienen un papel importante, funcionando como efectores en esta represión (Crawford and Forde, 2002; Glass, 2003; Sonoda et al., 2003). La proteína PII, presente en los cloroplastos de plantas y algas (Chellamuthu et al., 2014), parece ser la encargada de integrar los metabolismos de carbono y nitrógeno, además de controlar el estado de energía celular mediante la regulación de factores de transcripción, así como la actividad de transportadores y enzimas metabólicas (Uhrig et al., 2009). Como ocurre en otros organismos fotosintéticos, en

*Chlamydomonas*, la proteína PII es la encargada de unir glutamina y activar a la NAGK (N-acetil glutamato kinasa) que es una enzima clave en la biosíntesis de arginina (Ermilova and Forchhammer, 2013; Chellamuthu et al., 2014).

En *Chlamydomonas* el amonio no sólo tiene un efecto represor a nivel transcripcional y postranscripcional, sino que también tiene efecto inhibidor a nivel postraduccional. Esto es así para el transporte de nitrato/nitrito (Galván et al., 1991), la actividad NR (Fernández et al., 1998), y el transporte de amonio (Franco et al., 1988).

Por otro lado, se sabe que el nitrito no funciona como activador, llegando en algunos casos a observarse que actúa como represor. Este es el caso de AtNRT1.1 y CrNIA1 (Navarro et al., 2000; Loqué et al., 2003).

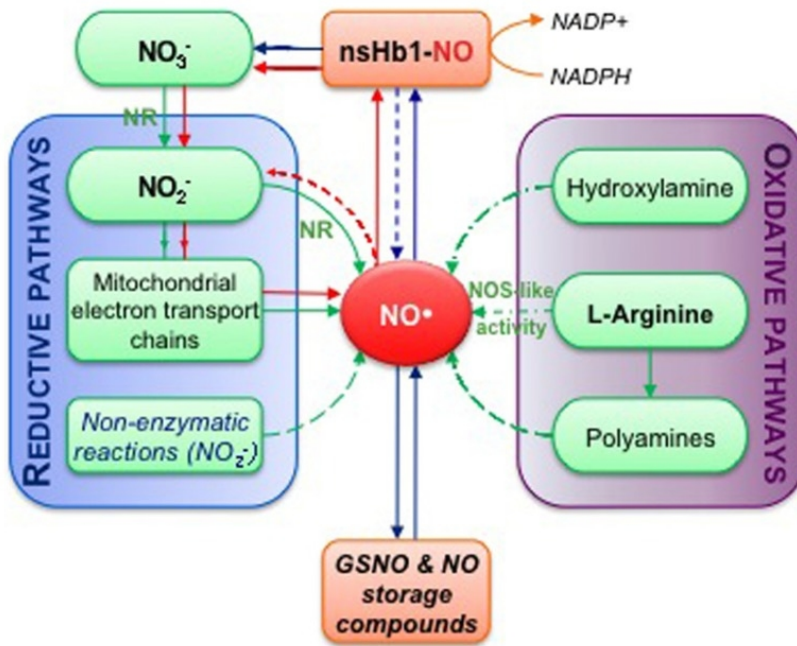
#### **I.1.4.2 El Óxido Nítrico (NO)**

El NO es considerado una molécula señal imprescindible en multitud de procesos que tienen lugar en todos los organismos vivos. Su importancia fue descubierta, en primer lugar, en animales, donde se averiguó que participaba, entre otros procesos, en el mantenimiento del tono vascular, la señalización celular y la respuesta inmune. El interés por esta molécula se ha disparado en las últimas dos décadas llegando a extenderse su estudio a organismos fotosintéticos debido a su implicación en un amplio abanico de procesos biológicos. Entre estos procesos podemos indicar la germinación, crecimiento y desarrollo de la planta (Beligni and Lamattina, 2000; Salmi et al., 2013), la floración (He et al., 2004; Zhou and Zhang, 2014), la maduración de los frutos (Villarreal et al., 2009), el cierre de estomas inducido por ABA (Simontacchi et al., 2013; Agurla et al., 2014), el desarrollo de la polaridad celular (Salmi et al., 2007) y la regulación de la elongación de las raíces (Gouvea et al., 1997; Fernández-Marcos et al., 2011) entre otros. Además, se considera que el NO tiene un papel fundamental en las respuestas a estrés tanto bióticos como

abióticos (Delledonne et al., 1998; Neill et al., 2008; Asai and Yoshioka, 2009).

En cuanto a la síntesis de NO en animales, ésta puede darse por dos vías: oxidativa o reductiva. La vía oxidativa está mediada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que es capaz de producir NO y citrulina a partir de arginina. En plantas, aunque parece existir esta actividad en extractos crudos y además, se ha visto que los inhibidores de NOS afectan a los niveles de NO, no se ha identificado molecularmente ninguna proteína que presente homología o no con las NOS de animales y que produzca NO a partir de arginina (Corpas et al., 2006; Corpas et al., 2009; de Montaigu et al., 2010). En cuanto al alga verde *Ostreococcus tauri* se ha descrito la primera, y hasta ahora única, NOS en un organismo fotosintético, la cual tiene una conservación de un 45% respecto a la NOS de humanos (Foresi et al., 2010). Este tipo de enzimas, que poseen todos los dominios propios de las de animales, no se encuentran en las búsquedas realizadas en los genomas secuenciados de plantas como por ejemplo *Arabidopsis* u otras algas verdes como *Chlamydomonas*, por lo que parece ser, en principio, un rasgo específico del género *Ostreococcus* más que algo extensible a organismos fotosintéticos. Por otra parte, si se tienen indicios fisiológicos de la existencia de la NOS en plantas (Corpas et al., 2006; Corpas et al., 2009).

En cuanto a la vía reductiva, la NR es considerada una de las fuentes de NO ampliamente descritas en plantas. Se ha demostrado, mediante experimentos *in vitro*, que esta enzima es capaz de reducir el nitrito hasta NO (Dean and Harper, 1988; Yamasaki and Sakihama, 2000; Rockel et al., 2002). La eficiencia de esta reacción es de aproximadamente el 1% de su actividad, aunque se ve incrementada cuando la concentración de oxígeno es baja y los niveles de nitrito altos (Rockel et al., 2002; Moreau et al., 2010).



**Figura I.6.** Representación esquemática de las principales fuentes de producción de NO. La asimilación de nitrato ( $N_3^-$ ) produce nitrito ( $N_2^-$ ) en una reacción catalizada por la NR. La posterior reducción de nitrito a NO se puede producir enzimáticamente, ya sea a través de la actividad NR o mediante las cadenas de transporte de electrones mitocondriales, y a través de reacciones no enzimáticas (vías reductoras). Alternativamente, la síntesis de NO puede ser el resultado de las reacciones oxidativas de hidroxilamina, poliaminas o L-arginina (L-Arg; vías oxidativas). La síntesis de NO a partir de L-Arg podría ser responsable de la actividad de óxido nítrico-sintasa como (NOS-like) detectada en las plantas. La cantidad de NO se ve influenciada por la hemoglobina 1 (nsHb1) actividad dioxigenasa no simbiótica, que convierte NO en  $N_3^-$ . Las flechas rojas destacan el llamado ciclo de nitrato-NO que puede tener lugar en condiciones de hipoxia, mientras que las flechas verdes indican las reacciones de biosíntesis, así como las flechas azules muestran las reacciones implicadas en la homeostasis del NO (Tomado de Arc et al., 2013).

De una manera secundaria y a un nivel más bajo, otras fuentes de producción reductiva de óxido nítrico son el resto de molibdoenzimas (Li et al., 2009; Cantu-Medellin and Kelley, 2013; Wang et al., 2014; Maia and Moura, 2015).



De entre todas las molibdoenzimas conocidas, la que despierta más interés es la ARC, ya que solo contiene el cofactor de Mo además de haberse observado que es capaz también de producir óxido nítrico, a partir de nitrito, en humanos (Sparacino-Watkins et al., 2014).

En la Figura I.6 se muestran las fuentes de NO mencionadas en ésta memoria y otras descritas en diferentes organismos.

### **I.1.4.3 Regulación por Óxido Nítrico**

Ciertos estudios muestran que el NO podría intervenir en el proceso de señalización de una de las siguientes maneras; activando guanilato ciclasas solubles y/o especies reactivas del oxígeno o produciendo la movilización de segundos mensajeros tales como el calcio y GMPc (de Montaigu et al., 2010; Martínez-Ruiz et al., 2011).

Las guanilato ciclasas solubles son enzimas que catalizan la formación de GMPc desde GTP. Estas proteínas poseen un grupo hemo, unido covalentemente a un residuo de histidina muy conservado, donde se une el NO. La unión del NO activa la proteína y produce un incremento de la actividad de varios cientos de veces. Aunque estas enzimas están muy estudiadas en animales, no se han descrito en plantas. Es decir, las búsquedas en los genomas de plantas superiores no han dado resultados positivos para este tipo de proteínas. Únicamente algunas algas verdes, como *Chlamydomonas*, parecen tener GC solubles bien conservadas (Merchant et al., 2007; de Montaigu et al., 2010).

El NO puede producir fundamentalmente dos tipos de modificación, mediante especies reactivas del oxígeno, la S-nitrosilación de residuos de cisteína, que es predominante, o la nitración de residuos de tirosina. Cada vez son más numerosos los ejemplos de proteínas y procesos controlados por

estos tipos de modificaciones existentes en la bibliografía. De hecho, se han descrito más de 100 proteínas en *Arabidopsis* que pueden ser diana de nitrosilación (Lindermayr et al., 2005). Entre las proteínas dianas que se pueden activar por S-nitrosilación se encuentran algunas quinasas, como se ha descrito en animales (Rabkin et al., 2007; Zhang et al., 2010; Takata et al., 2011), responsables de desencadenar una respuesta específica tras la modificación postraducciona.

Otra modificación mediada por el NO es la nitración, donde el NO reacciona con el superóxido ( $O_2^-$ ) para generar peroxinitrito (Jasid et al.), que interactúa con residuos de tirosina, y aunque menos abundante, se ha relacionado con estrés tanto biótico como abiótico (Corpas et al., 2008). Esta modificación es considerada irreversible en plantas, no ocurre lo mismo en el caso de mamíferos donde se ha visto una nitración de tirosina reversible para la glutamina sintetasa (GS) (Görg et al., 2007).

La regulación postraducciona llevada a cabo por NO ha sido estudiada en otras NRs de plantas. Por ejemplo, en hojas de trigo se ha observado que la enzima es inhibida por el NO (Rosales et al., 2011), en *Chlamydomonas* la actividad NR también se ve inhibida por NO así como los transportadores (Sanz-Luque et al., 2013), mientras que en el caso de la col la NR se activa (Du et al., 2008). En raíces de tomate, la inhibición o activación de la actividad NR por NO depende de las concentraciones de nitrato (Jin et al., 2009). Es destacable el hecho de que en *Chlamydomonas* existe una hemoglobina truncada (THB1), capaz de unirse a la NR y de participar en la retirada de óxido nítrico. Este proceso de transformación de óxido nítrico a nitrato, da lugar a una disminución de la actividad de producción de nitrito de la NR provocando la actuación del óxido nítrico como señal para evitar la acumulación de nitrito, que tan tóxico resulta ser para la célula. Esta disminución de actividad se debe a que la THB1 es capaz de quitar electrones a la NR en su unión para la eliminación de óxido nítrico (Sanz-Luque et al.,

2015). Estas hemoglobinas truncadas se encuentran en todos los organismos fotosintéticos (Wittenberg et al., 2002).

Por último, cabe señalar que el NO también provoca la nitración de una tirosina de GS en nódulos de *Medicago truncatula* dando lugar a la inactivación de la enzima (Melo et al., 2011), por lo que según el organismo, la actividad GS puede estar regulada por NO o por la proteína 14-3-3.

#### **I.1.4.4 Regulación por fosforilación**

Junto con la nitrosilación, la fosforilación es otro mecanismo rápido y reversible para controlar la actividad de ciertas proteínas. De hecho, en *Arabidopsis*, el nitrato y el amonio dan lugar a diferentes patrones de fosforilación (Engelsberger and Schulze, 2012), mientras que el transportador de amonio de alta afinidad AtAMT1.1 es inhibido por fosforilación después de un reabastecimiento de amonio o nitrato en el medio (Lanquar et al., 2009). En *Hansenula polymorpha*, el transportador de nitrato de alta afinidad YNT1, perteneciente a la familia NRT2, se fosforila en condiciones de deficiencia de nitrógeno, estabilizándolo en la membrana plasmática (Navarro et al., 2008). Por su parte, la ubiquitinación también parece estar implicada en la degradación de NRT2.1 en *Hansenula*, lo que podría ser éste el paso alternativo a la fosforilación de la proteína. Además, la enzima NR de plantas se inhibe por la fosforilación de un residuo de serina y posterior unión a proteínas 14-3-3, interfiriendo de este modo en la transferencia de electrones al sustrato (MacKintosh and Meek, 2001; Lambeck et al., 2012). En el caso de la NR de *Chlamydomonas*, ésta no se modifica por fosforilación y unión a proteínas 14-3-3 (Pozuelo et al., 2001), pero sí parece estar regulada por mecanismos redox (Franco et al., 1987). Sin embargo, la GS de plantas y *Chlamydomonas* se fosforila y se une a las proteínas 14-3-3 (Finnemann and Schjoerring, 2000; Pozuelo et al., 2001; Lima et al., 2006). Por último, es destacable el hecho de que la nitrito reductasa (NiR) no parece tener ninguna regulación postraducciona.

#### **I.1.4.5 Factores de transcripción implicados en la regulación de la asimilación de nitrógeno**

En los organismos fotosintéticos tanto los cambios ambientales como las fuentes de nitrógeno disponibles han elaborado una regulación basada en cascadas de señales hasta los factores de transcripción, dando éstos lugar a los cambios necesarios en la expresión génica para adaptar el metabolismo celular.

En hongos y levaduras estos factores son de la familia GATA. Por eso, en condiciones de deficiencia de nitrógeno se requiere la interacción de dos de estos factores para la transcripción de genes de la asimilación de nitrógeno. De hecho, cuando existe exceso de nutrientes entran en juego otras proteínas, como URE2 en el caso de *Saccharomyces* o KapK en *Aspergillus*, que interaccionan con los factores de transcripción, secuestrándolos en el citoplasma (Bernreiter et al., 2007; Georis et al., 2009). Este tipo de regulación está mediada en algunos organismos, como *Saccharomyces*, por fosforilación/desfosforilación de los factores de transcripción (Cooper, 2002).

En plantas se han descrito muchos reguladores de la expresión génica implicados en la regulación de la asimilación de nitrógeno. Asimismo, se han identificado factores de transcripción de diferentes familias, entre ellos los perteneciente a la familia GATA descrita en hongos y levaduras, implicados en diversas funciones como el control del crecimiento de las raíces laterales en función del estado nitrogenado (ANR1) (Zhang and Forde, 1998), la integración del metabolismo N/C (GNC y DOF) (Zhang et al., 2005; Gutiérrez et al., 2008), la integración del metabolismo del N con la luz (Lillo) (Lillo, 2008) o la coordinación del metabolismo del nitrógeno con los ritmos circadianos (Gutiérrez et al., 2008). Además de éstos, recientemente se ha identificado en *Arabidopsis* un factor de transcripción (Castaings et al., 2009) que es homólogo a NIT2 de *Chlamydomonas*, y que parece estar directamente

relacionado con la asimilación y la señalización de nitrato (Castaings et al., 2009).

En *Chlamydomonas*, se ha identificado un factor de transcripción esencial para la asimilación de nitrato, NIT2 (Camargo et al., 2007; Fernandez and Galvan, 2008). Éste controla la expresión de buena parte de los genes implicados en la asimilación de nitrógeno inorgánico (*NRT2.1*, *NRT2.2*, *NRT2.3*, *NAR2*, *NIA1*, *NIII*, *NAR1.1*, *NAR1.6* y *AMT1.1*). NIT2, que está regulado negativamente por amonio, se une a la región promotora de *NIA1* regulando su expresión (Loppes and Radoux, 2002; Camargo et al., 2007). NIT2 es el único regulador esencial para la asimilación de nitrato que se ha identificado en el escrutinio de la colección de mutantes insercionales de *Chlamydomonas* (González-Ballester et al., 2005b).

Se considera que los mutantes afectados en NIT2 son incapaces de crecer en nitrato o nitrito (Camargo et al., 2007; Fernandez and Galvan, 2008). Este factor de transcripción, que presenta en su extremo N-terminal un dominio GAF (“GMPc-specific and stimulated phosphodiesterases, *Anabaena* Adenylate cyclases and *Escherichia coli* *FhlA*”), podría unir moléculas reguladoras tales como oxoglutarato, óxido nítrico ó GMPc (Little and Dixon, 2003; Rybalkin et al., 2003; Büsch et al., 2005). También, seguido al dominio GAF, se encuentra una secuencia de exportación nuclear (Bernreiter et al.), un dominio de cremallera de leucina, regiones ricas en Gln y Ala y, al igual que NLP7, presenta un dominio RWP-RK típico de algunas proteínas reguladoras de procesos relacionados con el nitrógeno.





## **I.2 Molibdeno**

### **I.2.1. El Molibdeno, importancia, distribución y disponibilidad**

El molibdeno (Mo) es un metal esencial para la mayoría de los seres vivos. En el agua del mar se encuentra en una concentración promedio de 100 nM. En la litosfera su concentración media es de 2,5 mg/kg, aunque puede aumentar hasta unos 300 mg/kg en rocas que tienen además una alta cantidad de materia orgánica (Fortescue, 1992; Reddy et al., 1997). Las formas de Mo que se pueden encontrar en las rocas incluyen molibdenita ( $\text{MoS}_2$ ), wulfenita ( $\text{PbMoO}_4$ ) y ferrimolibdenita [ $\text{Fe}_2(\text{MoO}_4)_3$ ] (Reddy et al., 1997), mientras que la forma en que los seres vivos pueden adquirir Mo es como anión molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ).

En el suelo, el molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) es la forma soluble de Mo predominante a pH superiores a 4,2; seguido en orden decreciente de  $\text{HMoO}_4^- > \text{H}_2\text{MoO}_4 > \text{MoO}_2(\text{OH})^+ > \text{MoO}_2$  (Lindsay, 1979); de esta manera, a medida que el pH aumenta lo hace también la disponibilidad de molibdato, de forma que, a partir de pH 3,0 el aumento de una unidad de pH significa un aumento de aproximadamente 100 veces de la solubilidad del molibdato.

El anión molibdato puede formar complejos iónicos en solución con diferentes iones inorgánicos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y también con la materia orgánica, concretamente con los ácidos húmicos y fúlvicos (Jenne, 1976). La formación de estos complejos aumenta la disponibilidad de molibdato ya que disminuye su unión a óxidos metálicos cargados positivamente de Fe, Al, y Mn.

La necesidad de Mo para el crecimiento de plantas fue descrita por primera vez en plantas de tomate en cultivo hidropónico (Arnon and Stout, 1939). En estos estudios se observó que las plantas sin Mo en solución, mostraban manchas amarillentas y una morfología anormal en las hojas, a este



fenotipo se le denominó comúnmente como “whiptail”. También se observó que el crecimiento deficiente de plantas de tomate cultivadas en suelos pobres en Mo podía evitarse mediante la adición directa de molibdato sódico en el suelo, mediante su aplicación por contacto directo o por su infiltración en las hojas (Walker, 1948).

Por otra parte, los fenómenos conocidos de toxicidad por molibdato en plantas son raros. Las plantas de tomate que crecen en presencia de altas concentraciones de Mo presentan color violáceo en las hojas por acumulación de antocianinas, y en hojas de leguminosas se observa color amarillento (Bergmann, 1992; Gupta, 1997). El mayor problema, asociado con la acumulación de Mo en plantas, está en el grano usado para la alimentación de ganado, ya que los animales que consumen este grano pueden sufrir molibdenosis; un problema que induce a su vez la deficiencia de cobre (Frank, 2004).

### **1.2.2. El cofactor de Mo**

El átomo de Mo es biológicamente inactivo por sí mismo y para realizar su función biológica necesita formar parte de más de 50 molibdoenzimas en forma de cofactor.

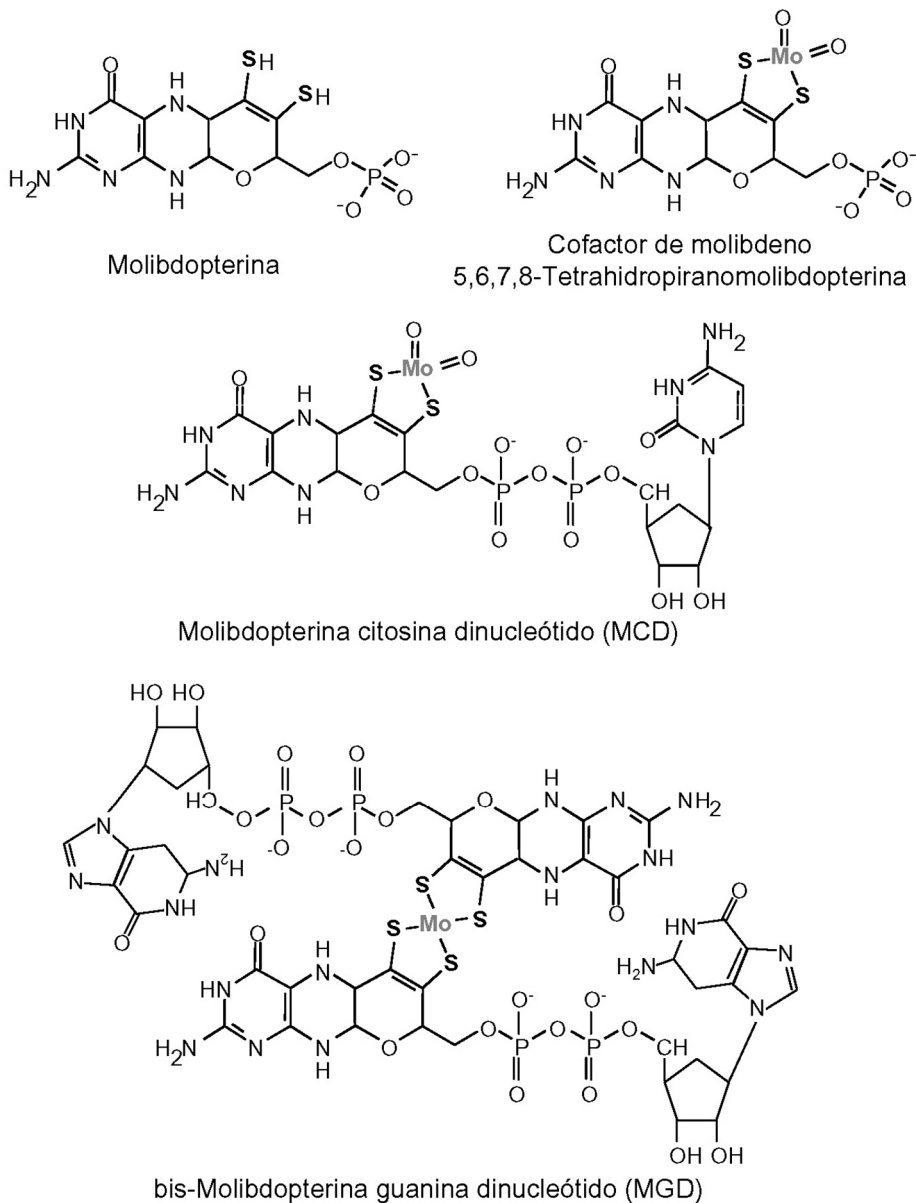
En 1953 se describió por primera vez la presencia de Mo como cofactor fuertemente unido a la enzima xantina oxidasa de hígado de rata (Richert and Westerfeld, 1953). De hecho, se identificó este mismo cofactor en la NR gracias a mutantes deficientes en NR de *Aspergillus nidulans* (Pateman et al., 1964), *Neurospora crassa* (Nason et al., 1970) y *Nicotiana tabacum* (Mendel and Muller, 1976), donde se describió un nuevo fenotipo caracterizado por la pérdida simultánea de las actividades de las enzimas NR y xantina deshidrogenasa. En estos organismos, se concluyó que estas enzimas solo podían tener un cofactor común relacionado con el Mo, por lo que se le llamó cofactor de Mo. Posteriormente se demostró que el componente orgánico del

cofactor de Mo, procedente de diferentes molibdoenzimas, es una única pterina a la que se denominó como molibdopterina (MPT) (Johnson et al., 1980a) (Figura I.7).

El cofactor de Mo es un complejo del Mo con un éster 4'-fosfato de una 6-alkilpterina; ésta pterina presenta una cadena lateral tetracarbonada que contiene un grupo enoditiol en C-1' y C-2', un alcohol secundario en C-3' y un alcohol fosforilado en C-4'. El Mo se encuentra formando un complejo con los azufres de los grupos tioles y tiene, de forma general, dos especies oxo-terminales. En la estructura básica es posible encontrar algunas diferencias en el heterociclo de pterina, en la cadena lateral y en el entorno del propio Mo; estas diferencias vienen determinadas por la variedad de molibdoenzimas a las que se une (Rajagopalan and Johnson, 1992; Schindelin et al., 1996). En procariontes la estructura del cofactor de Mo tiene un nucleótido monofosfato adicional unido al carbono C-4' de la cadena lateral del anillo de pterina (Figura I.7).

Se ha demostrado que el cofactor de Mo tiene una estructura tricíclica (Boyington et al., 1997). Este tercer ciclo se forma mediante la unión del átomo de oxígeno de la cadena lateral con el biciclo de pterina, formándose un anillo de pirano (Figura I.7). Esta estructura tricíclica permanece durante y después de la unión del cofactor de Mo con las apo-enzimas.

La función del cofactor es posicionar al átomo de Mo correctamente en el sitio activo de las molibdoenzimas, y participar con su sistema de anillos de pterina en la transferencia de electrones desde o hacia el átomo de Mo. Los diferentes estados de oxidación y conformaciones estructurales posibles de la pterina podrían también ser importantes en la canalización de los electrones hacia otros grupos prostéticos (Kisker et al., 1997).



**Figura I.7.** Estructura química de la molibdopterina y de las conformaciones de cofactor de Mo.

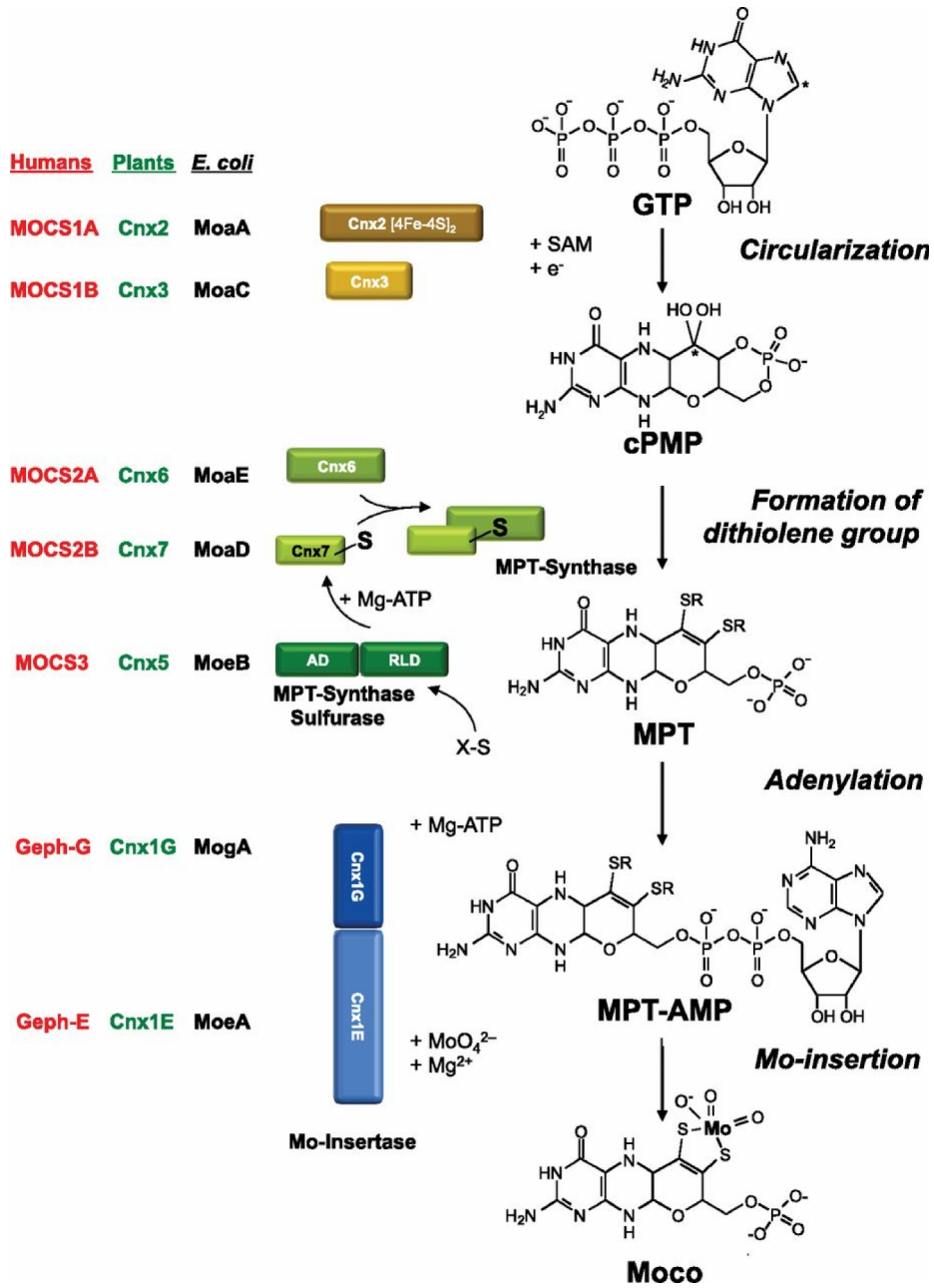
Análisis cristalográficos de diferentes molibdoenzimas han revelado que el cofactor no está localizado en la superficie de la proteína, sino que se encuentra situado en el interior de la enzima con una estructura tipo túnel que

lo hace accesible a los sustratos correspondientes (Kisker et al., 1998; Schrader et al., 2003; Fischer et al., 2005).

De forma que, una vez que el cofactor de Mo es liberado de la holoenzima pierde el Mo y se degrada rápidamente de forma irreversible debido a su oxidación, perdiendo su función. Las apo-molibdoenzimas son inactivas catalíticamente (Kisker et al., 1997). Además, se ha demostrado que el wolframio puede actuar como un antagonista del Mo, supliendo a éste como ligando de la molibdopterina formando el cofactor de wolframio (Wco). De hecho, el Wco es biológicamente inactivo para la mayoría de las molibdoenzimas, que cuando unen éste cofactor carecen de actividad (Wray and Filner, 1970; Kisker et al., 1997). La única excepción conocida hasta ahora ha sido descrita en arqueobacterias, donde el wolframio parece ser el ligando fisiológico de la molibdopterina (Kletzin and Adams, 1996).

### **1.2.2.1 Biosíntesis del cofactor de molibdeno**

En todos los organismos estudiados hasta ahora, la biosíntesis del cofactor de molibdeno es una ruta conservada (Mendel and Leimkuhler, 2015) que se puede dividir en cuatro pasos de acuerdo con los intermediarios biosintéticos formados; piranopterina monofosfato cíclica (cPMP), molibdopterina, molibdopterina adenilada y cofactor de molibdeno (Figura I.8). En eucariotas se han descrito 6 genes involucrados en la ruta de biosíntesis de cofactor de molibdeno, tanto en plantas (Mendel and Hänsch, 2002), como en hongos (Unkles et al., 1997; Appleyard et al., 1998; Millar et al., 2001) y humanos (Reiss et al., 1998; Stallmeyer et al., 1999a; Stallmeyer et al., 1999b).



**Figura I.8.** Esquema de la ruta de biosíntesis del cofactor de molibdeno en eucariotas. Las proteínas que participan en cada paso están representadas de forma esquemática. Adaptado de (Mendel, 2013).

Tanto los genes como sus productos en plantas se nombraron según la nomenclatura *cnx* (cofactor de la nitrato reductasa y xantina deshidrogenasa), que fue usada originalmente para nombrar mutantes de hongos añadiendo una letra (*cnxA-F*) así como añadiendo a los genes un número (*cnx1-3*, *cnx5-7*). En humanos, Reiss y colaboradores (Reiss et al., 1998), introdujeron la nomenclatura MOCS (MOlybdenum Cofactor Synthesis).

#### **I.2.2.1.1. Paso 1, conversión de GTP en cPMP**

En *E. coli* ha sido descrita una secuencia de reacciones complejas que comienzan con GTP y generan el primer intermediario estable en la ruta de biosíntesis del cofactor de molibdeno, la piranopterina monofosfato cíclica (Wuebbens et al., 2000).

En *A. thaliana*, la síntesis de cPMP está catalizada por las proteínas codificadas por los genes *Cnx2* y *Cnx3* (Figura I.8); estos genes, que fueron identificados mediante complementación de mutantes de *E. coli*, demostraron la conservación de esta ruta en bacterias y plantas (Hoff et al., 1995). Por su parte, la proteína CNX2 pertenece a la familia de enzimas dependientes de S-adenosil metionina (SAM), la estructura y función tanto de CNX2 como de sus homólogos en bacterias (MoaA) y humanos (MOCS1A) son bien conocidas; sin embargo se sabe poco sobre la función de CNX3 y sus homólogos.

Además, el precursor Z es el cPMP, producto de la reacción catalizada por CNX2 y CNX3. La estructura química fue resuelta mediante espectroscopía de masas y RMN (Santamaria-Araujo et al., 2004), nombrándose según la IUPAC 1',1'-dihidroxi 2',4' piranopterina cíclica, aunque por simplificación suele nombrarse como cPMP.

#### **I.2.2.1.2. Paso 2, síntesis de molibdopterina**

La formación de molibdopterina tiene lugar mediante la incorporación

de dos átomos de azufre al cPMP en una reacción catalizada por la enzima MPT sintasa. Esta enzima es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades pequeñas, codificadas en plantas por *Cnx6*, y dos subunidades grandes, codificadas por *Cnx7* (Figura I.8).

Después de que la MPT sintasa transfiere los dos azufres al cPMP, ésta tiene que ser re-sulfurada por la enzima MPT-sintasa sulfurilasa para que pueda llevar a cabo un nuevo ciclo de conversión de cPMP. La re-sulfuración está catalizada por CNX5 y consiste en una adenilación de la MPT sintasa seguida de la transferencia de azufre (Matthies et al., 2004; Matthies et al., 2005). La MPT-sintasa sulfurilasa tiene un dominio N-terminal responsable de la adenilación y un dominio C-terminal donde se une el azufre a una cisteína conservada. La identidad del donador de azufre a la MPT-sintasa sulfurilasa es desconocida hasta la fecha, aunque se han propuesto algunos candidatos (Leimkühler et al., 2001). También se ha visto que *Cnx5* es capaz de añadir grupos azufre a los ARN transferentes en levaduras (Nakai et al., 2012).

### **I.2.2.1.3. Paso 3, adenilación de la molibdopterina**

La identificación de una acumulación de molibdopterina en mutantes reparables por molibdato (Joshi et al., 1996) permitió demostrar la unión de molibdopterina a CNX1G. A continuación, la resolución de la estructura cristalina de CNX1G confirmó su papel en la unión de molibdopterina y condujo a la identificación de un compuesto consistente en una adenosina covalentemente unida al carbono C-4' del MPT mediante un enlace pirofosfato, este era un nuevo intermediario en la biosíntesis de cofactor de molibdeno (Kuper et al., 2004). Posteriormente se consiguió la síntesis *in vitro* de MPT-AMP usando CNX1G, dicha reacción fue caracterizada como dependiente de ATP y  $Mg^{2+}$  (Llamas et al., 2004).

La resolución de la estructura cristalina de CNX1 permitió también la identificación de un átomo de cobre unido al MPT. El papel del cobre no se

conoce aunque se ha propuesto que podría participar en la transferencia de azufre al cPMP para proteger al MPT de la oxidación.

#### **I.2.2.1.4. Paso 4, la inserción de molibdeno**

En el paso final de la biosíntesis de cofactor de molibdeno el intermedio MPT-AMP es convertido a cofactor de molibdeno biológicamente activo en una reacción donde interviene la proteína CNX1E. El MPT-AMP se transfiere desde CNX1G a CNX1E que elimina el adenilato y sustituye el átomo de cobre por molibdeno. La reacción de hidrólisis de adenilato es dependiente de molibdato (Llamas et al., 2006). Además, en *Arabidopsis* se ha visto la interacción de la proteína CNX1 con el citoesqueleto de la célula (Schwarz et al., 2000). Por otra parte, se ha visto recientemente en *Chlamydomonas*, cómo la proteína CNX1E forma dímeros para llevar a cabo su acción. Esto se pudo comprobar gracias a los mutantes 102 y 104, que son mutantes puntuales de *cnx1E*, encontrándose afectados en diferentes aminoácidos. Esto produjo que esta estirpe 104 tuviera capacidad del 50% de síntesis de cofactor de molibdeno (Chamizo-Ampudia et al., 2013).

Además se vio como esta proteína CNX1E de *Chlamydomonas reinhardtii* se encontraba muy conservada entre organismos, ya que complementaba a un mutante *moeA* de *E.coli* (Llamas et al., 2007) (Figura I.8).

#### **I.2.2.1.5. Inserción del cofactor de Mo en las molibdoenzimas**

No se conoce exactament el mecanismo de inserción del cofactor de Mo en las molibdoenzimas. Si bien la MCP de *Chlamydomonas* tiene un claro papel en la transferencia de cofactor de Mo, se desconoce si la inserción de éste en las correspondientes molibdoenzimas requiere, o no, la participación de proteínas del tipo chaperona. De hecho, para algunas Mo-enzimas bacterianas se conocen sistemas de chaperonas específicos para la correcta inserción del cofactor de Mo y posterior plegado de la proteína, como son los



casos de NarJ para la NR de *E. coli* (Blasco et al., 1998) y XDHC para la xantina deshidrogenasa de *Rhodobacter capsulatus* y *Comamonas acidovorans* (Ivanov et al., 2003).

### **I.2.2.2. Molibdoenzimas**

Se denominan molibdoenzimas a aquellas enzimas que contienen cofactor de Mo como grupo prostético para llevar a cabo su función. En los seres vivos existen más de 50 molibdoenzimas que participan en procesos redox claves en el metabolismo del carbono, azufre y nitrógeno; como son la síntesis de fitohormonas, la destoxificación de sulfito o la asimilación de nitrato.

La mayoría de estas enzimas se encuentran en bacterias, entre las que cabe destacar la NR asimiladora y respiradora, la dimetil-sulfóxido reductasa, la formiato deshidrogenasa y la trimetilamina-N-óxido reductasa. Sin embargo, sólo un pequeño número de estas enzimas está presente en eucariotas pudiendo ser subdivididas en dos familias diferentes: la familia de la Xantina Oxidasa (XO) entre las que están la Xantina DesHidrogenasa (XDH), Aldehído oxidasa (AO), piridoxal oxidasa y nicotinato hidroxilasa; y la familia de la Sulfito Oxidasa (SO) formada por la propia SO, la NR y la Amidoxime Reductase Complex (ARC) (Mendel and Kruse, 2012). Estas familias se diferencian en la interacción que se da entre el cofactor de Mo con la proteína (Figura I.11). En la familia de la SO, el cofactor de Mo interacciona mediante el átomo de Mo a un grupo sulfhidrilo (-SH) de una cisteína de la proteína, mientras que en la familia de la XO, esta interacción se produce con otros aminoácidos sin necesidad del grupo sulfhidrilo, ya que el átomo de Mo ya tiene un grupo tio (=S). Éste grupo tio debe ser introducido previamente a la inserción del cofactor Mo a la proteína (Schwarz et al., 2009). La enzima responsable de añadir el grupo azufre al átomo de Mo es la enzima ABA3 (Figura I.12) (Heidenreich et al., 2005).

Las enzimas piridoxal oxidasa y nicotinato hidroxilasa se han encontrado sólo en *Drosophila melanogaster* y *Aspergillus nidulans*, respectivamente (Lewis et al., 1978; Warner and Finnerty, 1981). La NR, que es esencial para la asimilación de nitrato, sólo está presente en organismos autotróficos como plantas, algas y hongos, mientras que las enzimas XDH, AO, SO y ARC se encuentran en todos los eucariotas analizados hasta la fecha (Tabla I.1).

**Tabla I.1.** Las familias de las molibdoenzimas en eucariotas y su distribución.

ENZIMAS	ORGANISMOS
<b>Familia de la xantina oxidasa</b>	
<b>Xantina deshidrogenasa</b>	Todos los eucariotas
<b>Aldehído oxidasa</b>	Todos los eucariotas
<b>Piridoxal oxidasa</b>	<i>D. melanogaster</i>
<b>Nicotinato hidroxilasa</b>	<i>A. nidulans</i>
<b>Familia de la sulfito oxidasa</b>	
<b>Sulfito oxidasa</b>	Todos los eucariotas
<b>Nitrato reductasa</b>	Organismos autótrofos
<b>Amidoxime Reductase Complex</b>	Todos los eucariotas

Seguidamente se hará una descripción más detallada de las molibdoenzimas más extendidas entre los organismos eucariotas.

#### **I.2.2.2.1. Nitrato reductasa**

La NR (EC 1.6.6.1) de eucariotas se describió en detalle anteriormente en el apartado 1.3.1.1 La transferencia intramolecular de electrones comienza con la reducción del grupo FAD por el NAD(P)H; una vez reducido, los electrones son transferidos vía citocromo *b5* al dominio Cofactor de Mo donde el nitrato es reducido a nitrito (Skipper et al., 2001). La NR es un

homodímero en el que cada subunidad está compuesta por un polipéptido de unos 100 a 120 kDa que contiene un dominio amino-terminal de unión de cofactor de Mo y otro de dimerización, seguido de un dominio de unión del grupo hemo citocromo *b5* y un dominio carboxilo-terminal de unión a FAD y NAD(P)H (Figura I.11).

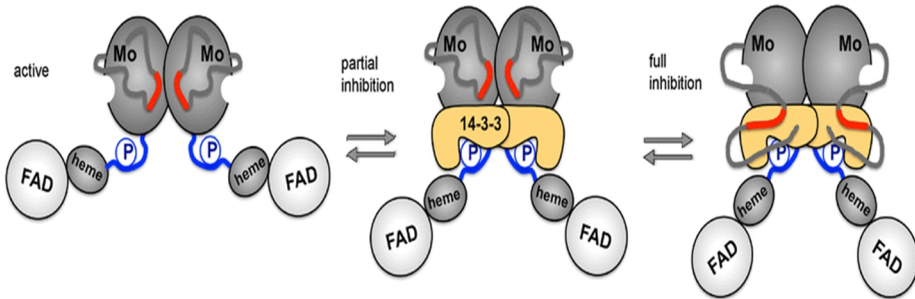
Se han descrito tres formas relacionadas de NR: NADH-NR, NAD(P)H-NR, biespecífica y NADPH-NR, siendo la NADH-NR la forma más común en plantas y en algas la NAD(P)H-NR (Sosa and Cardenas, 1977; Guerrero et al., 1981).

Los genes que codifican la NR de un gran número de organismos se han aislado y secuenciado (Zhou and Kleinhofs, 1996). En hongos y algas parece existir un único gen que codifica la NR (Fu and Marzluf, 1988; Fernández et al., 1989); sin embargo, en plantas superiores puede llegar a haber varios genes como es el caso de *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana*. La comparación de las secuencias de las NRs de hongos, algas y plantas ha llevado a la localización de los distintos dominios de esta enzima (Fernández et al., 1989; Campbell and Kinghorn, 1990), siendo el dominio de unión del cofactor de Mo el que muestra un mayor grado de identidad.

Además, la NR posee en su estructuras 2 sitios que funcionan como bisagras, denominados Hinge 1 y Hinge 2. En plantas Hinge 1 sirve para que la proteína 14-3-3 reguladora del ciclo del nitrógeno se una, necesitando para ello que esta región se encuentre fosforilada. La unión de la proteína 14-3-3, que da lugar a la inhibición de la actividad NR, a su vez interacciona con una región ácida dentro del dominio de cofactor Mo (Figura I.9) (Lambeck et al., 2010; Chi et al., 2015).

Por otra parte, parece ser que la NR es capaz de unir a una hemoglobina

truncada (THB1) sobre el sitio Hinge 2, que se encuentra entre la parte hemo y la parte FAD, esta unión se debe a un tipo de regulación por óxido nítrico, ya que ésta THB1 es capaz de eliminar óxido nítrico y transformarlo en nitrato captando poder reductor del dominio FAD de la NR, y consiguiendo, por tanto, que disminuya la actividad de NR (Sanz-Luque et al., 2015).



**Figura I.9.** Regulación de NR por 14-3-3 en *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de (Chi et al., 2015). En Azul se representa el Hinge 1 donde se fosforila la NR permitiendo la unión de la proteína 14-3-3. En rojo se señala el motivo ácido que interacciona con la proteína 14-3-3.

#### I.2.2.2.2. Sulfito oxidasa

La enzima sulfito oxidasa (SO) (EC 1.8.3.1) cataliza la oxidación de sulfito a sulfato como paso final de la degradación de aminoácidos azufrados. En animales, esta enzima consiste en un dominio amino-terminal hierro-hemo que contiene citocromo *b5*, y un dominio carboxilo terminal responsable de la unión del cofactor de Mo y de la dimerización (Kisker et al., 1997); mientras que la enzima de plantas no posee el dominio citocromo *b5* (Figura I.11).

La oxidación de sulfito consiste en una reacción de transferencia de dos electrones desde el sulfito hasta el Mo, reduciéndolo desde  $\text{Mo}^{\text{VI}}$  a  $\text{Mo}^{\text{IV}}$ . En el caso de plantas, los electrones producidos son transferidos posteriormente a oxígeno molecular para dar lugar a peróxido de hidrógeno (Hänsch et al., 2006; Byrne et al., 2009). En animales, los electrones son transferidos al  $\text{Fe}^{\text{III}}$

del citocromo *b5*, pasándolo de éste al citocromo *c*, que actúa de aceptor externo (van Severen et al., 2014).

Se considera que el papel fisiológico de la SO de animales es crítico para su supervivencia, ya que la deficiencia de esta enzima provoca graves trastornos neurológicos, por acumulación de sulfito en sangre, llegando a producir a una muerte prematura (Schwarz, 2005). Sin embargo, en plantas se desconoce el papel fisiológico de esta enzima, aunque podría estar relacionado de igual forma con la destoxicación del sulfito, un nucleófilo fuerte que podría reaccionar con numerosos componentes celulares.

#### **I.2.2.2.3. Xantina deshidrogenasa**

La Xantina deshidrogenasa (XDH) (EC 1.17.1.4) es una enzima clave en el proceso de degradación de purinas, catalizando la oxidación de hipoxantina a xantina y xantina a ácido úrico. La enzima es funcional como homodímero, estando compuesta por dos subunidades idénticas de unos 150 kDa. Cada monómero consta de tres dominios, un dominio amino-terminal para la unión de dos grupos [2Fe-2S], un dominio de unión de FAD y un dominio carboxilo terminal necesario para la unión del cofactor de Mo y para la dimerización (Figura I.11) (Hille et al., 2011).

El transporte de electrones derivados de la hidroxilación del sustrato se produce desde el cofactor de Mo al FAD vía los centros sulfo-férricos I y II; por su parte, desde el FAD son transferidos bien a  $\text{NAD}^+$  para formar NADH, o al oxígeno molecular para dar lugar a aniones superóxido (Yesbergenova et al., 2005).

En plantas, además de su papel en la degradación de purinas, se piensa que la XDH puede jugar un papel importante en la interacción planta-patógeno entre hongos fito-patógenos con leguminosas y cereales, en la muerte celular asociada con respuesta hipersensitiva, y con el proceso de

senescencia (Schwarz and Mendel, 2006).

#### **I.2.2.2.4. Aldehído oxidasa**

La enzima aldehído oxidasa (AO) (EC 1.2.3.1) cataliza la oxidación de un amplio número de heterociclos aromáticos y no aromáticos y aldehídos, para su conversión en los respectivos ácidos carboxílicos. La enzima AO es muy similar a la XDH ya que ambas tienen un alto grado de identidad de secuencia, una masa molecular casi idéntica, además de unir los mismos cofactores (Figura I.11) y actuar como hidrolasas (Hille et al., 2011). Estudios filogenéticos indican que la AO pudo derivar de la XDH tras una duplicación génica (Rodríguez-Trelles et al., 2003).

La característica más importante que distingue la AO de la XDH es que la AO no puede unir  $\text{NAD}^+$  y usa exclusivamente oxígeno molecular como aceptor de electrones.

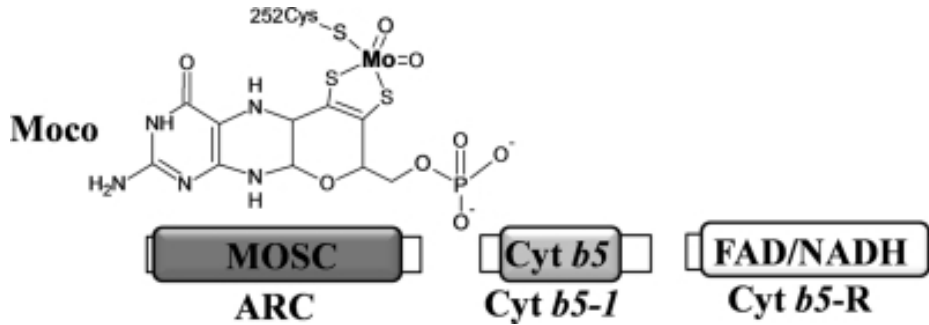
Además, la AO desempeña un papel fundamental en la síntesis de fitohormonas. Esta enzima es capaz de producir ácido indol-3-acético y ácido 1-naftil acético que pertenecen a las hormonas vegetales auxinas. Durante el desarrollo de la planta en las diferentes etapas, la composición de las 3 isoenzimas AO que existen en *Arabidopsis thaliana* cambia y pueden generar ácido abscísico a partir de aldehído abscísico (Akaba , 1999; Seo , 2000). El ácido abscísico es esencial para muchos procesos en el desarrollo de la planta, así como para la respuesta a estrés biótico y abiótico.

Aunque el papel fisiológico de la enzima AO en animales no se conoce con certeza, parece ser que tiene que ver con el metabolismo de productos xenobióticos, metabolismo de los neurotransmisores y la formación de ácido retinoico (Garattini et al., 2008; Garattini and Terao, 2012).

#### **I.2.2.2.5. Componente reductor de amidoxima (ARC)**

En los últimos años se ha identificado una nueva molibdoenzima tanto en eucariotas (Havemeyer et al., 2006) como en procariotas (Kozmin et al., 2008). La primera evidencia de la implicación de una molibdoenzima en la reducción de compuestos N-hidroxilados (NHC) fue gracias a la utilización de compuestos mutagénicos, análogos a bases nitrogenadas, más concretamente 6-hidroxilaminopurina (HAP), donde se vio la capacidad de su reducción en bacterias (Kozmin et al., 2008). En humanos se identificó la molibdoenzima responsable y se la denominó “Amidoxime Reductase Component” (ARC) (Havemeyer et al., 2006). La enzima ARC (EC 1.7.1.10) que tiene un tamaño de 35kDa cataliza la reducción de Compuestos de Nitrógeno Hidroxilados (NHC), tanto aminas primarias como secundarias, permitiendo su conversión a sus respectivos grupos amino. Además, se encuentra en el grupo de la molibdoenzimas del tipo SO (Chamizo-Ampudia et al., 2011; Sparacino-Watkins et al., 2014). La proteína ARC por sí sola no es capaz de reducir estos compuestos, ya que necesita de otras proteínas para el paso de electrones desde el NADH hasta el grupo de cofactor de Mo; éstas son una citocromo b5 y una citocromo b5 reductasa (Havemeyer et al., 2006). El grupo formado por estas 3 proteínas ARC+Cytb5-1+Cytb5-R se denomina Amidoxime Reducing Complex (ARCO) (Figura I.10) (Tejada-Jimenez et al., 2013). En procariotas este complejo ARCO está constituido únicamente por 2 proteínas, que son YcbX (análogo a la ARC pero con un dominio Ferredoxina en su extremo carboxilo) y una proteína CysJ (análogo de citb5-R) (Kozmin et al., 2010).

La proteína ARC está conservada en muchos organismos, en *Arabidopsis thaliana* existen dos genes que codifican para ARC. *Chlamydomonas reinhardtii* contiene un solo gen que codifica para esta proteína (Chamizo-Ampudia et al., 2011; Tejada-Jimenez et al., 2013). Sin embargo, en *Arabidopsis thaliana* y *Chlamydomonas* no se ha localizado en orgánulos, ni las predicciones son fiables (Llamas et al., 2011).



**Figura I.10.** Complejo ARCO. Adaptado de (Chamizo-Ampudia et al., 2011).

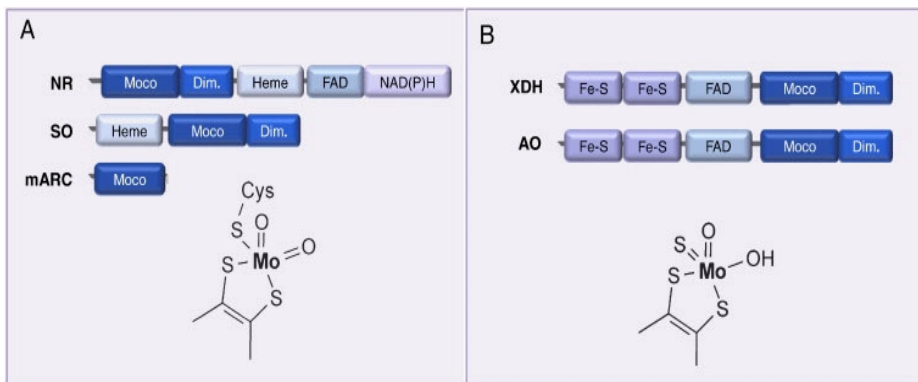
En humanos existen dos proteínas ARC en tándem, denominadas hmARC1 y hmARC2; solo se ha localizado la hmARC1 en la cara exterior de la membrana externa de la mitocondria (Havemeyer et al., 2006; Klein et al., 2012). En ratones se ha localizado en la membrana interna de la mitocondria (Da Cruz et al., 2003) y en ratas en la membrana de peroxixoma (Islinger et al., 2007).

La proteína ARC contiene dos dominios conservados, uno en el extremo N-terminal, que sería un dominio  $\beta$ -barril, y otro en el extremo C-terminal, que sería un dominio MOSC (de unión de cofactor de molibdeno) (Chamizo-Ampudia et al., 2011). Además, la proteína ARC, es la única molibdoenzima que actúa como monómero, actuando el resto de las molibdoenzimas eucariotas como dímeros (Wahl et al., 2010). Por otra parte, aún se desconoce la estructura cristalina de esta proteína.

Los estudios llevados a cabo hasta la fecha no han permitido establecer el papel fisiológico que puede tener la proteína ARC en la célula, aunque si queda claro que son varios los papeles que podría tener, como el de destoxificación de los NHC, como el HAP (Chamizo-Ampudia et al., 2011), y la N-hidroxi-citosina (Wahl et al., 2010), que son agentes mutagénicos. Por otra parte, se ha comprobado que es capaz de reducir el intermediario de la



producción de óxido nítrico desde arginina (N4-hidroxi-arginina (NOHA)) (Kotthaus et al., 2011), afectando a los niveles de óxido nítrico, participando en la regulación de lípidos intra celulares, donde una regulación negativa de ARC produce una disminución en la cantidad de lípidos (Neve et al., 2012). Aunque parece ser que está implicada en la producción de óxido nítrico desde nitrito por la vía reductiva (Sparacino-Watkins et al., 2014).



**Figura I.11.** Comparación de la organización de los dominios de las molibdoenzimas eucariotas. A) Molibdoenzimas que pertenecen a la familia SO, B) Molibdoenzimas que pertenecen a la familia xantina oxidasa. Adaptado de (Mendel and Kruse, 2012).

### I.2.3. Deficiencia de cofactor de Mo en eucariotas

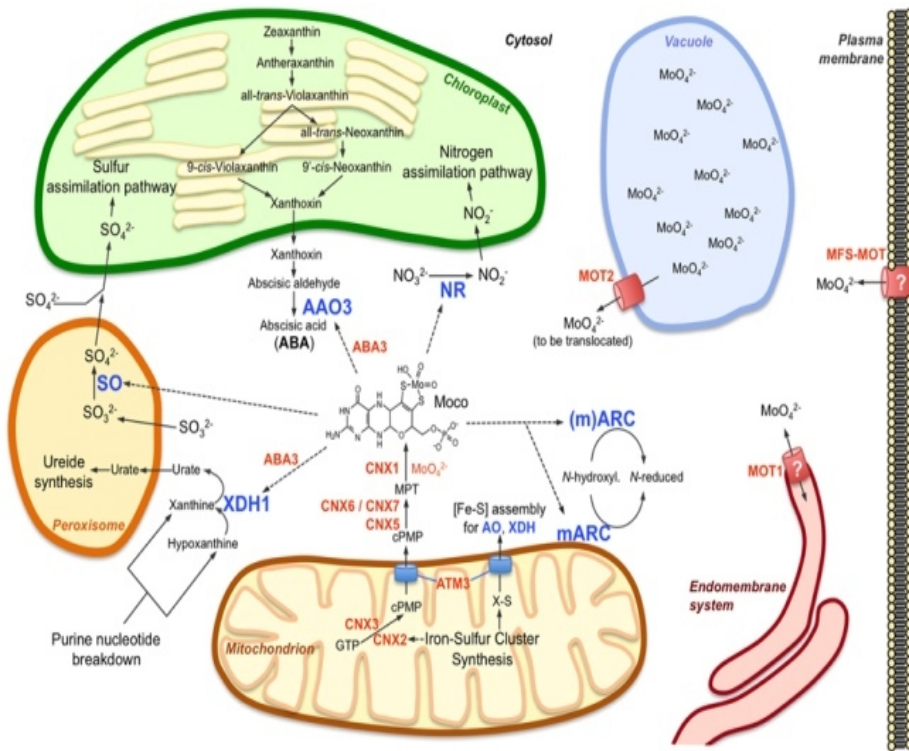
En plantas superiores, el déficit de cofactor de Mo causado por una deficiencia en su síntesis implica la pérdida del funcionamiento de procesos esenciales que provocan la muerte del organismo. Los mutantes deficientes en cofactor de Mo en plantas presentan una ausencia pleiotrópica de la actividad de todas las molibdoenzimas. Estos mutantes sólo pueden vivir en medios con fuentes nitrógeno reducidas, ya que son incapaces de reducir el nitrato. En general, la pérdida de la actividad de la NR tiene efectos más dramáticos que los causados por las restantes molibdoenzimas.

La selección de mutantes de cofactor de Mo se basa principalmente en el aislamiento de estirpes resistentes a clorato, ya que la NR es capaz de convertir el clorato a la forma tóxica clorito. Las estirpes resistentes a clorato serían mutantes en el gen estructural de la NR, el transporte de clorato/nitrato o en la biosíntesis del cofactor de Mo (LaBrie et al., 1992; Wilkinson and Crawford, 1993).

Entre las restantes molibdoenzimas, la AO es la que, por su ausencia, causa unos efectos más importantes en plantas. En *A. thaliana* se ha observado que la deficiencia de esta enzima provoca una reducción drástica en los niveles de la fitohormona ácido abscísico, lo que da lugar a una pérdida excesiva de agua e incapacidad para responder a estrés ambiental, lo que lleva a la planta a la muerte (Seo et al., 2000). Los síntomas observados, de forma general, en plantas deficientes en cofactor de Mo es que tienen un tamaño anormalmente pequeño, clorosis en las hojas y zonas necróticas, flores con desarrollo anormal de las anteras y los estambres, junto con una pobre producción de polen (Kaiser et al., 2005).

En humanos, la deficiencia de cofactor de Mo provoca la pérdida de las actividades de las enzimas sulfito oxidasa, xantina deshidrogenasa, AO y ARC. Las consecuencias que causan esta pérdida se caracteriza por un daño neurológico progresivo que lleva, en la mayoría de los casos, a la muerte pocos días después del nacimiento, y que están principalmente causados por la deficiencia de la enzima SO que protege al organismo, y en particular al cerebro, de los efectos tóxicos del sulfito (Johnson et al., 1980b). Todas las formas de deficiencia de cofactor de Mo se heredan como un rasgo autosómico recesivo teniendo incidencia en todos los grupos raciales. Hasta ahora se han identificado mutaciones en tres genes humanos que causan deficiencia de cofactor de Mo, que son *MOCS1*, *MOCS2* y *GEPH* (Reiss and Johnson, 2003).

El primer caso de deficiencia combinada de las actividades sulfito oxidasa y XDH fue descrito por Durán y colaboradores (Duran et al., 1978). Además, se han identificado 32 mutaciones que causan enfermedades relacionadas con la deficiencia en cofactor de Mo (Schwarz, 2005). Sin embargo, se estima que la incidencia es mucho mayor, lo que explicaría que en muchos casos no se hayan reconocido como tales.



**Figura I.12.** Esquema global del metabolismo del cofactor de molibdeno. Adaptado de (Bittner, 2014).

Los pacientes, normalmente, presentan fallos en el desarrollo y deformidades prácticamente justo después de nacer y no responden a ningún tipo de tratamiento. El diagnóstico rápido se puede realizar mediante la determinación de la concentración de sulfito en la orina, que en pacientes deficientes en cofactor de Mo es muy elevada. Por su parte, los pacientes que

sobreviven al periodo neonatal sufren una pérdida progresiva de materia blanca en el cerebro, dificultades para una correcta alimentación y problemas para el control ocular (Veldman et al., 2010).

### **I.2.3.1. Desarrollo de terapias para paliar la deficiencia de cofactor de Mo**

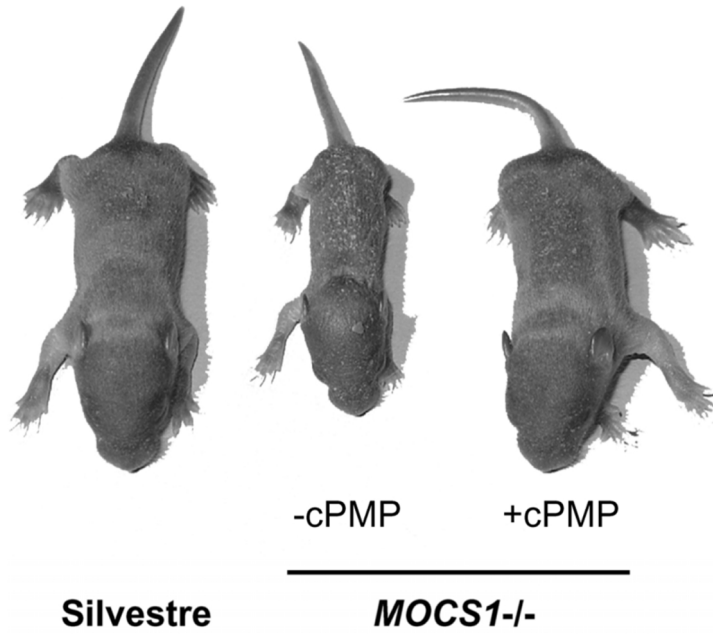
Para un mejor conocimiento del efecto que tiene la deficiencia de cofactor de Mo en humanos, se han generado modelos utilizando animales deficientes en el primer paso de biosíntesis de cofactor de Mo (Lee et al., 2002), ya que es en dicho paso donde se encuentran afectados la mayoría de pacientes cuyas mutaciones se han identificado, concretamente en el gen *MOCSI* (Reiss and Johnson, 2003). Con estos estudios se han obtenido ratones defectivos en el gen homólogo a *MOCSI* mediante técnicas de recombinación homóloga. Como ocurre en humanos, los ratones heterocigóticos no presentaron síntoma alguno, pero los homocigóticos murieron entre los días 1 y 11 después de nacer (Lee et al., 2002). Los ratones homocigóticos tratados con cPMP, un intermediario de la ruta de biosíntesis de cofactor de Mo, mediante inyección directa en el hígado, recuperan parcialmente las actividades de las molibdoenzimas y consiguen un desarrollo similar al mostrado por los ratones silvestres.

La administración de cPMP hace innecesaria la presencia del gen *MOCSI*, de forma que los ratones pueden vivir normalmente siempre que se continúe con dicha administración. La interrupción del tratamiento con cPMP en cualquier fase del desarrollo hace que los ratones defectivos en *MOCSI* presenten rápidamente los síntomas típicos de esta deficiencia muriendo a los pocos días de la interrupción del mismo (Figura I.13) (Schwarz et al., 2004; Schwarz, 2014).

En humanos se han encontrado casos de nacimientos de bebés con deficiencia en el cofactor de Mo. Los síntomas que presentan estos bebés, son

los siguientes: presentan graves encefalopatías, el cerebro muestra una severa pérdida de neuronas neocorticales, gliosis y áreas de necrosis quística en la materia blanca y gris. Entre los síntomas observados también se encuentra la deficiencia de SO, lo que sugiere que la deficiencia de SO provoca gran parte de la patología cerebral, produciendo la muerte a los siete días del nacimiento (Edwards et al., 2015). Por otra parte, se han identificado en la orina aminoácidos, con altos niveles de S-sulfo-L-cysteine y xantina y bajos de ácido úrico. Por otra parte, también se detectaron en la orina intermediarios de la ruta de biosíntesis de Cofactor de Mo, variando éstos en función del gen que tuvieran mutado en la ruta de biosíntesis (Veldman et al., 2010; Edwards et al., 2015).

También se han notificado casos de bebés en los que se ha logrado identificar una falta de cofactor de Mo antes de los siete días y que pudieron sobrevivir tras nacer. Además, se logró la supervivencia de una niña que tenía deficiencia de SO, en la que se identificó que era causada por la deficiencia de cofactor de Mo. Gracias a la aplicación de un intermediario de la ruta de biosíntesis del Cofactor de Mo, en este caso el precursor Z, cPMP, se consiguió la supervivencia, aunque presentaba disminución neuronal y malformación facial que no revirtieron con el tiempo, todas estas malformaciones son debidas al tiempo que pasó sin cofactor de Mo (Veldman et al., 2010; Hitzert et al., 2012).



**Figura I.13.** Efecto del tratamiento de ratones defectivos en el gen *MOCS1* con cPMP. Adaptado de (Schwarz et al., 2004).



# **OBJETIVOS**





## **Objetivos**

El objetivo general de esta tesis ha sido el estudio de una nueva molibdoenzima, identificada en humanos y denominada ARC, en un sistema de tipo plantas. Para ello, se ha utilizado principalmente el organismo *Chlamydomonas reinhardtii*, y se han abordado los siguientes puntos:

- 1) Estudio de la proteína ARC en el organismo *Chlamydomonas*, más en concreto: su caracterización molecular, determinación de la familia de molibdoenzimas a la que pertenece, qué otras proteínas requiere para su actividad, los residuos de aminoácidos importantes para su estructura, estabilidad y funcionalidad, así como su interacción con otras proteínas.
  
- 2) Estudios de antisentidos de ARC donde determinar la relación de ARC con la Nitrato Reductasa. Además, de la producción de óxido nítrico por parte de la ARC, la regulación de la producción de óxido nítrico de la ARC junto a la Nitrato Reductasa y la acumulación de nitrito por parte de estos antisentidos.



## **RESULTS AND DISCUSSION**



**Chapter I: The *Chlamydomonas reinhardtii*  
Molybdenum Cofactor Enzyme crARC Has  
a Zn-Dependent Activity and Protein  
Partners Similar to Those of Its Human  
Homologue**



## 1. The *Chlamydomonas reinhardtii* Molybdenum Cofactor Enzyme crARC Has a Zn-Dependent Activity and Protein Partners Similar to Those of Its Human Homologue

The ARC (amidoxime reducing component) proteins are molybdenum cofactor (Moco) enzymes named hmARC1 and hmARC2 (mitochondrial ARCs [hmARCs]) in humans and YcbX in *Escherichia coli*. They catalyze the reduction of a broad range of N-hydroxylated compounds (NHC) using reducing power supplied by other proteins. Some NHC are prodrugs or toxic compounds. YcbX contains a ferredoxin (Fd) domain and requires the NADPH flavin reductase CysJ to reduce NHC. In contrast, hmARCs lack the Fd domain and require a human cytochrome *b5* (hCytb5) and a human NADH Cytb5 reductase (hCytb5-R) to reduce NHC. The ARC proteins in the plant kingdom are uncharacterized. We demonstrate that *Chlamydomonas reinhardtii* mutants defective in Moco biosynthesis genes are sensitive to the NHC *N*<sup>6</sup>-hydroxylaminopurine (HAP). The *Chlamydomonas reinhardtii* ARC protein, crARC, has been purified and characterized. The six *Chlamydomonas* Fds were isolated, but none of them is required by crARC to reduce HAP. We have studied the stability over time of the molybdenum cofactor at different temperatures of the crARC protein.

We have also purified and characterized five *C. reinhardtii* Cytb5 (Cytb5) and two flavin reductases, one that is NADPH-dependent (crCysJ) and one that is NADH-dependent (Cytb5-R). The data show that crARC uses Cytb5-1 and Cytb5-R to reduce HAP.

The crARC protein has a Zn-dependent activity, and the presence of Zn increases its  $V_{max}$  more than 14-fold. In addition, fourteen amino acids of crARC were substituted by alanine, and we demonstrate that the fully conserved cysteine 252 is essential for both Moco binding and catalysis.



Therefore, it is proposed that crARC belongs to the sulfite oxidase family of Moco enzymes. With the analysis of the other mutants obtained we have found some crARC residues that are important for the interactions with its partners and with the molybdenum cofactor. Finally, we have demonstrated that the interaction between crARC, Cytb5-*I* and Cytb5-R occurs *in vitro*.

## 1.1 Introduction

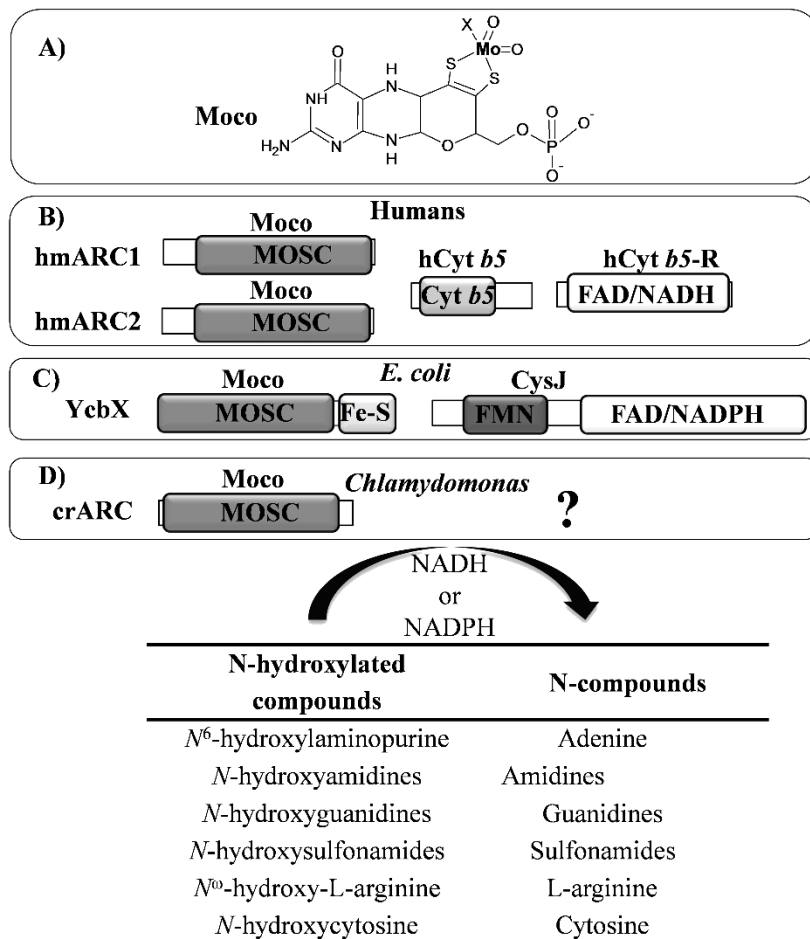
All eukaryotic molybdenum (Mo)-containing enzymes that have been studied have Mo chelated with an organic motif (molybdopterin [MPT]) forming the so-called Mo cofactor (Moco) (Figure 1.1A). Moco is widespread in all life kingdoms and synthesized by a conserved pathway, divided in several steps according to the biosynthesis of its intermediates from a guanosine derivative (probably GTP): cyclic pyranopterin monophosphate (cPMP), MPT, and MPT-AMP (adenylated molybdopterin). In *Chlamydomonas reinhardtii*, the CNX2 and CNX3 enzymes catalyze the conversion of GTP to cPMP, CNX5, CNX6, and CNX7 from cPMP to MPT, CNX1G from MPT to MPT-AMP, and CNX1E from MPT-AMP to Moco (Llamas et al., 2007). Two families of Moco-containing enzymes are present in eukaryotes, the sulfite oxidase (SO) family and the xanthine oxidase (XO) family. In Moco proteins, Mo is chelated via two thiol groups of MPT and also with two oxo groups (Figure 1.1A). In the SO family, the fifth Mo ligand is a protein derived cysteine, and in the XO family, this is an inorganic sulfur (Schwarz et al., 2009).

The molybdoenzyme called ARC (amidoxime reducing component) is involved in the reduction of a broad range of N-hydroxylated compounds (NHC), present in eukaryotic and prokaryotic organisms (Havemeyer et al., 2006). An important group of base analogues are for example the NHC of N-bases, like adenine, *N*<sup>6</sup>-hydroxylaminopurine (HAP), a very powerful mutagen in phages, bacteria, and eukaryotic cells (Pavlov et al., 1991). In bacteria, the defect in any enzyme involved in the Moco biosynthesis pathway

gives a HAP-hypersensitive phenotype (Kozmin and Schaaper, 2007), the first evidence of a Moco-dependent enzyme involved in the detoxification of HAP. However, the deletion of known molybdoenzymes in *Escherichia coli* failed to reveal any HAP sensitivity (Kozmin and Schaaper, 2007), suggesting that a novel type of Moco-dependent activity was involved in HAP detoxification.

Nevertheless, a novel Moco dependent enzymatic activity involved in the reduction of NHC was discovered in humans, hmARCs (human mARCs), operating in conjunction with a human Cytb5 (hCytb5) and a human NADH Cytb5 reductase (hCytb5-R), capable of converting the prodrug, benzamidoxime, to its active form, benzamidine (Havemeyer et al., 2006). This conversion is analogous to the reduction of HAP to adenine, as it entails the reduction of an NHC (benzamidoxime) to the corresponding amino form (benzamidine) (Figure 1.1). Two highly homologous hmARC proteins are present in humans, hmARC1 and hmARC2 (Figure 1.1B). The subcellular localization of ARC proteins is not well defined. The hmARCs were localized in the outer mitochondrial membrane (Gruenewald et al., 2008), mouse ARC proteins were localized in the inner mitochondrial membrane (Da Cruz et al., 2003), and rat ARC proteins in peroxisomal membranes (Islinger et al., 2007).

In bacteria, the enzyme involved in the HAP detoxification was identified by analyzing an *E. coli* mutant defective in the YcbX protein. YcbX was capable of avoiding the HAP toxicity by its reduction to adenine (Kozmin et al., 2008).



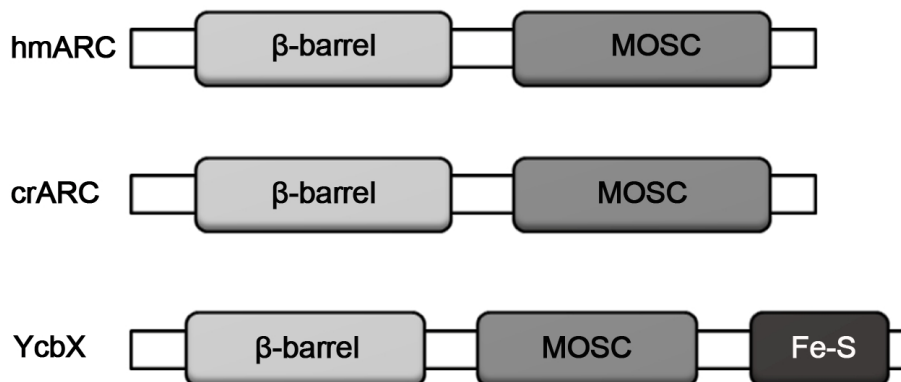
**Figure 1.1.** Schematic structure of Moco, ARC proteins, its partners, and the reaction catalyzed. (A) Structure of the Moco molecule with the organic motif (MPT) and the Mo atom shown in bold type. The X indicates that the fifth Mo ligand in the ARC proteins is unknown. (B to D) Schematic representations of the ARC system in humans (B), *E. coli* (C), and *Chlamydomonas reinhardtii* (D). Each of the protein domains found in the ARC protein system, MOSC (molybdenum cofactor sulfurase C-terminal domain), Cytb5 (Cytb5 domain), FAD/NADH (FAD- and NADH-binding domain), FAD/NADPH (FAD and NADPH-binding domain), Fe-S (2Fe-2S binding domain), and FMN (FMN-binding domain), is shown in boxes (most boxes with a gray background). The MOSC domain is able to bind Moco, which is indicated by Moco above the domain, but it is not known to which amino acids Moco binds. The proteins involved with crARC in the HNC reduction are unknown (question mark). In the Table at the bottom of the figure, some reactions carried out by these proteins are shown with some examples of HNC substrates studied. The electron donors are NADH in the human system and NADPH in the *E. coli* system.

YcbX and hmARCs are hypothetical members of the MOSC protein superfamily. These proteins contain a domain  $\beta$ -barrel and a domain homologous to the C-terminal domain (MOSC) of the eukaryotic Moco sulfurases (MOS) (Figure 1.2). The MOS enzymes are involved in the transfer of a sulfide ligand, yielding sulfurated Moco, which is essential for the activity of the XO family of Moco enzymes. However, except for MOS, all other members of the MOSC superfamily are proteins without any confirmed function (Schwarz et al., 2009). MOSC-containing proteins are widely distributed in prokaryotes and eukaryotes and contain a fully conserved cysteine (Anantharaman and Aravind, 2002).

YcbX contains, in contrast to hmARCs, a ferredoxin (Fd) [Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>] domain in the C terminus, essential for its activity (Kozmin et al., 2008) (Figure 1.1C and Figure 1.2). Recently, the CysJ component of the sulfite reductase complex (8CysJ4CysI) has been identified as one additional component of this system (Kozmin et al., 2010) (Figure 1.1C). The role of CysJ in HAP reduction is unique and independent of CysI and sulfite reductase. CysJ provides via its NADPH flavin reductase activity the reducing equivalents needed by YcbX to reduce HAP. Therefore, the role of bacterial CysJ seems to be analogous to hCytb5-R, that is, to provide the reducing power needed for the reduction of the NHC. In bacteria, the electrons would be funneled from Fd to the MOSC domain of YcbX, while in humans the electrons would go from the hCytb5 to the MOSC domain of hmARC proteins. Thus, it appears that the ARC proteins are a widely distributed class of molybdoenzymes existing in organisms from bacteria to mammalian cells with similar biochemical properties.

Although there have been substantial advances in the role of ARC proteins in bacteria and human cells, nothing is known about ARC proteins in the plant kingdom. We have studied this protein in the green alga

*Chlamydomonas reinhardtii*, which has a single gene encoding a protein with similarity to ARC that we call crARC (for *Chlamydomonas reinhardtii* ARC).



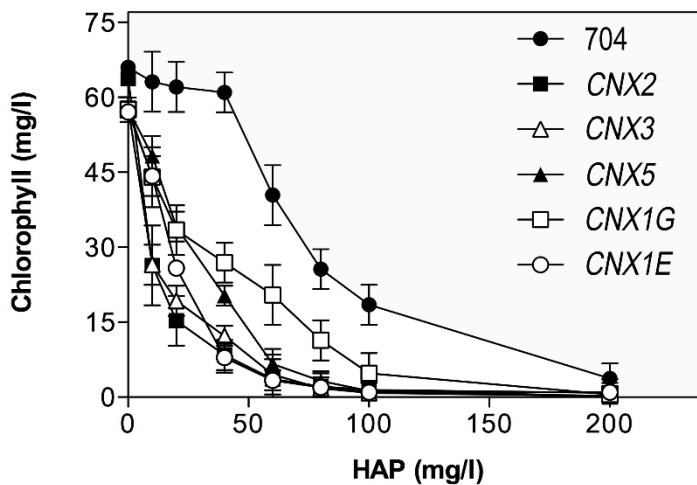
**Figure 1.2.** The domains of proteins hmARC (ARC of human), crARC (ARC of *Chlamydomonas reinhardtii*) and YcbX (ARC of *Escherichia coli*). The MOSC domain has Moco and the ferredoxin domain a Fe<sup>2</sup>-S<sub>2</sub> group.

In this work, we have shown that crARC is a molybdoenzyme critical for detoxifying HAP, and similar to its human homologue, it requires the NADH-dependent Cytb5 flavin reductase and Cytb5-1 but none of the six *Chlamydomonas* ferredoxins. The enzymatic reduction reaction of HAP by crARC has also been studied *in vitro* and found to have a Zn-dependent activity. Finally, crARC mutants with each of its cysteine residues substituted were obtained, demonstrating that cysteine 252 is essential for Moco binding and catalysis; therefore, it is proposed that crARC belongs to the SO family of Moco enzymes.

## 1.2 Results

### 1.2.1. The *Chlamydomonas reinhardtii* Moco mutants are sensitive to HAP

The *E. coli* mutants defective in molybdenum cofactor (Moco) biosynthesis are hypersensitive to the toxic effect of *N*<sup>6</sup>-hydroxylaminopurine (HAP) present in the growth media (Kozmin and Schaaper, 2007). In order to determine the relationship between N-hydroxylated compound (NHC) toxicity and Moco, we have investigated the phenotypes of different *Chlamydomonas* Moco mutants in the presence of HAP. Screening of the *Chlamydomonas* mutant library generated in our lab by insertional mutagenesis (González-Ballester et al., 2005b) allowed us to identify five mutations in Moco biosynthesis genes (Llamas et al., 2007). These strains are affected at genes *CNX2* and *CNX3* of the first step of Moco biosynthesis, *CNX5* of the second step, *CNX1G* of the third step, and *CNX1E* of the fourth step (see introduction).



**Figure 1.3.** HAP toxicity in the *Chlamydomonas reinhardtii* Moco mutants. The strains were laid on liquid ammonium medium with the indicated amount (in milligrams per liter) of HAP. The cells were grown under continuous light for 5 days, then the growth was estimated by measuring the amount of chlorophyll of the culture.

These mutants allowed us to study systematically the effect of inactivated genes in each of the defined Moco biosynthetic steps. As shown in Figure 1.3, all the *Chlamydomonas* Moco mutants tested were hypersensitive to HAP compared to *Chlamydomonas* parental strain 704. This result indicates that the mutations blocking the synthesis of any Moco intermediate and thus of a functional Moco leads to a HAP hypersensitivity phenotype. Thus, our results suggest that *Chlamydomonas reinhardtii* has a Moco-dependent HAP detoxification system. The questions arising now are whether or not this system depends on ARC proteins and if so, whether this is similar to the system found in bacteria or to the one found in humans (Figure 1.1). Thus, further studies were performed in order to identify the enzyme complex involved in HAP detoxification.

### **1.2.2. Cytb5, but not Fd, is involved in HAP resistance in *Chlamydomonas***

The protection system against NHC toxicity in a photosynthetic organism like *Chlamydomonas* has not been covered. The HAP toxicity found in every *Chlamydomonas* Moco mutant suggests that an ARC protein could be involved in HAP detoxification in this organism. A search in the *Chlamydomonas* genome resulted in one sequence that we call crARC. The main difference among YcbX, hmARCs, and crARC is the presence of a Fd domain [Fe2-S2] in the *E. coli* protein that is absent in the *Chlamydomonas* and humans proteins. However, the MOSC domain is present in these three proteins (Figure 1.2). crARC shows 26.3, 26.1, and 21.3% sequence identity with hmARC1, hmARC2, and YcbX, respectively.

None of the mutants screened from our *Chlamydomonas* insertional mutant collection (González-Ballester et al., 2005a) were defective in the crARC gene, most probably because the selection medium was not appropriate for this purpose. As the *E. coli ycbX* mutant is hypersensitive to the toxic effect of HAP, the participation of the different proteins in HAP detoxification could be analyzed from their ability to revert the HAP toxicity

found in this mutant (we refer to these experiments as *in vivo* experiments). Therefore, to ascertain whether crARC is involved in the detoxification of HAP, this protein was expressed heterologously in the *E. coli ycbX* mutant.

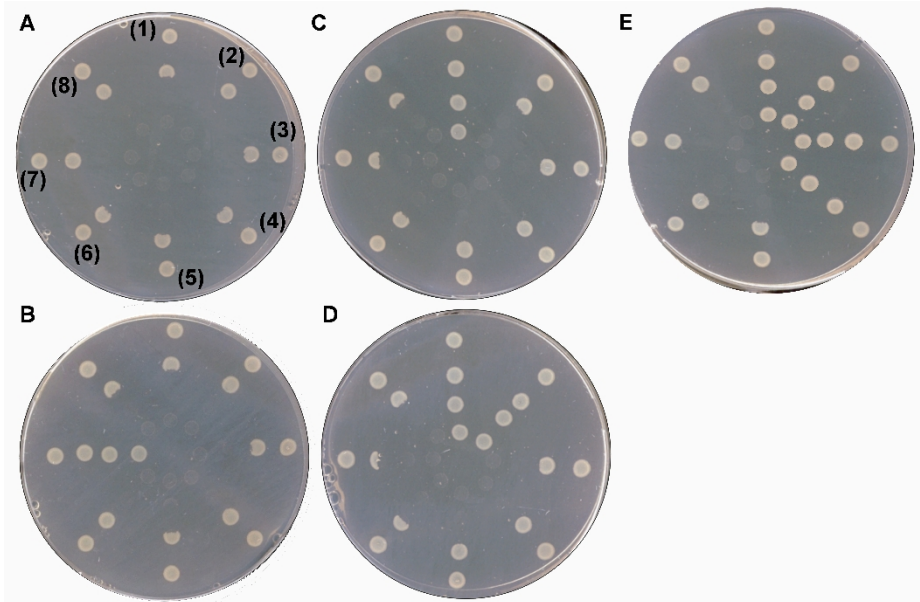
Figure 1.4A shows that the HAP toxicity was not reverted in any *E. coli ycbX* mutant transformed with crARC and YcbX (Figure 1.4.e). The question that now arises is whether crARC needs one ferredoxin (Fd) similar to YcbX or one Cytb5 similar to hmARCs to be fully functional. We cloned the six ferredoxins present in the *Chlamydomonas* genome (Terauchi et al., 2009). For a control, we also cloned the Fd domain of YcbX (ecFDX [*E. coli* FDX]). The percentages of identity between the *E. coli* Fd and *Chlamydomonas* Fd are 17.3 (crFDX1), 15.4 (crFDX2), 17.1 (crFDX3), 14.5 (crFDX4), 15.7 (crFDX5), and 14.4 (crFDX6). Figure 1.4A, spots 1 to 7, shows that the HAP toxicity was not reverted in the *E. coli ycbX* mutant cotransformed with crARC plus each of the six crFDX or the ecFDX. This result suggests that none of the *Chlamydomonas* Fd participate with crARC in the detoxification of HAP. For a control, we also cloned the entire YcbX and its MOSC domain (ecMOSC). The entire YcbX (data not shown) and the cotransformant with ecMOSC plus ecFDX domains were able to revert the HAP toxicity (Figure 1.4B, spots 7). This result shows that our strategy of analyzing whether or not there are *in vivo* protein interactions by coexpressing proteins or their domains in two expression vectors works; at least between previous predicted interactions, what motivated us to find by this way the partners of crARC. None of the six *Chlamydomonas* Fds was able to revert the HAP toxicity when coexpressed with ecMOSC (Figure 1.4B, spots 1 to 6).

These results suggest that the interaction between ecMOSC and ecFDX domains is very specific and that the crFDXs cannot replace the function of the ecFDX domain.



As the crFDXs have failed as crARC partners, we analyzed the *Chlamydomonas* Cytb5, since the partner of hmARCs is a hCytb5. A search in the *Chlamydomonas* genome using as query hCytb5 resulted in 5 sequences (Cytb5-1 to Cytb5-5) that were cloned. The percentages of identity between the hCytb5 and each crCytb5 are 28.8 (Cytb5-1), 26.4 (Cytb5-2), 15.7 (Cytb5-3), 28.8 (Cytb5-4), and 16.3 (Cytb5-5) (Figure 1.5). Interestingly, as shown in figure 1.4C, spots 1, only Cytb5-1 was able to revert the HAP toxicity when cotransformed with crARC. However, when 100  $\mu$ M molybdate was also included in the medium, Cytb5-2 was also able to revert the HAP toxicity (Figure 1.4D, spots 2). These results show clearly that Cytb5 but not crFDX participates with crARC in the HAP detoxification, at least *in vivo*. These data allowed us to hypothesize that the proteins crARC and Cytb5-1 or Cytb5-2 are forming a complex *in vivo* in the bacterial cell that functions analogously as YcbX. This means that *in vivo* one or more *E. coli* proteins should be able to donate electrons to this predicted complex.

In *E. coli*, the *cysJ* mutation also causes a HAP hypersensitivity phenotype (Kozmin et al., 2010). CysJ provides via its NADPH flavin reductase activity the reducing equivalents needed for the reduction of HAP by YcbX (Kozmin et al., 2010). The *E. coli* *cysJ* mutant was also cotransformed with crARC plus each of the five Cytb5. However, none of them was able to revert the HAP toxicity of the *cysJ* mutant, even in the presence of molybdate in the medium (data not shown). This means that the CysJ protein is able to transfer, at least *in vivo*, the reducing equivalents to the predicted complex of crARC with Cytb5-1 or Cytb5-2.



**Figure 1.4.** HAP toxicity of *E. coli* strains expressing proteins. (A) Effect of Fd on HAP toxicity. The *E. coli ycbX* mutant was cotransformed with crARC cloned in pQE80 plus crFDX1 (1), crFDX2 (2), crFDX3 (3), crFDX4 (4), crFDX5 (5), crFDX6 (6), ecFDX (7), or none (8) cloned in pASK-IBA5C. (spot 8). (B) As in panel A but changing the crARC by the N-terminal MOSC domain of YcbX (ecMOSC). (C) Effect of *Chlamydomonas* Cytb5 on HAP toxicity. The *E. coli ycbX* mutant was cotransformed with crARC cloned in pASK-IBA5C plus Cytb5-1 (1), Cytb5-2 (2), Cytb5-3 (3), Cytb5-4 (4), Cytb5-5 (5), or none (6, 7, and 8) cloned in pQE80. (D) As in panel C but adding 100  $\mu$ M molybdate to the growth medium. (E) Effect of YcbX on HAP toxicity. The *E. coli ycbX* mutant was cotransformed: with YcbX cloned in pQE80 (spots 1-4) and the empty pQE80 (spots 5-8). Suspensions of each different strain were applied in a series of spots radiating out from the center. The spot numbers are shown in the first plate in panel A, but the others follow the same code. The center of all the plates contained 100  $\mu$ g HAP. The plates were incubated for 24 h at 37°C and inspected for a zone of growth inhibition around the center.

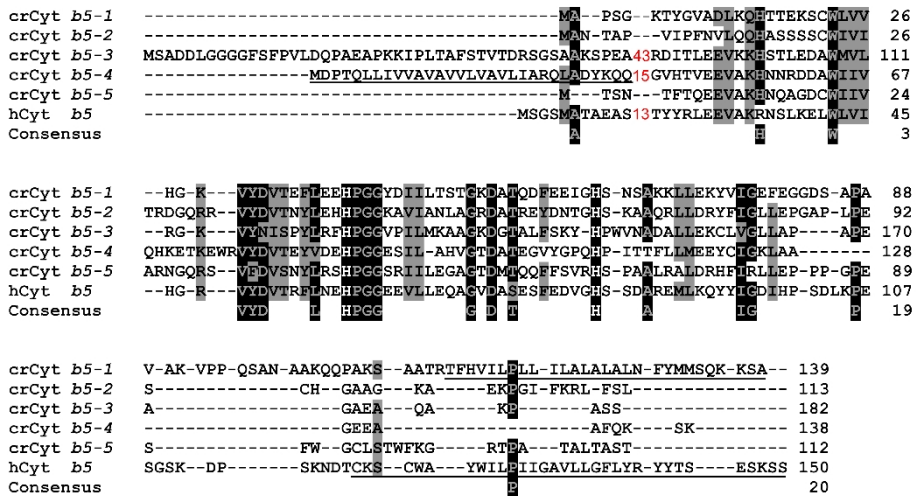
### 1.2.3. The identification of the second crARC partner

To analyze *in vitro* which *Chlamydomonas* reductase is involved in the reduction of HAP, we first purify and characterize the potential proteins involved in this reduction.

In contrast to hmARC proteins, crARC does not contain any clearly predicted targeting sequences to the mitochondria or to any other cell compartment. Therefore, we cloned the full-length cDNA, and the recombinant crARC was expressed in a soluble form of 35 kDa. The hmARC1 and hmARC2 proteins were cloned without their predicted signal sequences for mitochondrial export. The hmARC1 and hmARC2 proteins were obtained in a soluble form of 33.2 and 33.6 kDa, respectively. YcbX after the recombinant expression was obtained as a soluble protein of 40.6 kDa with a dark red color, corresponding to the bound Fd domain.

Purified crARC, hmARC1, hmARC2, and YcbX were subjected to inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) analysis to measure the Mo content, which reflects the amount of Moco. As shown in Table 1.1, these four proteins present similar and almost fully saturated (1:1) Mo/protein ratios.

The visible absorption spectra of crARC in the oxidized state showed an absorption shoulder around 410 nm and a broad shoulder at 465 nm. When crARC was reduced with dithionite, the 410-nm shoulder shifted to 425 nm and the broad shoulder at 465 nm disappeared (Figure 1.6A), in agreement with the spectra of hmARCs (Wahl et al., 2010).



**Figure 1.5.** Multiple-sequence alignment of *Chlamydomonas reinhardtii* and human Cytb5 proteins. The consensus sequences have been calculated with a threshold of 75% with the BioEdit v.7.0.9 program. The sequences and GenPept accession numbers (shown in parentheses) are Cytb5-1 (XP\_001697920), Cytb5-2 (XP\_001697853), Cytb5-3 (XP\_001693518), Cytb5-4 (XP\_001693863), and Cytb5-5 (XP\_001697852) (Cytb5-1) The Cytb5-1 to Cytb5-5 are from *Chlamydomonas reinhardtii*, and hCytb5 (NP\_085056) from humans. Highly conserved amino acids are shown on a black background, and moderately conserved amino acids are shown on a gray background. The red numbers in the sequence alignment (43, 15, and 13) represent the lengths of poorly conserved inserts that have not been shown in the alignment. The conserved histidines that bind the heme group are indicated by white letters on a black background. The coding sequences for the putative membrane-binding domains are underlined. Gaps introduced to maximize the alignment are indicated by dashes.

The UV-visible absorption spectrum of YcbX showed maxima at 350 nm, 420 nm, and 455 nm typical of a Fd domain (Figure 1.6B). After dithionite reduction, all these absorption peaks decreased their intensity.

Cytb5 corresponds to an amphipathic protein consisting of two domains, a water-soluble heme-binding domain and a hydrophobic membrane-anchoring domain. The Cytb5-1 and Cytb5-4 proteins had a hydrophobic membrane-anchoring domain at the C terminus and N terminus,

respectively (Figure 1.5). In order to improve the solubility and thus expression and purity of Cytb5-1 and Cytb5-4, these proteins were partially truncated to remove the hydrophobic membrane-anchoring domain. The other Cytb5 proteins lack any predicted anchoring domain. After purification, all the Cytb5 of 12 to 19 kDa were obtained in a soluble form and characterized by their high purity and a dark red color, which indicated the binding of the heme group. The typical absorption spectrum signature of Cytb5 proteins (Strittmatter and Velick, 1956) was obtained for all five recombinant Cytb5 proteins with a pronounced Soret peak at 413 nm and faint absorbance between 520 and 570 nm in the oxidized state (Figure 1.6C). After dithionite reduction, the Soret peak shifted to 423 nm and two minor peaks at 526 and 556 nm were observed (Figure 1.6C). The determination of Cytb5-bound heme (Strittmatter and Velick, 1956) revealed that these proteins were saturated with heme at an average of 10 to 35% (Table 1.1).

<b>Protein</b>	<b>Cofactor content [mol/mol protein]</b>
CrARC	0.83±0.06 Moco <sup>a</sup>
Cytb5-1	0.17±0,01 Heme <sup>b</sup>
Cytb5-2	0.20±0,03 Heme <sup>b</sup>
Cytb5-3	0.35±0,02 Heme <sup>b</sup>
Cytb5-4	0.19±0,01 Heme <sup>b</sup>
Cytb5-5	0.10±0,01 Heme <sup>b</sup>
Cytb5-R	0.34±0.02 FAD <sup>b</sup>
CrCysJ	0.55±0.06 FAD <sup>b</sup>
EcYcbX	0.81±0.07 Moco <sup>a</sup>
hmARC1	0.85±0.11 Moco <sup>a</sup>
hmARC2	0.90±0.09 Moco <sup>a</sup>

**Table 1.1.** Cofactor content of recombinant proteins used in this work.

<sup>a</sup> Determined by quantifying Mo by ICP-OES (n=3)

<sup>b</sup> Determined via extinction coefficient (n=3)

We have shown above that crARC together with Cytb5-1 or Cytb5-2 needs *in vivo* the presence of CysJ to detoxify HAP. Therefore, a CysJ homologous protein was searched for in the *Chlamydomonas* genome. A *Chlamydomonas* homologue (crCysJ) was found with 29% identity to CysJ. This protein belongs to the NADPH diflavin reductase family and like CysJ contains a N-terminal FMN domain and a C-terminal FAD/NADPH domain. However, as the crARC partner is a Cytb5, a protein homologous to hCytb5-R was also searched in the *Chlamydomonas* genome. We identified a close homologue to hCytb5-R with a 38% identity that we called Cytb5-R. Both reductases belong to the NADH Cytb5 reductase family that are flavoproteins, with one FAD attached as a prosthetic group, catalyzing the electron transfer from NADH to Cytb5 (Bando et al., 2004).

The Cytb5-R and crCysJ proteins contain in their N-terminal region a predicted hydrophobic membrane-anchoring domain and a peptide signal for chloroplast export, respectively. These sequences were removed in order to increase the expression and purification of the protein. After purification, Cytb5-R and crCysJ were obtained as soluble proteins of 28.1 kDa and 71.2 kDa, respectively. These proteins were characterized by a light yellow color indicative of bound FAD. When Cytb5-R and crCysJ were subjected to UV-visible absorption spectroscopy in the oxidized state, they showed two distinct absorption peaks at 390 and 460 nm accompanied by a shoulder at around 480 nm (Figure 1.6D and E).

After dithionite reduction, all these absorption peaks were replaced by broad absorptions between 315 and 500 nm. These spectra are in agreement with the typical signature of flavin reductases. The determination of bound FAD (Whitby, 1953) to Cytb5-R and crCysJ revealed that these proteins were saturated at an average of 34% and 55%, respectively (Table 1.1). In summary, the spectral properties of the five Cytb5, Cytb5-R, and crCysJ

indicate that these recombinant proteins meet the demands of electron carrier proteins.

**Table 1.2.** Determination of flavin reductase activity of Cytb5-R and crCysJ.

Protein	Flavin reductase activity <sup>a</sup> measured by:					
	Reduction of Cytb5 protein <sup>b</sup>					Reduction of ferricyanide <sup>c</sup>
	Cytb5-1	Cytb5-2	Cytb5-3	Cytb5-4	Cytb5-5	
Cytb5-R	563 ± 8.6	107 ± 13	0	253 ± 33	0	678 ± 27
crCysJ	57 ± 11	556 ± 125	162 ± 19	297 ± 36	0	44.8 ± 5.6

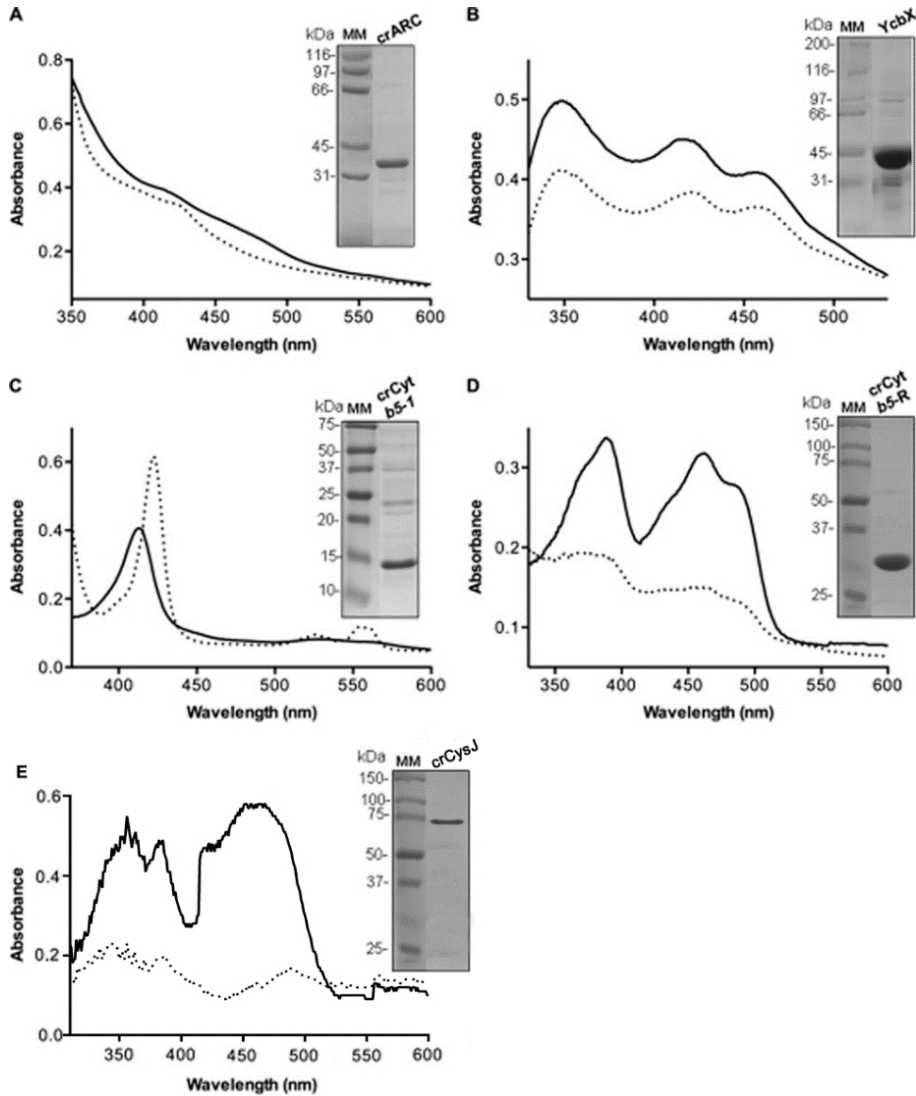
<sup>a</sup> The flavin reductase activity was measured by two methods; the reduction of ferricyanide and the reduction of each of the five Cytb5 proteins (described in detail in Materials and Methods). NADH was the electron donor for Cytb5-R, and NADPH was the electron donor for crCysJ. Data are means ± standard deviations of 3 independent experiments.

<sup>b</sup> Measured in milliunits per milligram of protein.

<sup>c</sup> Measured in units per milligrams of protein.

The flavin reductase activity of Cytb5-R and crCysJ was evaluated by measuring the reduction rate with the artificial electron acceptor ferricyanide and with each of the five Cytb5. As shown in Table 1.2, Cytb5-R was able to efficiently reduce ferricyanide with NADH. However, crCysJ was able to reduce efficiently ferricyanide with NADPH but not with NADH (data not shown).

The Cytb5-R protein was more efficient than crCysJ in the reduction of ferricyanide. These results indicate that Cytb5-R and crCysJ are NADH and NADPH-dependent reductases, respectively. The Cytb5-R protein was able to efficiently reduce Cytb5-1, Cytb5-2, and Cytb5-4 with NADH but failed to reduce Cytb5-3 and Cytb5-5 (Table 1.2). However, crCysJ was able to reduce all the Cytb5 with NADPH, except for Cytb5-5. Cytb5-R was more efficient in reducing Cytb5-1 than crCysJ. These data show that the Reductase activity of these proteins is fully active.



**Figure 1.6.** UV-visible absorption spectra and purity of recombinant crARC, YcbX, Cytb5-1, Cytb5-R and crCysJ. Absorption spectra of 60  $\mu\text{M}$  crARC (A), 50  $\mu\text{M}$  YcbX (B), 6  $\mu\text{M}$  Cytb5-1 (C), and 20  $\mu\text{M}$  Cytb5-R (D) recorded in 100 mM Tris-HCl (pH 7.2). The absorption spectra of oxidized (solid black line) and reduced (dashed line) crARC, YcbX, Cytb5-1, and Cytb5-R are shown. Proteins were reduced with 2 mM dithionite. Recombinantly expressed proteins (10  $\mu\text{g}$ ) were separated on SDS-polyacrylamide gels and stained with Coomassie brilliant blue. An image of the gel with the positions of molecular mass markers (MM) (in kDa) is shown for each protein.



#### 1.2.4. The *in vitro* HAP reduction by crARC depends on Cytb5-1 and Cytb5-R

The *in vivo* experiments had shown that the HAP detoxification in *E. coli* by crARC plus Cytb5-1 or Cytb5-2 is CysJ dependent (Figure 1.4). To ascertain whether any of the two purified *Chlamydomonas* flavin reductases are involved in the reduction of HAP, we performed the following *in vitro* experiments. Since both reductases Cytb5-R and crCysJ are functional, we tested their capacity to donate electrons through Cytb5 to crARC for HAP reduction. As shown in Table 1.3, the *in vitro* HAP reduction by crARC was assayed using each of the two *Chlamydomonas* reductases plus each Cytb5. Interestingly, the only combination that was able to promote a significant HAP reduction was Cytb5-R with Cytb5-1 plus crARC. The other Cytb5 failed to do so even in the presence of 1 mM molybdate in the reaction mix (data not shown). Combining crCysJ with Cytb5-1 was able to promote HAP reduction but only at a minor amount, about 4% of the activity found with Cytb5-R.

**Table 1.3.** HAP reduction by the crARC system<sup>a</sup>.

Protein	Reduction of HAP <sup>b</sup> by:				
	Cytb5-1	Cytb5-2	Cytb5-3	Cytb5-4	Cytb5-5
<b>Cytb5-R</b>	4.9 ± 0.439	ND	ND	ND	ND
<b>crCysJ</b>	0.123 ± 0.063	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> The *in vitro* reduction of HAP was performed under the standard conditions: 100 pmol of crARC, 100 pmol of each Cytb5 and 10 pmol of Cytb5-R or crCysJ, 0.5 mM HAP, 1 mM NADH (with Cytb5-R) or 1 mM NADPH (with crCysJ) and 15 min of reaction time.

<sup>b</sup> Measured in milliunits per nmol of crARC. Data are means ± standard deviations from 3 independent experiments. ND, not detected.

The activity with crCysJ, although small, was significant and reproducible. This result explains the lack of reversion of HAP toxicity in the

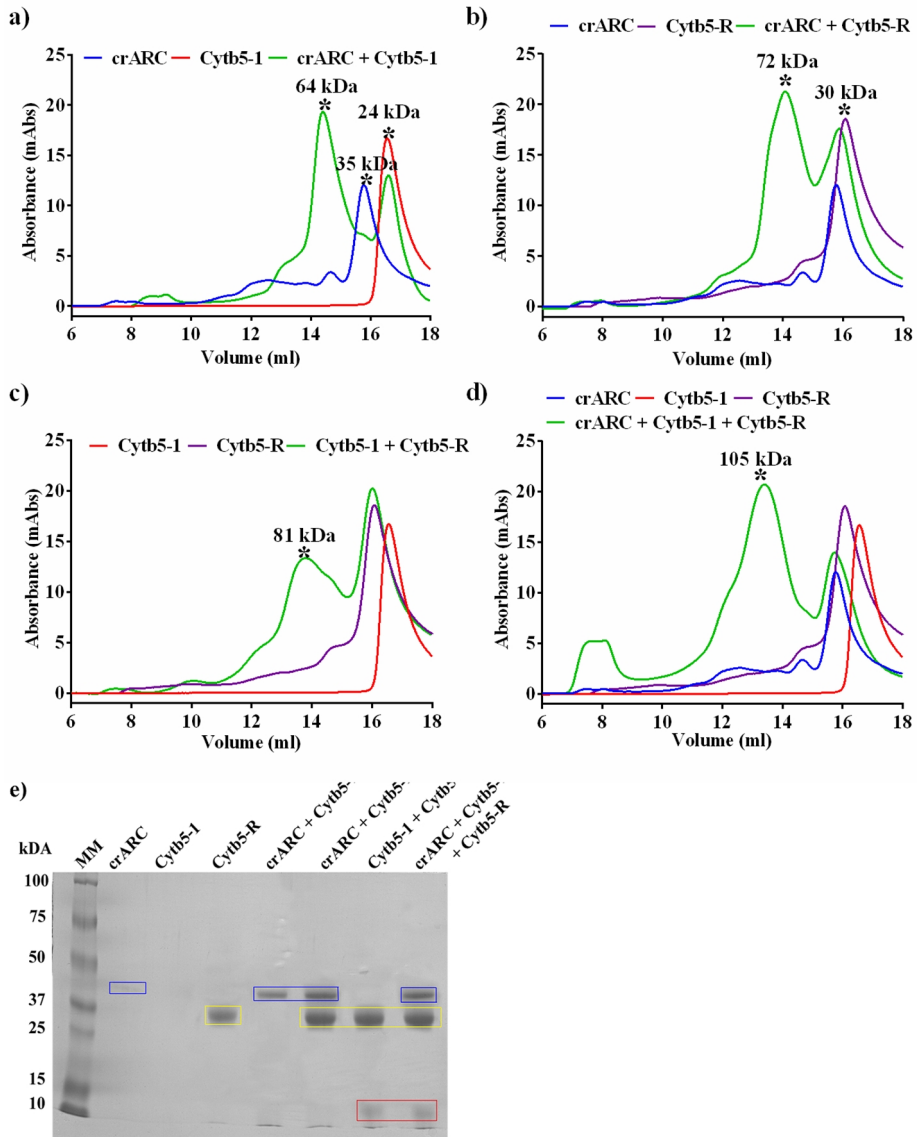
*E. coli cysJ* mutant after the *in vivo* expression of crARC and Cytb5-1 (Fig 1.4). As CysJ is homologous to crCysJ, it should be able to donate electrons to crARC plus Cytb5-1, at least *in vivo*, efficiently enough to revert the HAP toxicity.

These results indicate that in *Chlamydomonas*, the HAP reduction occurs by a three-component system consisting of Cytb5-R, Cytb5-1, and crARC. The Cytb5-2 was able *in vivo* (Fig 1.4) to revert HAP toxicity in medium with high molybdate, meanwhile *in vitro*, even with high molybdate (data not shown), Cytb5-2 was unable to promote HAP reduction. These results are interesting because they suggest that alternative reductases from crCysJ and Cytb5-R could be involved in the reduction of HAP using Cytb5-2 and crARC.

### **1.2.5. Protein interaction studies of crARC, Citb5-1 and Citb5-R**

As we have shown so far, ARC needs of other two proteins, cytochrome b5 and a cytochrome b5 reductase, to carry out their activity, However up to now, these protein interactions have not been studied. We have tried to measure the interaction by liquid chromatography with gel filtration columns. This method was chosen because a strong interaction is needed between the proteins involved to be maintained during the course of the gel filtration.

Before performing the column loading of these proteins together, they were preincubated 10 minutes in the loading buffer. After the pre-incubation, the proteins were loaded into the column and the main peaks obtained were collected. Different retention volumes, respect to the proteins load separately, would be expected in the case of any protein interactions. To this purpose the proteins (ARC + Cytb5-1 + Cytb5-R) were loaded separately and together under the same conditions. The chromatograms are shown in figure 1.7.



**Figure 1.7.** Studies of interaction between ARC, Cytb5-1 and Cytb5-R. The gel filtration profile of the indicated samples is shown. In these experiments the proteins were loaded separately and then together to see the appearance of new peaks. a) the ARC protein with Cytb5-1, b) the ARC protein with Cytb5-R, c) the Cytb5-1 protein with Cytb5-R, and finally d) the proteins ARC, Cytb5- 1 and Cytb5-R. The absorbance is measured at 280 nm. The separation by size was performed in a gel filtration column Superdex 200 (26 ml). e) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of protein peak fractions obtained in the gel filtration. In red Citb5-1, in yellow Cytb5-R

and in blue crARC. The fractions are indicated in the peak of a), b), c) and d) with the symbol \*.

Interactions among the proteins were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis of the peaks obtained (Figure 1.7.e).

With the retention volumes we calculated the molecular weight by comparing with a standard lane loaded with 6 different molecular weight protein markers under the same conditions.

The molecular weight of peak obtained in figure 1.7 are for crARC of 35kDa is equivalent to monomer (Figure 1.7.a), para Cytb5-1 of 24kDa is equivalent to dimer (Figure 1.7.a) and Cytb5-R of 30kDa is equivalent to monomer (Figure 1.7.b). Also we can see that the interactions have the next molecular weight: for crARC and Cytb5-1 is 64 kDa (Figure 1.7.a) that can be 1 crARC and 2 Cytb5-1, or 1crARC and 3 Cytb5-1, the next interaction is crARC and Cytb5-R that have a peak of interaction of 72kDa (Figure 1.7.b) that is equivalent to 1 crARC and 1 Cytb5-R, by the other hand, we have the interaction between Cytb5-1 and Cytb5-R that correspond to a peak of interaction with the molecular weight of 81kDa (Figure 1.7.c) that is equivalent to 1 of Cytb5-R and 4 Cytb5-1 or 2 of Cytb5-R and 2 Cytb5-1. At last, the interaction among three proteins has a peak with the molecular weight of 105kDa (Figure 1.7.d with symbol \*) that probably corresponds to 1 crARC, 2 Cytb5-1 and 1 Cytb5-R. The more probable interaction is 1:2:1. On the other hand, the interactions shows an elution volume smaller than the proteins separately. The interaction between crARC and Cytb5-1 might have a stoichiometric of 1 crARC and 2 Cytb5-1, the interaction crARC and Cytb5-R can be 1:1, the interaction Cytb5-1 and Cytb5-R can be 4 Cytb5-1 and 2 Cytb5-R.

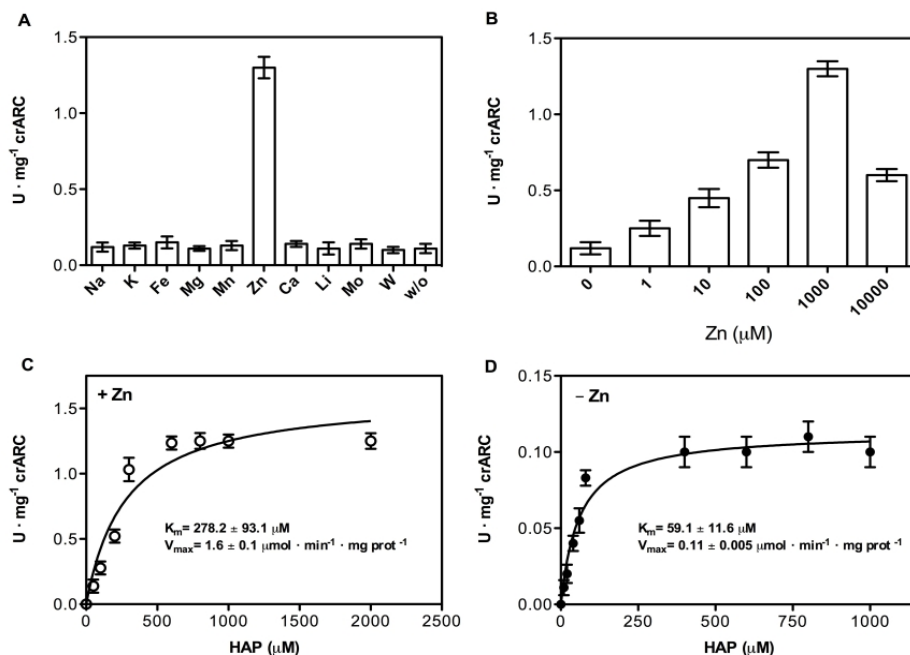
We measured the ARC benzamidoxime reduction activity of peak of 105 kDa from three different enzyme preparations of different days and the

result was  $0.547 \pm 0,082$  mU/nmol protein. The benzamidoxime reduction activity of ARC+Cytb5-1+Cytb5-R without loading in column was comparable to the one obtained in the peak of 105 kDa, the result of this control was  $0.861 \pm 0,129$  mU/nmol protein. This data indicates that the complex formed between the ARC+Cytb5-1+Cytb5-R is stable even after a gel filtration process and retains its enzymatic activity.

### 1.2.6. The crARC system has a Zn-dependent activity

After determining that Cytb5-R is the main reductase that with Cytb5-1 and crARC can reduce HAP, the effects of different metals in the reaction mixture were also studied. The standard reduction of HAP was performed but in the presence of 1 mM concentrations of the different metals listed in Figure 1.8.A. The results were surprising; Zn caused 10-fold increases in activity in contrast to all other metals tested. The optimal Zn concentration was 1 mM, but even 10  $\mu$ M increased the reaction rate 3 times; higher Zn concentrations were worse than the optimal but they still caused a positive effect (Figure 1.8.B).

The kinetic parameters of HAP reduction with Zn or without Zn were determined. The HAP reduction followed a Michaelis-Menten kinetics independent of the presence of Zn (Figure 1.8.C and D). The kinetic parameters for the reduction of HAP with and without Zn were as follows: with Zn,  $K_m$  of 278  $\mu$ M and  $V_{max}$  of  $1.60 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg crARC}^{-1}$ ; without Zn,  $K_m$  of 59  $\mu$ M and  $V_{max}$  of  $0.11 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg crARC}^{-1}$ . Regarding the  $K_m$  values, the substrate specificity for HAP was higher without Zn than with it. However, the  $V_{max}$  was 14.4 times higher with Zn than without it, so it seems that Zn increases the crARC capacity to reduce HAP. We measured the Zn content of crARC, hmARCs, and YcbX by ICP-OES, but we did not detect any Zn joined to these proteins (data not shown).



**Figure 1.8.** The crARC system has a Zn-dependent activity. (A) HAP reduction by crARC, Cytb5-1, and Cytb5-R under standard conditions with 1 mM NaCl (Na), KCl (K), FeCl<sub>3</sub> (Fe), MnCl<sub>2</sub> (Mn), MgCl<sub>2</sub> (Mg), ZnCl<sub>2</sub> (Zn), CaCl<sub>2</sub> (Ca), LiCl (Li), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (Mo), and Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> (W) or without metals (w/o). (B) Same as panel A but with the indicated amounts of Zn. (C and D) Reaction rates of HAP reduction with 1 mM Zn (C) and without Zn (D). The curves in panels C and D were calculated from the Michaelis-Menten equation fitted to the data points. Error bars were derived from triplicate measurements.

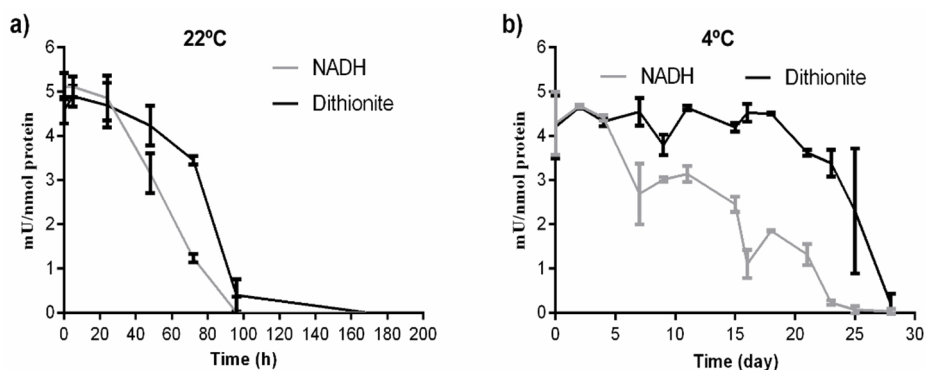
This indicates that these recombinant proteins are expressed and purified without Zn, which might explain the need to add Zn to increase the crARC HAP reduction rate over 14 times.

### 1.2.7. The crARC stability with the time and with the temperature

Human mARCs was shown to donate Moco to Moco deficient NR (Havemeyer et al., 2006) suggesting that ARC may be a Moco storage protein to molybdoenzymes of the sulfite oxidase family. Accordingly, we have also studied the ability of crARC to act as a Moco storage protein, by analysing

the stability of Moco in the ARC protein over time. ARC activity was determined by two ways, either with dithionite or with Cytb5-1, Cytb5-R, NADH and Zn. The stability of the protein was measured at different temperatures. At 22 ° C (Figure 1.9.a) the ARC activity using NADH disappears but after 96 hours of incubation and with dithionite disappears but after 168 hours. This means that the crARC stability at 22 ° C is quite high, since its activity takes long time to disappear.

At 4 ° C (Figure 1.9.b) the ARC activity with NADH disappears after 23 days of incubation and using dithionite disappears but after 28 days.



**Figure 1.9.** The ARC stability. ARC protein was incubated at a) 22°C or at b) 4°C for the indicated times and then the activity was assayed using either dithionite or Cytb5-1, Cytb5-R, NADH, benzamidoxime and Zn.

This data indicated that crARC first loses part of its native structure involved in the interaction with cytochromes b5-1, faster than that related to the Moco binding because the last activity to disappear is the one assayed with dithionite that is Moco dependent. As a conclusion, the crARC protein is a very stable protein that do not lose the Moco bound easily. This result can be explained from the fact that the activity with NADH involves proteins that have to interact with crARC (NADH gives electrons to Cytb5-R, this in turn

to Cytb5-1, and Cytb5-1 to crARC protein that in turn transfers them to Moco) in contrast to the activity with dithionite, which gives electrons directly to Moco.

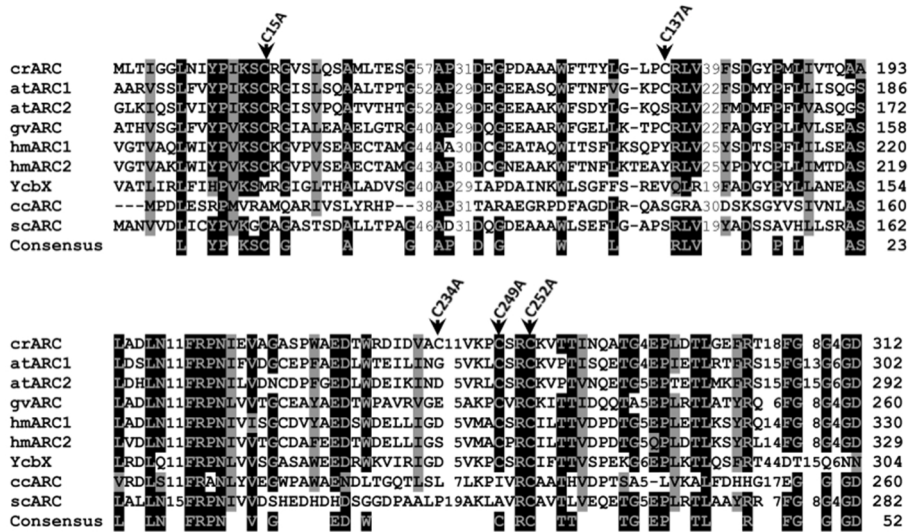
### **1.2.8. A fully conserved cysteine is essential for crARC activity**

From all cysteines in ARC orthologous proteins, only one is fully conserved (Anantharaman and Aravind, 2002), that corresponds to cysteine 252 (C252) in crARC (Figure 1.10). The 5 cysteines found in crARC were mutated to alanine. The procedure used for the mutant construction is explained in material and methods. To find out whether the overall tertiary structure of the mutants had changed with respect to the wild type, we performed a fluorescence spectroscopy study. As crARC has 10 tryptophan residues distributed along its sequence, if any mutation affected the folding of the protein, its fluorescence spectrum would be altered. We did not find any significant change in the fluorescence spectra in the mutants (data not shown). Therefore, it is unlikely that these cysteine-to-alanine changes significantly affected the folding of the proteins.

The HAP reduction activity was determined for each cysteine mutant with Zn and without Zn. None of them showed a HAP reduction rate different from the wild type, with the exceptions of the C252A mutant and the C249A C252A double mutant that totally abolished HAP reduction activity with and without Zn (Figure 1.11A).

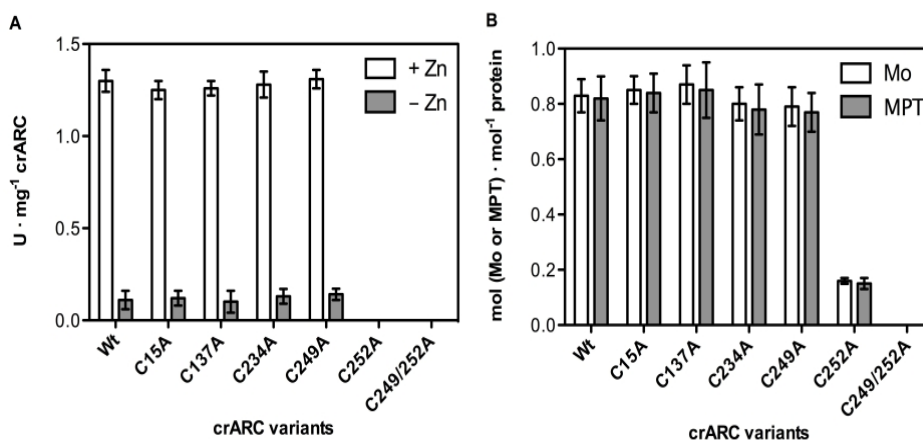
The crARC and its mutants were subjected to FormA analysis, which allows the quantification of the organic motif of Moco (MPT) bound to the protein, and to ICP-OES to measure the Mo content. In all of the crARC mutants, the Mo and MPT contents were similar to those of the wild type except in the C252A mutant and C249A C252A double mutant that had lost 80% and 100% bound Mo and MPT, respectively (Figure 1.11B).





**Figure 1.10.** Multiple-sequence alignment of ARC proteins. The sequences and accession numbers (shown in parentheses) (GenPept accession numbers begin with XP and NP; others are proteins deduced from GenBank sequences) are as follows: crARC, *Chlamydomonas reinhardtii* ARC (XP\_001694549); atARC1, *Arabidopsis thaliana* ARC1 (NP\_174376); atARC2, *Arabidopsis thaliana* ARC2 (NP\_199285); hmARC1, human ARC1(*Homo sapiens*) (NP\_073583); hmARC2, human ARC2 (NP\_060368); YcbX, *Escherichia coli* YcbX (NP\_415467); ccARC, *Caulobacter crescentus* ARC (AAK22857); scARC, *Streptomyces coelicolor* A3 ARC (CAC04053); and gvARC, *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 ARC (NP\_926027). The positions of the mutated cysteine to alanine in crARC are indicated by the black arrowheads. For other details, see the legend to figure 1.5.

These data indicate that the C252 is essential for the binding of Moco to crARC and that the HAP reduction activity depends on the presence of Moco. Interestingly, the neighboring C249 should be also mutated together with the C252 to fully abolish the Moco binding. These data can be explained by assuming that the close residue C249 is able to replace partially the function of the C252 at least with respect to Moco binding. However, since HAP reduction activity of the C252A mutants is zero, this residual Moco binding (20%) is inappropriate to promote a productive HAP reduction. This is the first evidence showing that the fully conserved cysteine in an ARC protein is essential for both Moco binding and catalysis.



**Figure 1.11.** HAP reduction and Moco contents of crARC and their mutants. (A) HAP reduction by crARC and their mutants with Cytb5-1 and Cytb5-R under standard conditions with Zn (+Zn) or without Zn (- Zn). (B) Mo and MPT contents of crARC and their mutants measured by ICP-OES and FormA, respectively. Wt, wild type crARC; single mutants at the indicated cysteine, C249A C252A double mutant.

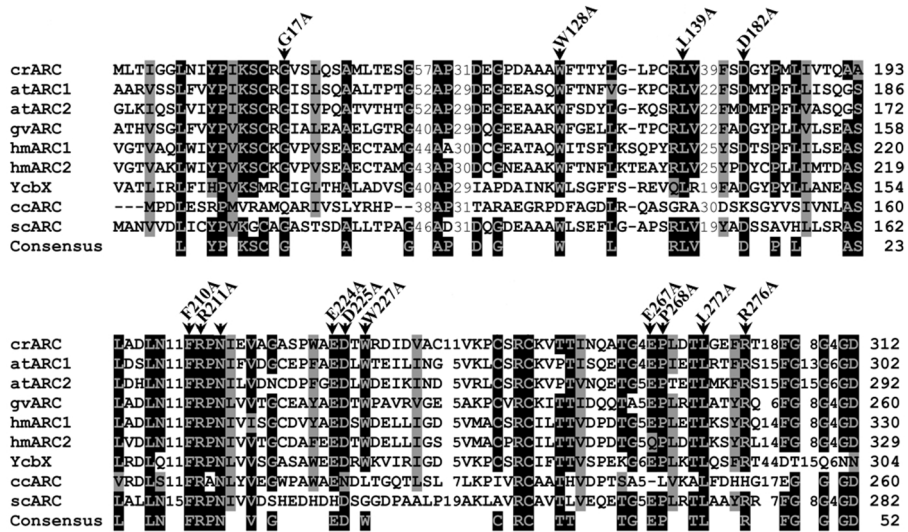
### 1.2.9. The study of different crARC mutants.

crARC point mutants in different conserved aminoacids (Figure 1.12) were constructed. We obtained 14 different mutants (Figure 1.12).

To find out whether the overall tertiary structure of the mutants had changed in respect to the wild type the fluorescence spectrum of aromatic aminoacids of those proteins were compared respect to the wild type (Figure 1.13). The maximum fluorescence has to be the same as crARC wild type, and the spectrum cannot have different shoulders of crARC wild type. After the analysis 9 mutants had a 3D structure similar to the wild type protein (Figure 1.15), where the rejected mutants are the N213A, D225A, W227A, P268A and L272A. These mutants are rejected because of the fluorescence analyses, and the mutant P268A was rejected because of a bad purification of this protein.

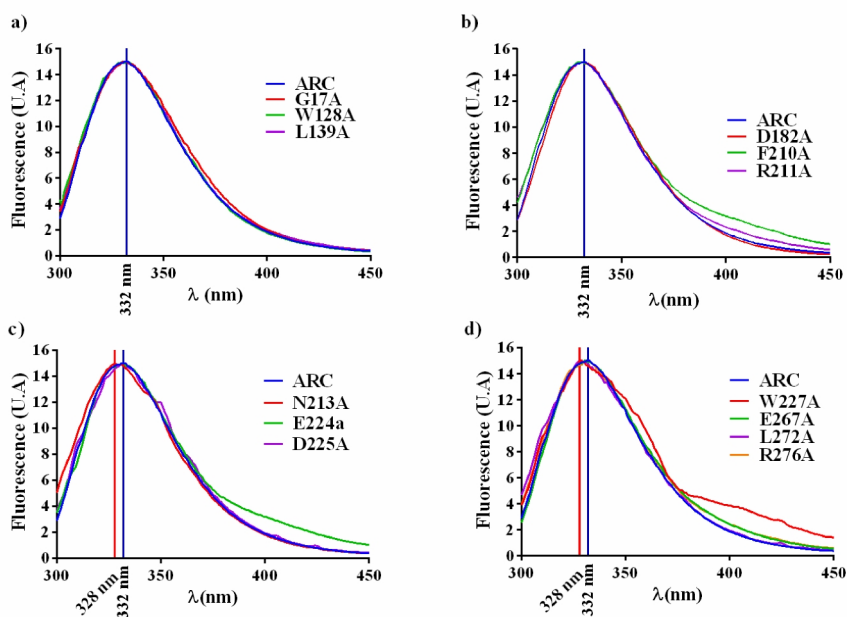
With the fluorescence analyses, we could see the fluorescence of the tryptophan aminoacids that indicated us the ambient of these aminoacids with

respect to wild type proteins. In the mutants G17A, W128A, L139A, F210A, R211A, E224A, E267A and R276A the fluorescence spectra is the same as the wild protein crARC, but in the mutants N213A, D225A, W227A and L272A have differences with ARC, as the maximum peak appearing at different wavelength and the presence of shoulders in spectrum (Figure 1.13).



**Figure 1.12.** Multiple-sequence alignment of ARC proteins. The sequences and accession numbers (shown into parentheses) (GenPept accession numbers begin with XP and NP; others are proteins deduced from GenBank sequences) are as follows: crARC, *Chlamydomonas reinhardtii* ARC (XP\_001694549); atARC1, *Arabidopsis thaliana* ARC1 (NP\_174376); atARC2, *Arabidopsis thaliana* ARC2 (NP\_199285); hmARC1, human ARC1(*Homo sapiens*) (NP\_073583); hmARC2, human ARC2 (NP\_060368); YcbX, *Escherichia coli* YcbX (NP\_415467); ccARC, *Caulobacter crescentus* ARC (AAK22857); scARC, *Streptomyces coelicolor* A3 ARC (CAC04053); and gvARC, *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 ARC (NP\_926027). The positions of residues mutated to alanine in crARC are indicated by the black arrowheads. The consensus sequences have been calculated with a threshold of 75% with the BioEdit v.7.0.9 program.

We went through an *in silico* predicted structure of crARC (Figure 1.14) to locate the positions of these 14 residues.



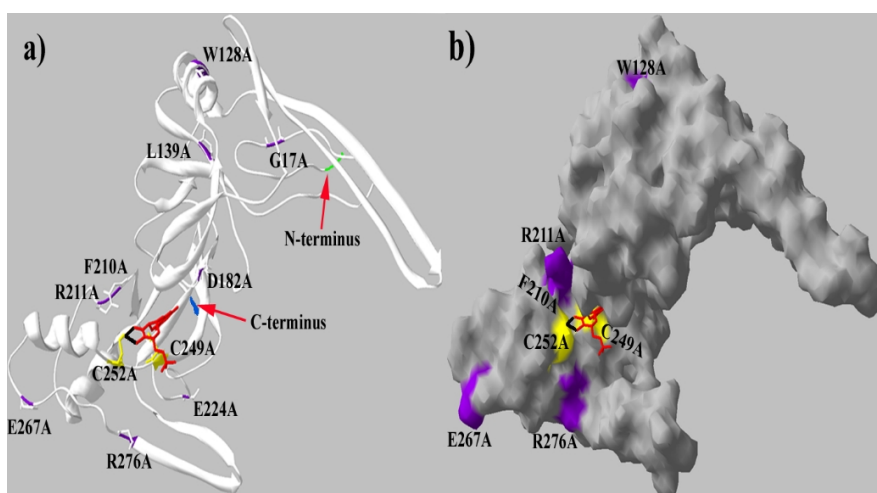
**Figure 1.13.** Fluorescence spectrum of the 13 crARC mutants. a) mutants G17A (red), W128A (green) and L139A (purple) respect to wild ARC (blue), b) D182A (red), F210A (green) and R211A (purple) respect to ARC (blue), c) N213A (red), E224A (green) and D225A (purple) respect to ARC (blue) and d) W227A (red), E267A (green), L272A (purple) and R276A (orange) respect to ARC (blue).

The next step was to measure the reduction activity of HAP to Adenine of these mutants with dithionite and with Cytb5-1/Cytb5-R/NADH (with and without Zn), the results are shown in figure 1.15.

The results of these experiments show that in the mutants D182A, F210A and R276A have almost not crARC activity. This maybe for a Moco deficiency or for an incorrect Moco binding. On the other hand, we measured the crARC activity with Cytb5-1/Cytb5-R with or without Zn. In all the mutants tested with or without Zn its activities were less than the wild-type except for G17A. Also in those mutants with crARC activity, its activity was higher with Zn than without. The E267A, E224A, R211A, L139A and

W128A have a crARC activity with dithionite comparable to the wild type, but with Zn the crARC activity was low comparing to the wild type. The activity with or without Zn was the same in the wild type and in G17A.

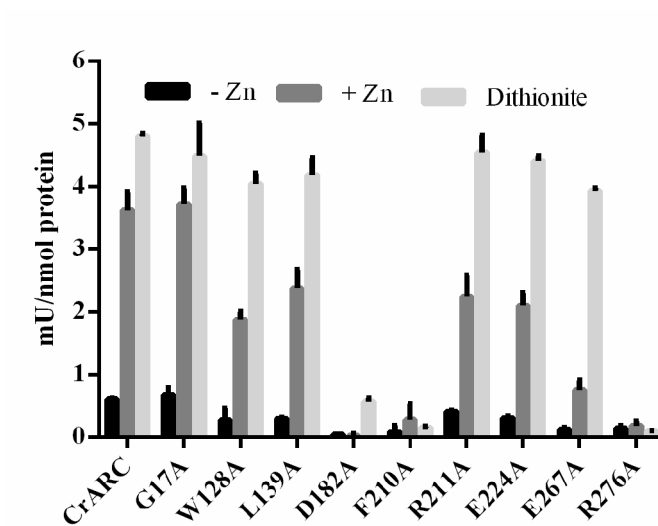
The amount of Moco was measured by the the FormA method in the crARC mutants. The mutants G17A, W128A, L139A, D182A, R211A, E224A, E267A and R276A showed the same Moco content as the wild type. However, the W128A, L139A, E224A, E267A and R276A variants showed less crARC activity than the wild type.



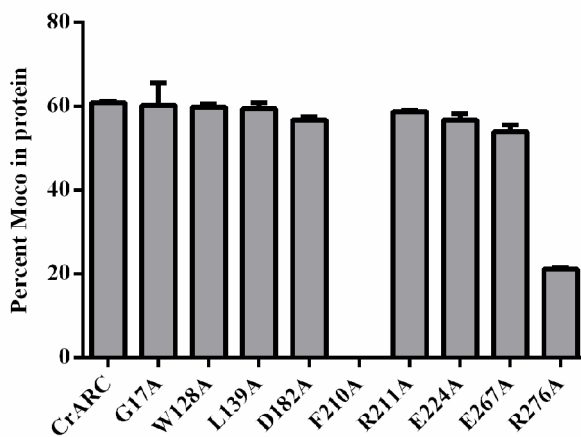
**Figure 1.14.** Predicted In silico crARC protein structure with Swiss-PdbViewer and Swiss-model program. The N terminus is in green, and the C terminus in blue, the MPT is in red, in black the Molybdate, in yellow the cysteines 249 and 252 connecting the Moco and in purple the mutated residues. **a)** secondary structure and **b)** protein surface.

These amino acids maybe involved in the interaction between crARC with Cytb5-1 and Cytb5-R necessary for the activity with NADH. However the F210A mutant did not have Moco, this maybe the reason of its no crARC activity The phenilalanine 210 should be very important in the active center of the protein for a proper Moco binding. Interestingly, the mutants D182A and

R276A have Moco but do not have crARC activity (Figure 1.15 and Figure 1.16).

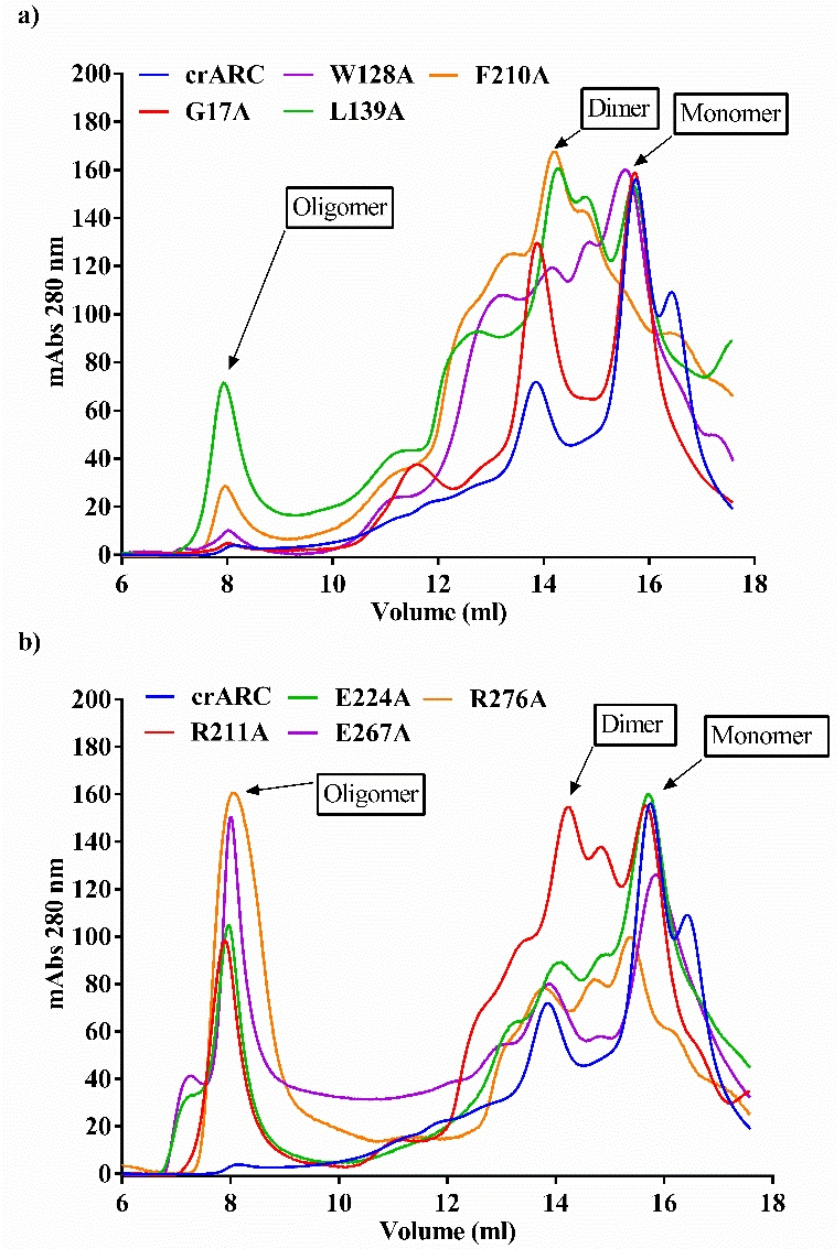


**Figure 1.15.** HAP reduction activity by crARC wild-type and mutants. ARC activity was determined with Dithionite and with Cytb5-1/Cytb5-R with Zinc (+Zn) and without Zn (-Zn).



**Figure 1.16.** The Moco content in the isolated mutants. We measured this Moco by the FormA in HPLC with fluorescence detector.





**Figure 1.17.** The behavior of ARC mutants. The gel filtration profile of the indicated samples is indicated. This study was conducted by chromatography in a molecular exclusion column loading the wild and mutants separately. In a), the chromatograms of G17A, W128A, L139A and F210A with respect to the wild protein are shown. In b), the chromatograms of R211A, E224A, E267A and R276A with respect to the wild ARC protein. The D182A mutant was not loaded in gel, because we did not obtain enough protein to load in its purifications.

This may indicate that the aminoacids D182 and R276 are also important in the active site, but not in the Moco binding, these aminoacids maybe involved in a proper Moco accommodation in the crARC active center.

To follow the study of the crARC varians will be interesting to know if they behave as a monomer, dimer or some other form of complex. Therefore the wild type and the different crARC mutants were studied by chromatography loading them in a gel filtration column (Figure 1.17).

As shown by the data, the wild type crARC protein mostly behaves as a monomer. The G17A mutant looks very similar to the wild protein but has a greater amount of dimer and less amount of monomer respect to the wild type. The mutant F210A shows almost all the ARC protein as a dimer, whereas the mutant R211A has dimer, monomer and an increased amount of oligomer forms. Moreover, the mutant E224A shows increased amounts of monomeric forms therefore decreasing the dimer. The mutant E267A ARC is mostly monomer. Finally the mutant R276A forms an oligomer.

This result indicated that the residues G17 and R211 are involved in the stabilization of the monomer since its change to alanine create a greater amount of crARC dimers (Figure 1.17.a), and the residues E224 and R276 are involved in the formation of oligomers since its change to alanine increases the amount of crARC oligomer (Figure 1.17.b). Also with this data suggest that there is not a clear relation between the oligomeric form (monomer, dimer, oligomer) and the crARC activity. Since mutants with different behaviour as wild type and G17A are either mainly a monomer or a dimer, respectively.

On view of these results, we can propose that ARC protein degradation begins by the C-terminal part. The mutants in this C-terminus show an



increased protein aggregation, which also appears in the wild ARC protein with time (data not shown) (Klein et al., 2012).

Another fact supporting this proposal is the loss of its activity from NADH with time, still maintaining the activity with dithionite, by the other hand the E267A mutant has activity with dithionite but not with NADH, while the mutants G17A, W128A, L139A, R211A and E224A have dithionite activity and more NADH activity than E267A. This suggests that the interaction site with Cytb5-1 and Cytb5-R is in the C-terminal part of ARC.





## **Discussion of Chapter I**



### 1.3. Discussion

The ARC (amidoxime reducing component) protein is a new molybdenum cofactor containing enzyme involved in the reduction of N-hydroxylated compounds (Havemeyer et al., 2006) (Figure 1.1). Proteins of this family are distributed throughout the three kingdoms of living organisms and occur either as stand-alone forms or fused to other domains (Anantharaman and Aravind, 2002). However, the study of this protein in the plant kingdom had not been addressed, and this is the first study of this protein in a plant-like organism, the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

*Chlamydomonas reinhardtii* mutants defective in several Moco biosynthesis genes and sensitive to HAP (Figure 1.3) gave the first clue on the existence of a NHC-detoxification system. To investigate whether *Chlamydomonas* has a HAP reduction system related or not with the ARC proteins (Figure 1.1D), we have cloned, purified, and studied the *Chlamydomonas reinhardtii* ARC protein, crARC, the six *Chlamydomonas* ferredoxins (Fds), five *Chlamydomonas* Cytb5, and two *Chlamydomonas reinhardtii* flavin reductases (Cytb5-R and crCysJ), using the human ARCs (hmARCs) and YcbX proteins as controls for comparative experiments.

We were able to demonstrate by heterologous expression in *E. coli* that *in vivo* the detoxification of HAP by crARC is dependent on Cytb5-1, Cytb5-2, and CysJ, but independent of Fd. This means that in *Chlamydomonas reinhardtii*, the HAP reduction system is more related to the three-component Cytb5-dependent human system than to the two-component Fd-dependent bacterial system. The nature of this interaction indicates that CysJ has a broad spectrum of proteins with which it might interact and donate reducing equivalents; apart from its function in the sulfite reductase (Gruez et al., 2000) and YcbX (Kozmin et al., 2010), it can even donate reducing equivalents to Cytb5-1 and Cytb5-2 proteins at least when they are heterologously expressed

in *E. coli*. These facts raise the possibility of discovering other examples of redox carrier proteins functioning with multiple acceptor proteins.

Interestingly, crCysJ, which is homologous to CysJ, also promotes the reduction of HAP with crARC and Cytb5-1 but in a less extent (Table 1.3). This explains why *in vivo* CysJ is needed by crARC plus Cytb5-1 to detoxify HAP, because CysJ replaces the function of its homologous crCysJ.

*In vivo* Cytb5-2 also reverts the toxicity of HAP if high molybdate is added to the growth medium (Figure 1.4D), but this was not confirmed by the *in vitro* HAP reduction (Table 1.3). However, this result connects the HAP detoxification with the requirement of Moco for crARC activity. This means that there may be other reductases apart from Cytb5-R and crCysJ that are able to interact with Cytb5-2 and crARC in the reduction of HAP, or alternatively, the high molybdate concentration can alter the structure of one of these proteins, causing a conformational change needed for interactions. Future experiments are required to verify these hypotheses. The results obtained might explain the meaning of a three-component system, so that some of their members can be replaced by other proteins depending on cell demands.

The subcellular localization of ARC proteins is not well defined. Mammalian ARC proteins have been localized in the outer (Gruenewald et al., 2008) and inner (Da Cruz et al., 2003) mitochondrial membranes but also in the peroxisomal membranes (Islinger et al., 2007). We have studied crARC and its partners with different prediction programs to determine whether they have any peptide signals for subcellular compartmentalization. No predicted signals for organellar compartmentalization could be found in crARC. However, their two partners Cytb5-1 and Cytb5-R contain a hydrophobic membrane-anchoring domain in their C-terminal and N-terminal sequences, respectively. These data suggest that crARC probably exerts its actions in a

subcellular compartment. However, additional experiments will be needed to find the real subcellular localization.

Genomes of almost all eukaryotes that use molybdenum have two ARC proteins, with both showing strong similarities at the amino acid and nucleotide level. As there are some unsequenced regions in the *Chlamydomonas* genome (Merchant et al., 2007), the possibility of a second crARC protein cannot be excluded. In *Arabidopsis thaliana*, there are two homologous ARC proteins, *Arabidopsis thaliana* ARC1 (atARC1) and atARC2 (Figure 1.10) (Llamas et al., 2011). The atARC1 protein has a clear signal for chloroplast or mitochondrion export that is absent in the atARC2, so it seems that in *Arabidopsis*, the ARC proteins may exert its functions in different subcellular compartments. Interestingly, we have also found ARC ortholog proteins in cyanobacterial genomes (Figure 1.10), and as in *Chlamydomonas*, they lack the ferredoxin domain and there is only one ARC sequence per genome.

We have found that crARC has a Zn-dependent activity that with Cytb5-*l* and Cytb5-R efficiently reduces HAP. The kinetic parameters for the reduction of HAP by the crARC system showed that Zn increases the crARC capacity to reduce HAP though it also increases its  $K_m$ . However, the Michaelis-Menten equation fit much better the data points in the absence of Zn than in the presence of Zn. As it is a three-component system, a high number of protein interactions are required to complete the catalytic cycle, therefore a biphasic cooperative behavior cannot be discarded. The  $K_m$  of crARC for HAP was similar to those reported for other NHC substrates with heterologously expressed hmARC proteins, but the  $V_{max}$  of crARC with Zn was between 10 and 100 times higher (Wahl et al., 2010; Kotthaus et al., 2011). As Zn is not essential for crARC activity but drastically increases its  $V_{max}$ , we propose that a potential role of Zn could be related to increasing the capacity to eliminate the toxic NHC in the cell.



It is unknown which proteins of the crARC system requires Zn, although it could be related to increasing the proper binding between them to promote an efficient electron transfer reaction.

The  $V_{\max}$  for benzamidoxime when the hmARC proteins were purified from human mitochondria was  $12.2 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$  (Havemeyer et al., 2006). This  $V_{\max}$  is more than 350 and 40 times higher than those obtained for heterologously expressed hmARC1 and hmARC2, respectively, but only 7 times greater than crARC with Zn ( $V_{\max}$  of  $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg crARC}^{-1}$ ). These facts suggest that hmARCs purified from living mitochondria could have retained Zn bound. Therefore, the Zn dependent activity found with crARC could be a general feature for the other ARC proteins, though this should be confirmed by future experiments.

The interactions that occur among crARC, cyt $b_5$ -1 and cyt $b_5$ -R have been studied by gel filtration. We have identified a 105kDa protien complex in the chromatogram in figure 1.7.d, this complex corresponds to different stoichiometries. This stoichiometry 1:2:1, allows the passage of one eletron from NADH to each cytochrome  $b_5$ , then each heme would donate one electron in each step to the molybdenum cofactor.

All ARC proteins contain a fully conserved cysteine that could be considered part of their signature (Anantharaman and Aravind, 2002) (Figure 1.7). We have generated amino acid substitutions of each crARC cysteine to alanine. These substitutions had no effect on the Zn dependent activity apart from the absolutely conserved cysteine 252 (Figure 1.11A) that strongly affected Moco binding (Figure 1.11B). Interestingly, to fully abolish Moco binding to crARC, the neighboring C249 also has to be mutated. This means that the C249 in the absence of a functional C252 is able to bind Moco to some extent, but this binding is not appropriate for a proper enzyme catalysis.

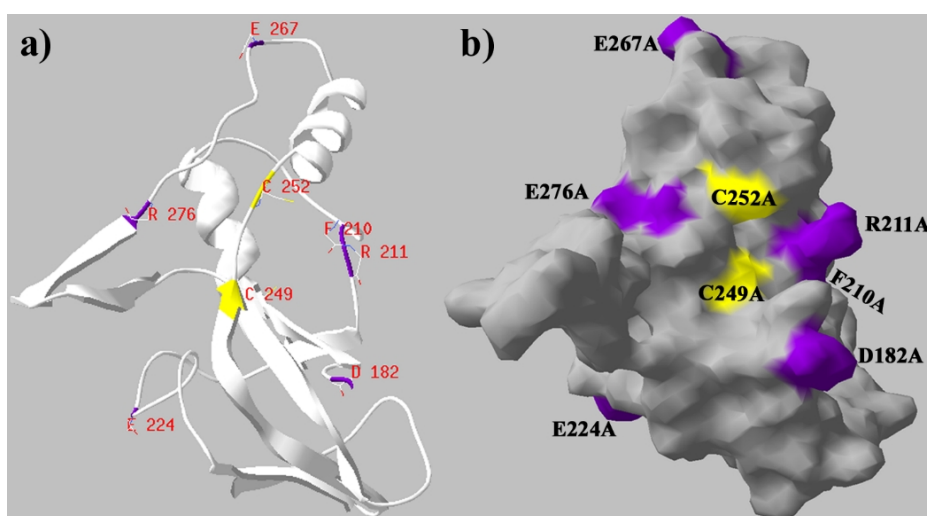
This is the first demonstration in an ARC protein that the fully conserved cysteine is involved in Moco chelation to the protein.

To identify important amino acids in the crARC structure and function, we purified a series of point mutants with a correct structure verified by fluorescence emission. The crARC activity of the mutants was measured with dithionite in each mutant and all of them, excepting D182A, R276A and F210A maintained the wild type activity (Figure 1.15). This gives us the clue that these amino acids could be localized near to molybdenum cofactor or to the active site. The D182A and R276A mutants have molybdenum cofactor but not ARC activity, so we can propose that these amino acids have an effect on the active center but not in the molybdenum cofactor binding. Moreover the F210A mutant has no molybdenum cofactor, which points to this phenylalanine as an important residue in the binding of molybdenum cofactor. Moreover all except G17A mutant had lower activity with NADH than the wild type crARC, suggesting that these mutations are related to the interaction with cytochrome b5 and cytochrome b5-R because in these mutants the activity with dithionite was similar to the wild type activity (Figure 1.6).

Those mutations also affected the protein aggregation. Mutations G17A to R211A favor the formation of dimers. However, mutations like E224A to R276A favor the increase of oligomer forms, which will be enhanced by the protein degradation as can be with the time the NADH activity or the mutant E267A with the loss of NADH activity that doesn't occur in mutants of the amine terminus. Thus we propose that degradation begins at carboxyl terminus. We can also conclude that the interaction with Cytb5-1 and Cytb5-R proteins is given by the carboxyl terminus because NADH-ARC is the first activity lost with time (Figure 1.7) in the mutant E267A, but not in the mutants in the amine terminus (Figure 1.15), and coincides with the formation of oligomers in the E224A until E267A mutants, that may difficult the

interaction with Cytb5-1 and Cytb5-R. While the D182A, F210A, R211A and R276A mutations appear related to the active center.

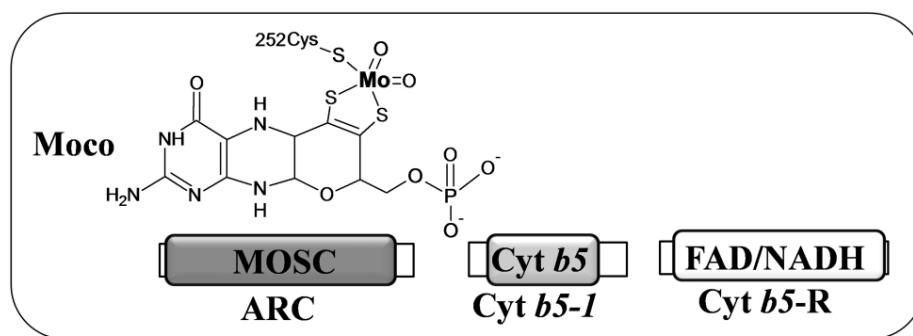
We can conclude from figure 1.18, and the mutants characterization that the residues D182, F210 and R211 are located close to the molybdenum cofactor and that the residues E224, E267 and R276 are located at the surface of the protein, to be able to interact with the cytochrome b5 and cytochrome-R (Figure 1.14).



**Figure 1.18.** Prediction of the structure of the active center of the protein crARC with Swiss-PdbViewer and Swiss-model program. In yellow, the cysteines 249 and 252 connecting the Moco, and in purple mutations we studied. **a)** secondary structure and **b)** protein surface.

Until now, the Mo coordination spheres of the ARC proteins were unknown (Figure 1.1A). In Moco proteins, Mo is chelated to two thiol groups of molybdopterin and also with two oxo groups. The fifth Mo ligand is the sulfur of a cysteine in the sulfite oxidase family or an inorganic sulfur in the xanthine oxidase family (Schwarz et al., 2009), and the exchange of this conserved cysteine to serine or to alanine completely abolishes the enzyme

function, as in the case of chicken sulfite oxidase (Qiu et al., 2010). We propose that the fully conserved ARC cysteine is indeed the putative fifth Mo ligand in the ARC proteins (Figure 1.19) and therefore, that the ARC proteins belong to the SO family of Moco proteins. Recently, Was characterized the hmARCs and found that they do not belong to the XO family, since cyanide treatment neither released sulfur nor significantly affected the activities (Wahl et al., 2010). In addition, by mutating each cysteine to serine, no difference in the activity of the hmARCs was found. It is possible that changing cysteine to serine, another polar amino acid and with a similar electronegative atom (S versus O), could have retained Mo chelation capacity and activity.



**Figure 1.19.** Scheme of the *Chlamydomonas* ARC system. The figure shows the structure of the Moco molecule. The Mo atom is shown in bold type, illustrating that the fifth Mo ligand in crARC is cysteine 252. The protein domains in the crARC system are shown in boxes (for more details, see figure 1.1, figure 1.2 and Discussion).

Concerning the physiological functions of ARC proteins, it appears likely that one function could be to prevent the accumulation of mutagenic base analogues in the cell as HAP (Kozmin et al., 2008) and *N*-hydroxycytosine (Wahl et al., 2010). The hmARC system is able to reduce *N*-hydroxysulfonamides, such as *N*-hydroxy-valdecoxib, which have considerable potential to treat a variety of disorders (Havemeyer et al., 2010). In addition, hmARC proteins have recently been suggested to act as regulators

for the L-arginine-dependent biosynthesis of nitric oxide (NO) by catalyzing the controlled elimination of the NO precursor N-hydroxy-L-arginine (NOHA) (Kotthaus et al., 2011). Whether ARC proteins are involved in physiological NOHA reduction and/or are capable of physiologically affecting NO levels has to be investigated in future experiments.

In conclusion, we have characterized for the first time the ARC system in a photosynthetic organism showing that in *Chlamydomonas* this system is more related to the human system than to the bacterial one. The crARC partners are Cytb5-*I* and Cytb5-*R*. The enzyme has a Zn-dependent activity that does increase its  $V_{max}$  more than 10 times. We propose that the fully conserved cysteine 252 of crARC is involved in Moco chelation (Figure 1.19). Therefore, the ARC protein would belong to the SO family of Moco enzymes.





**Chapter II: A dual system formed by the  
ARC and NR molybdoenzymes mediates  
nitrite-dependent NO production in  
*Chlamydomonas***





## **2. A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*.**

Nitric oxide (NO) is a relevant signal molecule involved in many plant processes. However, the mechanisms and proteins responsible for its synthesis are scarcely known. In most photosynthetic organisms, NO synthases have not been identified, and Nitrate Reductase (NR) has been proposed as the main enzymatic NO source, a process that *in vitro* can also be catalysed by other molybdoenzymes (Maia and Moura, 2015). By studying transcriptional regulation, enzymatic approaches, *in vitro* activity assays with purified proteins and *in vivo* and *in vitro* NO determinations, we have addressed the role of NR and ARC (Amidoxime Reducing Component) in the NO synthesis process. NR and ARC are intimately related both at transcriptional and activity level. Thus, *arc* mutants show high *NIA1* (NR gene) expression and NR activity. Conversely, mutants without NR activity displayed an increased *ARC* expression in nitrite medium. Our results with *nial1* and *arc* mutants and with purified enzymes support that ARC catalyses the NO production from nitrite taking electrons mainly from NR and not from Cytb5-1/Cytb5-Reductase, the component partners previously described for ARCs. This NR-ARC dual system would be able to produce NO from nitrite in the presence of nitrate, condition under which NR is unable to do it.

### **2.1 Introduction**

Nitric oxide (NO) is now considered to be an important signal molecule in many biological plant processes. Its role is relevant in plant growth, development, metabolism, abiotic stress, defence processes, plant-pathogen interaction and senescence (Corpas et al., 2004; de Montaigu et al., 2010; Arc et al., 2013; Agurla et al., 2014).

The search for a plant NOS, which would catalyze the NADPH-dependent oxidoreduction of arginine to NO and citruline, has been disappointing (Simontacchi et al., 2013). Nevertheless, a functional NOS with a high similarity to the human NOS, was found in the primitive unicellular alga *Ostreococcus tauri* (Foresi et al., 2010). However, sequenced genomes from plants and other algal species lack genes homologous to those of animal-type NOS.

A variety of several possible enzymes has been involved in NO biosynthesis in photosynthetic organisms (Gupta et al., 2011; Mur et al., 2013). Several of them have in common to be molybdenum enzymes. These molybdoenzymes have a Mo chelated by a tricyclic pyranopterin compound forming thus the so-called molybdenum cofactor (Moco) (Chamizo-Ampudia et al., 2013; Tejada-Jimenez et al., 2013). One of the most relevant enzymes involved in NO production appears to be the cytosolic Nitrate Reductase (NR), which is a multifunctional enzyme that catalyzes nitrate reduction to nitrite in the nitrogen assimilation pathway (Fernandez and Galvan, 2008) and is able to support other activities working as electron source through its diaphorase activity ( $\text{NAD(P)H} \rightarrow \text{NR} \rightarrow \text{electron acceptors}$ ) (Sanz-Luque et al., 2015). Additionally, nitrite is also a substrate of NR to produce NO *in vitro* (Dean and Harper, 1988; Yamasaki and Sakihama, 2000; Rockel et al., 2002; Sakihama et al., 2002). The other molybdoenzymes, which like NR are also able, under certain conditions, to produce NO from nitrite are: sulfite oxidase (Wang et al., 2014), xanthine oxidoreductase (Gupta et al., 2011; Cantu-Medellin and Kelley, 2013) and aldehyde oxidoreductase (Li et al., 2009). In addition to the above-mentioned enzymes a fifth recently reported molybdoenzyme has been involved in NO synthesis. This enzyme, called **ARC** (**A**midoxime **R**educing **C**omponent) has been described in prokaryotic and eukaryotic organisms (Havemeyer et al., 2006; Kozmin et al., 2008; Chamizo-Ampudia et al., 2011). ARC proteins were identified initially because of their capability of converting *in vitro* several amidoximes prodrugs

into their active amino forms. Humans have two ARC proteins associated to the outer mitochondrial membrane (hmARC1 and hmARC2) taking part in a three-components system consisting on the ARC enzyme, cytochrome *b<sub>5</sub>* and NADH cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase (Havemeyer et al., 2006). This complex has been called as **ARCO (Amidoxime Reducing COmplex)** (Tejada-Jimenez et al., 2013). The functionality of ARCO was also demonstrated in the model alga *Chlamydomonas*, showing that it also consists on the Moco-enzyme crARC, cytochrome *b<sub>5</sub>*-1 and NADH cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase similarly to its human counterpart. In *Chlamydomonas* and bacteria ARCO is able to reduce the base analogue 6N-Hydroxy Amino Purine (HAP) to adenine (Kozmin et al., 2008; Chamizo-Ampudia et al., 2011). Therefore a role in preventing the accumulation of mutagenic base analogues in the cell was proposed. Notwithstanding, the physiological role of ARCO is unknown at present. Studies *in vitro* have recently shown that both human and plant ARC are able to catalyze the reduction of nitrite to NO (Sparacino-Watkins et al., 2014; Yang et al., 2015).

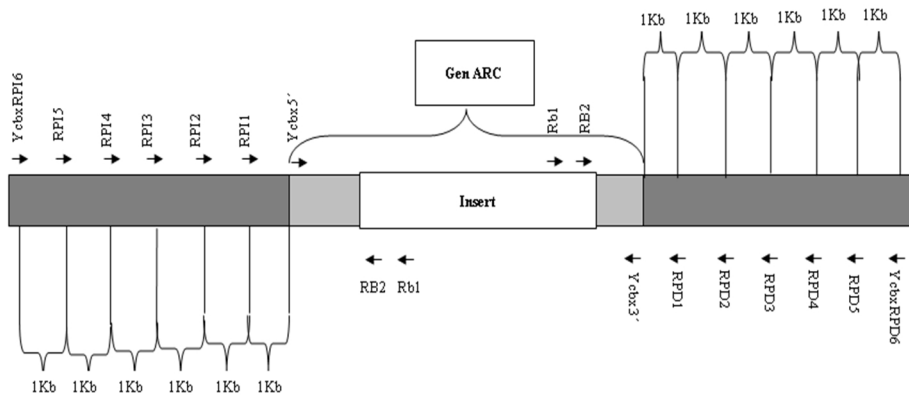
In this work, we show that NR is unable to produce NO *in vitro* from nitrite when nitrate is present in the medium. However, under that physiological condition, ARC catalyses NO production by a reductive process from nitrite using NAD(P)H-NR as electrons source through its diaphorase activity. Furthermore, we report a close connection between ARC and NR gene expression that supports that both proteins work together in the production of NO, which seems to be the main ARC function.

## **2.2. Results**

### **2.2.1. The search of ARC deletion/ insertional mutants.**

With the purpose of studying the physiological function of ARC we need to have an ARC mutant. The first strategy used to isolate a mutant in the ARC gene was the screening of the mutant library previously constructed by

PCR using reverse genetics. This technique has been previously used successfully to identify mutants of *Chlamydomonas* in specific genes (González-Ballester et al., 2005a). It is based on PCR amplification of a chimeric DNA fragment between the marker used to build the collection of mutants and the gene of interest. This technique has its limitations because to be successful it is needed: 1) a fully saturated mutant library, that is to say, that each of the genes in the *Chlamydomonas* genome is labeled, and 2) that the label disrupts the gene without producing large deletions (Galván et al., 2007). In our case, to identify ARC mutants, we designed 14 specific primers for ARC (6 forward primers, YcbxRPD, and 6 reverse, YcbxRPI) and 2 that anchor into the reading frame (Ycbx5 and Ycbx3), which are at 1kb from each other in the genome covering the genomic region of ARC and outside (Figure 2.1); these were combined with RB2 and primers designed at both ends of PBKLB1 marker (Table M.10.).



**Figure 2.1.** Schematic primers localization in the ARC gene region. Insert is a fragment of the transformación plasmid (PBKLB1). Light gray is the ARC gene. Dark gray is the area around the ARC gene. The arrows represent the direction of each of the primers used to amplify.

As template for PCR reactions, genomic DNA isolated from cultures of a 96 different mutants group was used. These preparations were grouped in

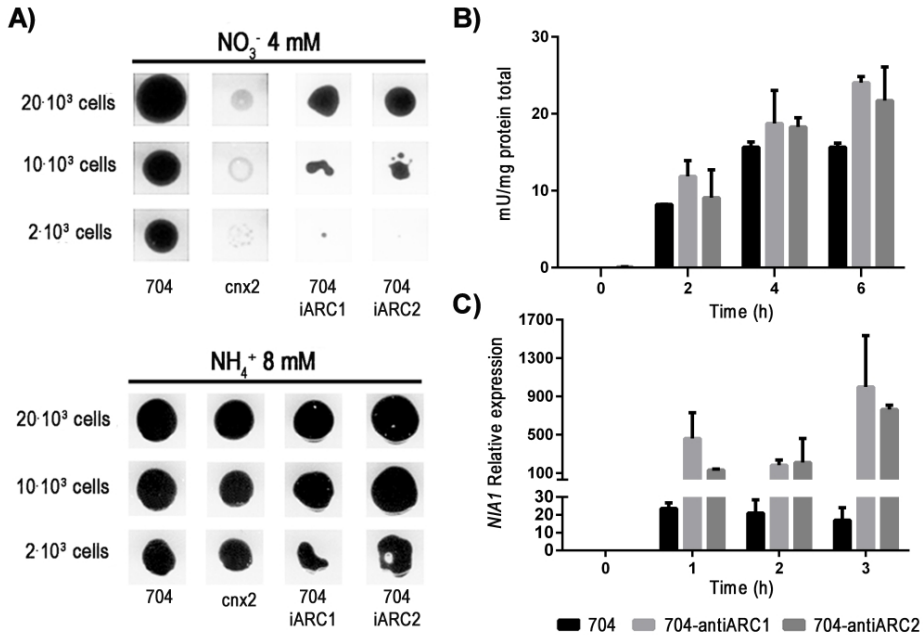
turn into 10 "super-groups", each supergroup contained in average representative DNAs of 960 different mutants. Thus, the scrutiny of the entire collection is done in just 22 PCR reactions for each primer pair used. Several DNA fragments were obtained using the battery of primers described above, but after its sequencing it was found that none of them corresponded to any insertion in the ARC gene.

There are several reasons that could explain the failure to find an ARC insertional mutant in the *Chlamydomonas* mutant library. One reason maybe the loss of the genomic DNA during the integration of the DNA marker in the *Chlamydomonas* genome. Although clean insertions may occur, most often they are DNA deletions with an average size of 5 kb, but it may reach 20 or 30 kb (González-Ballester et al., 2005a).

### **2.2.2. The *NIA1* and *ARC* expression is similar.**

As the first strategy chosen to find an ARC insertional mutant failed, an ARC mutant strain was constructed by using the artificial miRNAs technique (Molnar et al., 2009). We obtained two of them that were called 704-antiARC1 and 704-antiARC2, these mutants expressed 23% and 27% of ARC transcript, respectively. We have also used the knockdown mutant *cnx2* that carries a deletion affecting the *CNX2* gene and so it is unable to synthesize Moco, which is essential for NR and ARC activities. All these mutants were obtained from the parental strain 704, which we used as the wild-type strain.

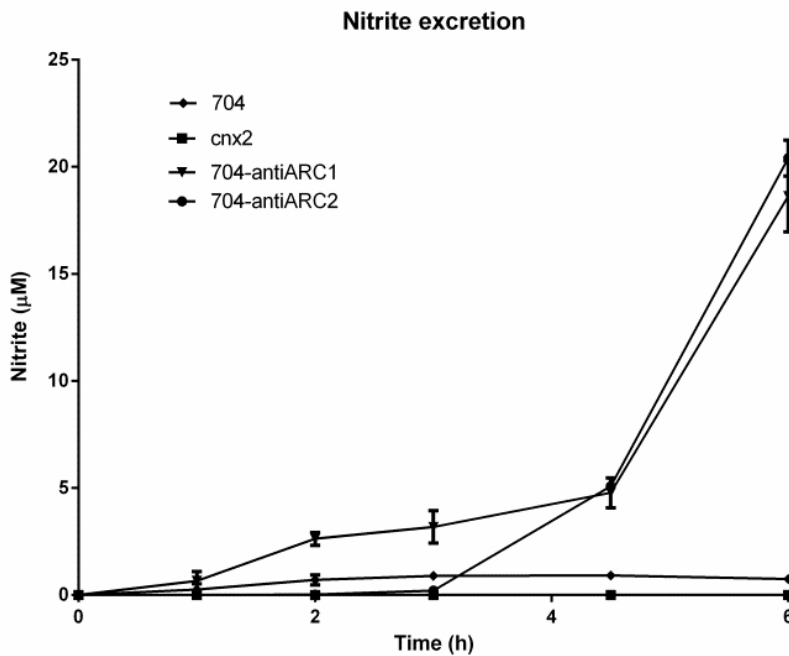
The growth of 704-antiARC1 and 704-antiARC2 was impaired in nitrate but not in ammonium medium (Figure 2.2.A), suggesting a connection between ARC functionality and nitrate assimilation. We measured the NR activity, one of the key enzymes for nitrate assimilation, in these strains. Interestingly, both mutants showed higher NR activity than the wild type 704 (Figure 2.2.B). This high NR activity was supported by a higher *NIA1* expression in nitrite medium (Figure 2.2.C).



**Figure 2.2.** The growth, the NR activity and *NIA1* transcript in the ARC mutants. **a)** Growth test in nitrate 4mM and ammonium 8mM in TAP plates, of 704, *cnx2*, 704-antiARC1 and 704-antiARC2 with different concentrations of cells. The cells were grown under continuous light at 23 °C for 5 days. **b)** Nitrate Reductase activity in wild-type (704) and in the 704-antiARC1 and 704-antiARC2 strains. The NR activity was measured as indicated in methods. **c)** Regulation of *NIA1* transcription in response to nitrite (2 mM) in wild type (704) and in 704-antiARC1 and 704-antiARC2 strains. The value 1 was assigned to the expression level of the internal standard gene ubiquitin-ligase in each condition. Error bars indicate the standard deviation of three technical and biological replicates.

Afterwards, we can expect that an increased NR activity would produce a toxic nitrite accumulation inside the cell and toxic effects can be partially avoided by excreting the overproduced nitrite. As expected, when 704-antiARC1 and 704-antiARC2 were grown in nitrate medium, nitrite at high concentration was excreted to the medium (Figure 2.3). To discard that this excretion in the mutants was due to an imbalance caused by a diminished Nitrite Reductase (NiR), this activity was assayed. NiR activity was similar in

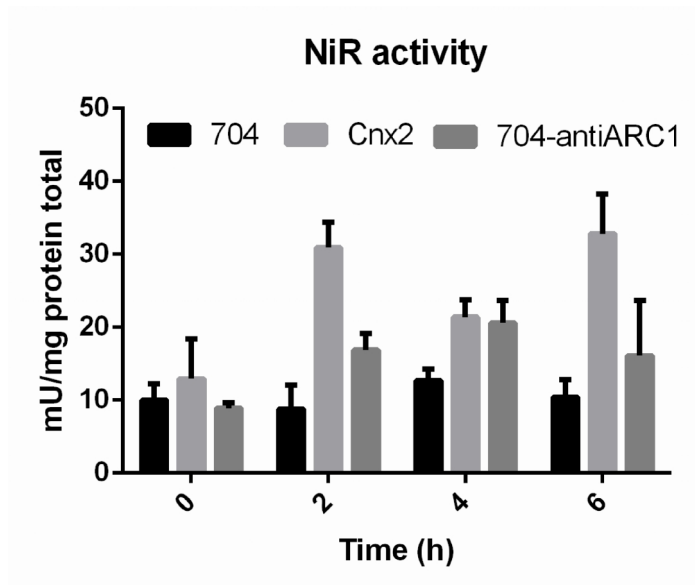
704 and in 704-antiARC1, however the NiR activity in the mutant *cnx2* was higher than in the wild type (Figure 2.4), which is in agreement with the increased activity of nitrate/nitrite assimilating enzymes in mutants lacking NR activity (Fernandez and Cardenas, 1982a; Navarro et al., 2000). These data highlight that the nitrite overproduction was not due to a NiR inhibition in the antisense mutants. Furthermore, nitrite excretion was very reduced in 704 and inexistent in the molybdenum cofactor mutant *cnx2* that lacks both NR and ARC activities. Thus, nitrite overproduction results from an active NR and an inhibited ARC. This could be the reason that affects the growth of 704-antiARC1 and 704-antiARC2 mutants in nitrate medium (Figure 2.2.A).



**Figure 2.3.** Nitrite excretion activity. Nitrite was determined in wild-type (704), *cnx2* and ARC antisense mutant (704-antiARC) cultures. Cells were grown in ammonium and then transferred to medium containing 4mM nitrate with about 2 millions cells/ml.



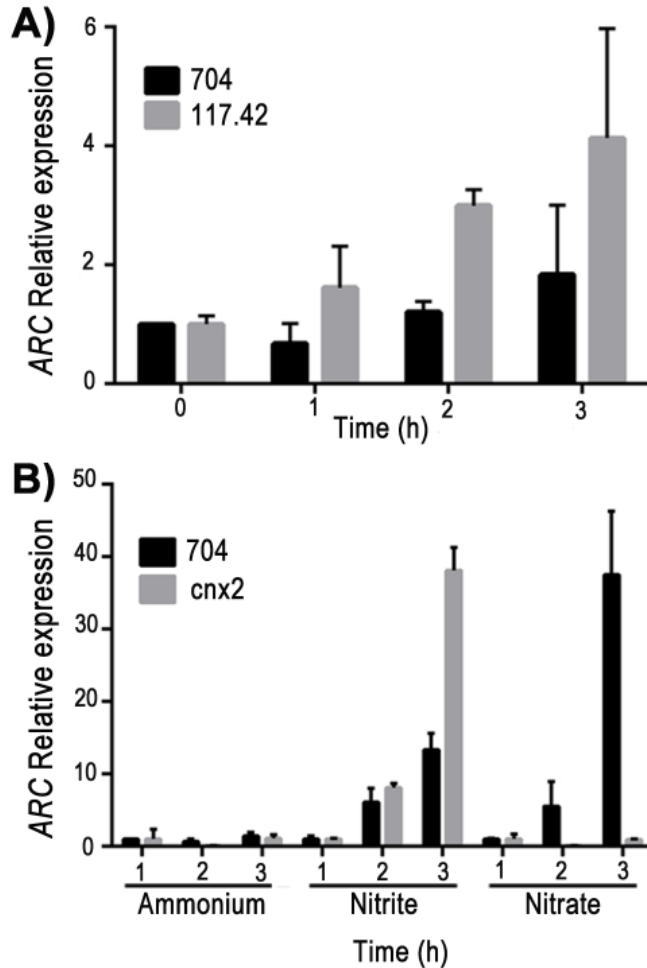
Conversely, expression of *ARC* was increased in mutants affected in NR with respect to wt. In fact the mutant 117.42, carrying a deletion of the *NIAI* gene (González-Ballester et al., 2005b), showed a 2-3-fold increase in the expression of *ARC* in nitrite medium (Figure 2.5.A). All these data point out to a connection between the functionalities of ARC and NR, so when expression of one of them decreases or disappears, the expression of the other increases, as a compensation effect probably due to a common regulatory factor related to both genes.



**Figure 2.4.** Nitrite Reductase activity. Nitrite Reductase activity in wild-type (704), the 704-antiARC1 and Cnx2 strains incubated in N-free medium for 30 min (time 0) and then transferred at the indicated times to nitrate 4 mM. The NiR activity was measured as indicated in methods. The differences between 704 and 704-antiARC1 were not significant (Pvalue= 0.1198), but the differences between 704 and cnx2 were significant (Pvalue=0.0464).

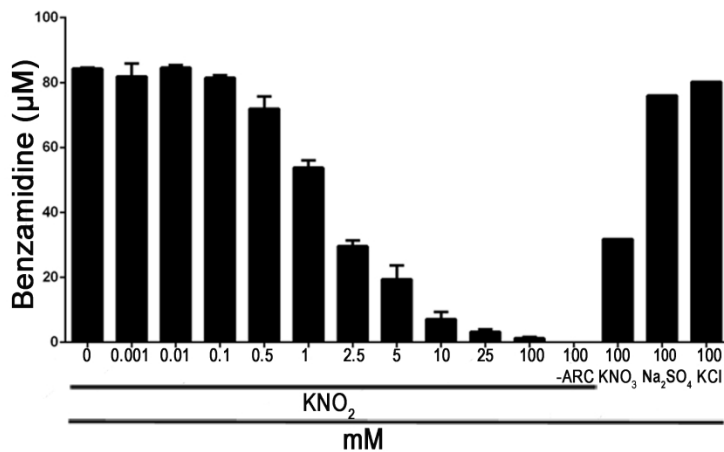
**2.2.3. The nitrite effect in the *ARC* expression and activity.**

*ARC* expression was analysed in nitrate, nitrite and ammonium medium in both 704 and *cnx2* strains (Figure 2.5.B).



**Figure 2.5.** *ARC* expression in several nitrogen sources and strains. **A)** The regulation of *ARC* expression in nitrite (2 mM) medium in the wild type (704) and the NR mutant (117.42). **B)** Regulation of *ARC* transcription in response to nitrate (4 mM), nitrite (2 mM) and ammonium (8 mM) in wild type (704) and in Moco mutant (*cnx2*). The value 1 was assigned to the expression level of internal standard gene ubiquitin-ligase in each condition. Error bars indicate the standard deviation of three technical and biological replicates.

In the wt strain the *ARC* transcript levels increased over time in nitrite and nitrate medium, reaching the highest levels in nitrate. Interestingly, in the *cnx2* mutant, in which nitrite cannot be produced (all molybdoenzymes with Moco are not functional, including NR), *ARC* was overexpressed strongly in nitrite medium, but not in nitrate. These data suggest that nitrate induction depends on its reduction to nitrite and establish a connection between nitrite and *ARC* expression.

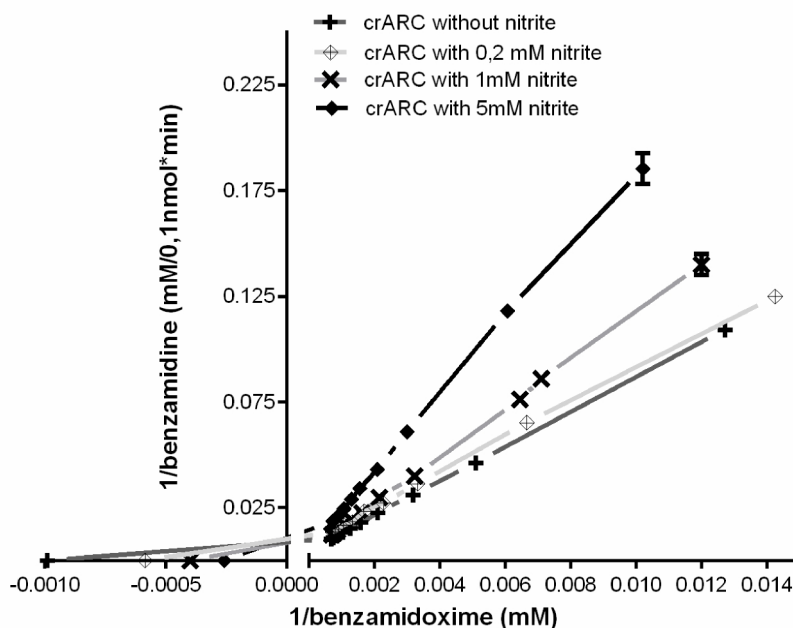


**Figure 2.6.** ARC in vitro activity. Inhibition of the benzamidoxime reduction activity of ARC by different nitrite concentrations. As control, the effects of KNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl over ARC activity were analyzed. Additionally, a control reaction without ARC was included.

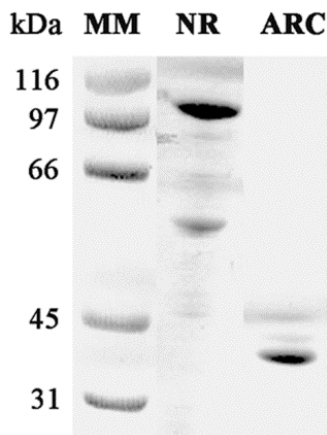
To study if nitrite could be a substrate of ARC in *Chlamydomonas*, as described for human and plant enzymes (Sparacino-Watkins et al., 2014; Yang et al., 2015), competition experiments of nitrite with benzamidoxime, the first substrate reported for ARC (Havemeyer et al., 2006; Gruenewald et al., 2008), were undertaken. As shown in Figure 2.6, benzamidoxime reduction to benzamidine was strongly inhibited by nitrite. This inhibition was specific for nitrite. In fact, about 40 times more nitrate was needed to observe

a similar inhibition, whereas sulfate and chloride had, if any, a minor effect (Figure 2.6).

By applying the kinetic analysis of Michaelis-Menten, ARC showed a  $K_m$  for benzamidoxime of  $993 \pm 29 \mu\text{M}$  and a  $V_{\text{max}} = 9.5 \pm 0.028 \text{ U/mg}$  protein. Nitrite inhibits competitively the ARC benzamidoxime reduction (Figure 2.7) and the estimated  $K_m$  for nitrite was  $654.7 \pm 98 \mu\text{M}$ . The proteins used in these experiments, were purified and loaded in acrylamide gels (Figure 2.8).



**Figure 2.7.** Calculation of the Inhibition constant ( $K_i$ ), Michaelis Menten constant ( $K_m$ ) and the maximum velocity ( $V_{\text{max}}$ ) of ARC. The Inhibition constant was calculated with different concentrations of inhibitor (nitrite) and with each concentration of inhibitor, different concentration of benzamidoxime as substrate. With these lines and Michelis-Menten kinetic parameters,  $K_i=654.7\mu\text{M}\pm 98$  for nitrite and  $K_m=993\mu\text{M}\pm 29$  and  $V_{\text{max}}=9.5\text{U/mg protein}\pm 0.028$  for benzamidoxime were obtained.

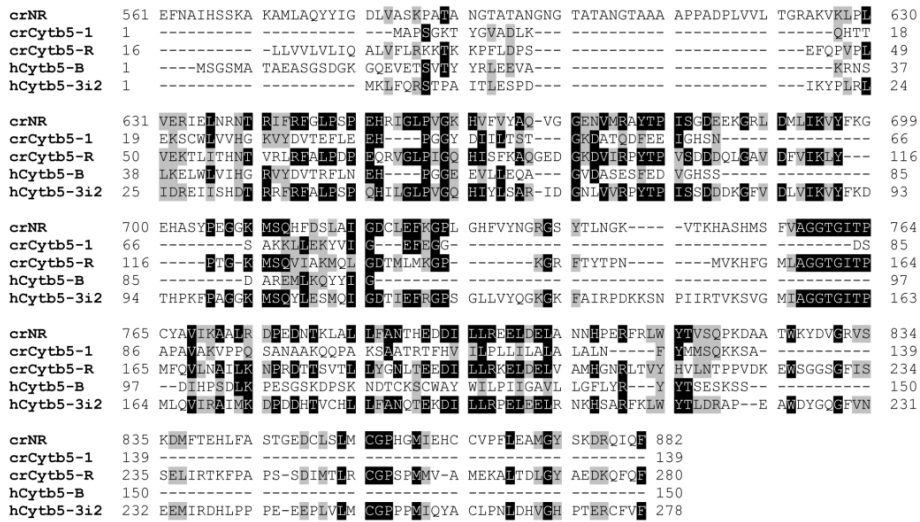


**Figure 2.8.** Recombinantly expressed proteins (10  $\mu$ g) were separated on SDS-polyacrylamide gels and stained with Coomassie Brilliant Blue. In the gel, the position of molecular weight markers is indicated by MM (in kDa). The NR protein has a highly sensitive proteolytic cleavage site that produces a fragment of 52kDa (Kalakoutsii and Fernandez, 1995).

#### 2.2.4. NR can supply electrons for ARC activity.

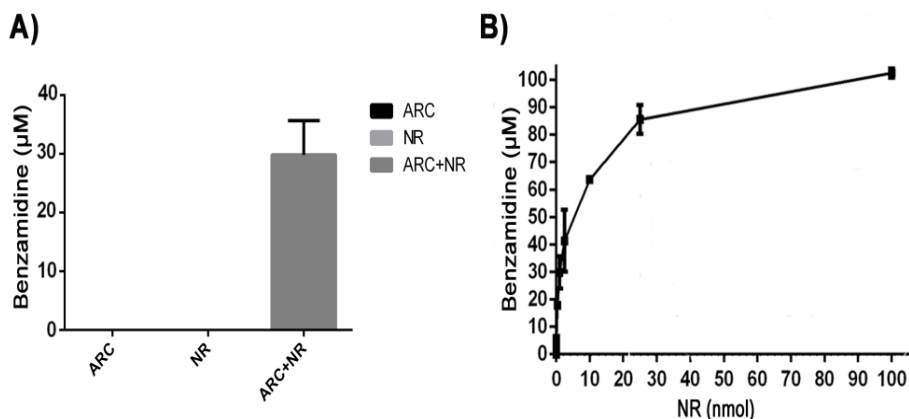
In eukaryotes, ARC proteins need two other partner proteins, Cytochrome  $b_5$  and Cytochrome  $b_5$  Reductase, to supply electrons from NADH for reducing the substrates (Havemeyer et al., 2006; Chamizo-Ampudia et al., 2011). In *Chlamydomonas*, the heme and reductase domains of NR have the highest similarity to Cyt $b_5$ -1 (Cytochrome  $b_5$ -1) and Cyt $b_5$ -R (Cytochrome  $b_5$  Reductase) (Hyde and Campbell, 1990; Ott et al., 2015). Actually, NR showed higher identity with Cyt  $b_5$ -1 and Cyt  $b_5$ -R from human than from *Chlamydomonas reinhardtii* (Figure 2.9).

By taking into account this conservation, and the connection found of *ARC* and *NIA1* expression, the role of NR as a possible electron supplier to ARC was studied. ARC activity, using benzamidoxime as substrate and NADH as electron donor, was determined *in vitro* by co-incubating ARC with different concentrations of NR (Figure 2.10.B).



**Figure 2.9.** Alignment of *Chlamydomonas* Nitrate Reductase (crNR), cytochrome b5-1 (Cytb5-1) and cytochrome b5 Reductase (Cytb5-R) proteins from *Chlamydomonas reinhardtii* and human hCytb5-B and human hCytb5-3i2. The consensus sequences are calculated using a threshold of 65% with the BioEdit v.7.0.9 program. The sequences and GenPept accession numbers are crNR (XP\_001696697), crCyt b5-1 (XP\_001697920), crCyt b5-R (XP\_001695724), hCytb5-B (NP\_085056) and hCytb5-3i2 (NP\_015565). The crNR presents an identity with crCytb5-1 of 27.06%, with crCytb5-R of 28.53%, with hCytb5-B of 27.6% and with hCytb5-3i2 of 42.8% (Hyde and Campbell, 1990). Highly conserved amino acids are shown on a black background and moderately conserved amino acids are shown on a gray background. Gaps introduced to maximize the alignment are indicated by dashes.

Independently, any of these two proteins separately was unable to reduce benzamidoxime to benzamidine using NADH (Figure 2.10.A). However, NR was able to donate NADH electrons to ARC for reducing benzamidoxime. At a fixed ARC concentration (1 nmol), increases of NR concentration resulted in enhanced reduction of benzamidoxime following a saturation kinetics (Fig 3.10.B). These results indicate that ARC can work with other reductases different from Cytb<sub>5</sub>-1 and Cytb<sub>5</sub>-R, and NR is one of them.

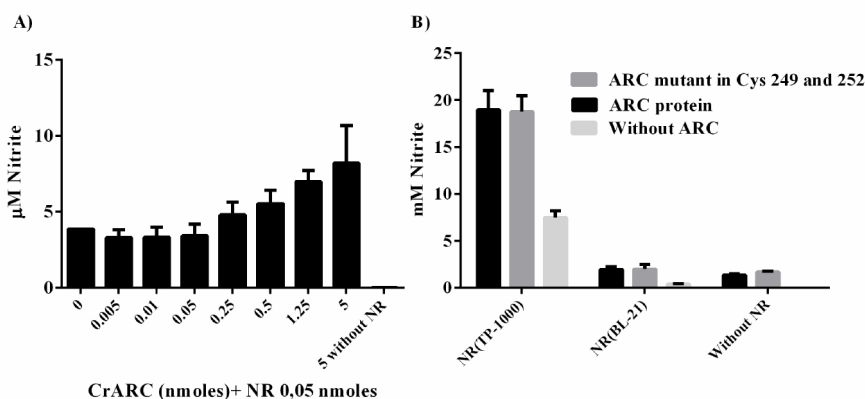


**Figure 2.10.** *Chlamydomonas* ARC and NR in the benzamidoxime reduction activity. **A)** The assay included ARC (1 nmol), NR (1nmol) or the two proteins together. The reactions were performed as indicated in methods. **B)** Benzamidoxime reduction by ARC (1 nmol) with different concentrations of NR. The reactions were performed as indicated in methods.

### 2.2.5. Study of NR and ARC interaction

The NR and ARC interaction allows electron transport from NADH to the NR and then to the ARC. But we do not know what happens with NR activity when NADH electrons are given through NR to ARC.

We carried out experiments where nitrate and benzamidoxime were added in the same reaction mixture as substrates of each proteins (for ARC is benzamidoxime and for the NR is nitrate). Different stoichiometries were tested, where NR was fixed and the amount of ARC was increased. In these experiments we found that the ARC had activity, but as the concentration of ARC was increased, the NR activity was enhanced. (Figure 2.11.A).



**Figure 2.11.** Effect of ARC on NR activity. a) In this experiment the concentration of ARC was increased with respect to a fixed concentration of NR and then the nitrite produced was measured. b) The same as a), but with NR with Moco (TP-1000), NR without Moco (BL-21) and without NR. Other controls are the ARC mutant in Cysteine 249 and 252 (without Molybdenum cofactor), and without ARC.

As shown in Figure 2.11, when NR gives electrons to ARC, it also increases its activity of nitrate reduction. A possibility could be that the ARC is donating molybdenum cofactor to NR, since when NR is purified its molybdenum cofactor content is not 100%.

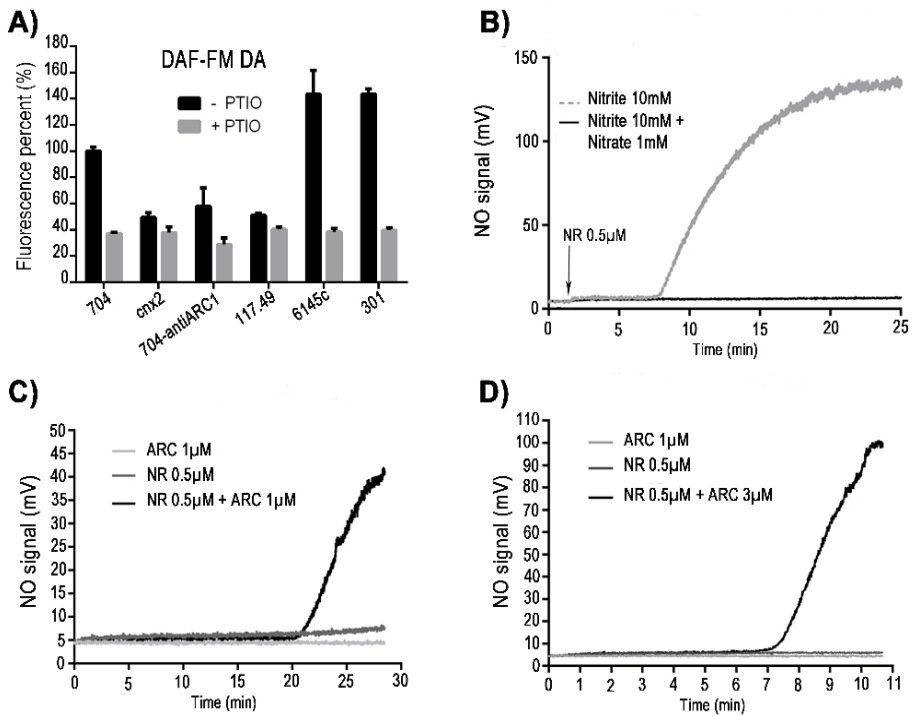
To contrast if this hypothesis was correct, we performed the same experiment as before, but changing the ARC protein by the ARC double mutant in the cysteines 249 and 252, which does not contain molybdenum cofactor. Also, in this experiment we used two NR, one with high amount of molybdenum cofactor (TP1000) and other without molybdenum cofactor (BL-21). The results (Figure 2.11.B) indicate that ARC is not donating the molybdenum cofactor, since even the double mutant had an increased NR activity. This effect seems to have more to do with the link of subunits dimers in NR. The ARC protein seems to improve the coupling of the NR dimers.



### 2.2.6. ARC-NR catalyzes NO production from nitrite.

Many molybdoenzymes, including human ARC, have shown to produce NO *in vitro* (Li et al., 2009; Cantu-Medellin and Kelley, 2013; Wang et al., 2014). In fact, the main NO source proposed in plants occurs by the NR, albeit other reductive ways for NO synthesis have also been described. We have used the 704-antiARC1 strain to evaluate the ARC role in NO production. Though it has been reported that NO detection with DAF-FM DA probes might not be always specific for NO (Ruemmer et al., 2012), we have used it in combination with the NO scavenger PTIO, as control, to estimate NO production in intact cells after 3h of incubation in nitrite 5 mM (Figure 2.12.A). NO concentrations were lower in *cnx2* (Moco<sup>-</sup>) and 117.42 (NR<sup>-</sup>) mutants than in wt strain. In both of these NR-deficient mutants, *cytb<sub>5</sub>* and *cytb<sub>5</sub>-R* are not affected, showing that these mediators are irrelevant for NO production. Curiously, NO levels were similar in both mutants pointing out that in this condition the molybdoenzymes ARC with NR are the main players in NO production. In fact, 704-antiARC1 strain showed similar results to the above-mentioned strains.

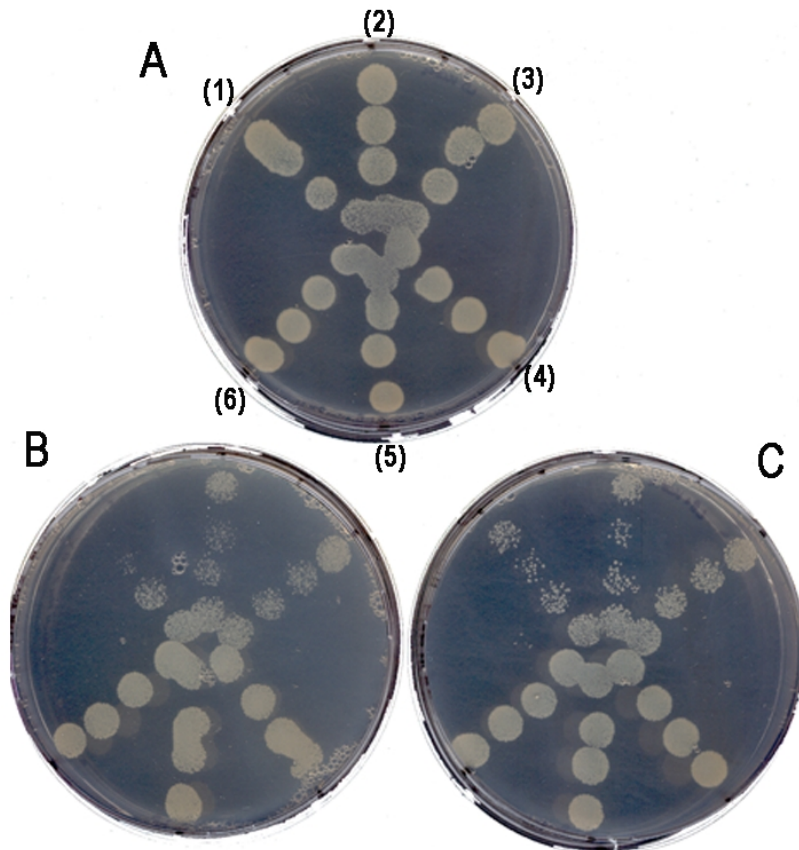
The NO production in 704-antiARC1 was slightly higher than in *cnx2* (Moco<sup>-</sup>) and 117.42 (NR<sup>-</sup>) mutants probably due to the fact that it expresses 23% of ARC transcript yet (Figure 2.12.A). On the other hand, we also measured NO production in the strain 301 (a NR mutant without NR activity, but having an intact diaphorase activity) (Fernandez and Cardenas, 1982b) and its corresponding parental wt strain 6145c. Both strains showed the same NO levels, indicating that the diaphorase activity of NR mutant is important for NO production but not its Moco-dependent nitrate reduction activity. These results suggest that in *Chlamydomonas* the ARC molybdoenzyme plays *in vivo* a very important role together with the diaphorase activity of NR in NO production in nitrite medium, but not *cytb<sub>5</sub>-1* or *cytb<sub>5</sub>-R*.



**Figure 2.12.** *In vivo* and *in vitro* Nitric oxide production. **A)** Measurements of NO with DAF-FM DA in 704 (wt), *cnx2*, 117.42, 704-antiARC1, 6145c and 301 strains. The fluorescence was measured as indicated in methods. Cell autofluorescence was subtracted to total fluorescence obtained. **B)** *In vitro* NO formation from nitrite by NR. At the  $t = 1$  min NR ( $0.5 \mu\text{M}$ ) was added. The reaction was performed in MES buffer 0.2 mM, pH 7.4, 1 mM NADH and the indicated concentrations of nitrite and nitrate, all added at the beginning of the reaction. **C)** NO formation from nitrite by NR and ARC. In this reaction, the same mix as in B) plus nitrite 10 mM and nitrate 1 mM were used. At 1 min and 16 min, NR  $0.5 \mu\text{M}$  and ARC  $1 \mu\text{M}$  were added, respectively. **D)** Similar to c) but with  $3 \mu\text{M}$  of ARC added at 0 min. Production of NO was measured in mV by the Nitric Oxide Analyser (NOA). These experiments were repeated 3 times with identical results.

And other hand, in *E. coli*, we proved that a stress by an excess of  $\text{H}_2\text{O}_2$  inhibits the growth of the bacterium mutant of YcbX (JW5126-1), the bacterium protein homologue to ARC, but it does not inhibit the growth in the wild type bacterium (BW25113) (Figure 2.13). The  $\text{H}_2\text{O}_2$  produces in the cell a defensive answer, which is mediated by the production of nitric oxide

protecting against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity (Lum et al., 2002). YcbX mutant showed a higher sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than the wt. It is possible that YcbX has, as ARC, something to do with the production of nitric oxide.

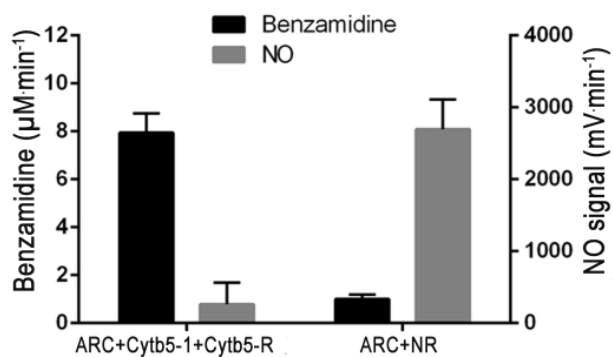


**Figure 2.13.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> test in the *E. coli* bacterium. The bacterial strains used in this experiment were: JW5126-1 (-YcbX), numbers (1),(2) and (3), and BW25113 strain (Wild Type), numbers (4), (5) and (6). A) Plate with minimum medium, without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, B) and C) plates with minimum medium plus 5 μM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 2.2.7. ARC-NR catalyzes NO production from nitrite

All data shown above highlight a putative role of NR interacting with ARC in NO production. To confirm our hypothesis we have quantified NO production by ozone chemiluminescence (Materials and Methods) (Sparacino-Watkins et al., 2014) using NR, ARC and both together. As reported, NR was able to produce NO from nitrite (10 mM), but this production was strongly inhibited by the presence of 1 mM nitrate (Figure 2.12.B). Nevertheless, when both NR and ARC were incubated together the NO production occurred in the presence of nitrite (10mM) but also even in the presence of nitrate (1mM) where the NR alone failed (Figure 2.12.C and 3.12.D). In these experiments, it was observed that NO production in the presence of nitrate is dependent of the two proteins working together (Figure 2.12.C and 3.12.D). The NO detection in the assay took some minutes to be evident and increased after NR and ARC were added. This delay cannot be explained as a time needed to transform nitrate into nitrite by NR, since it is shown that nitrate strongly inhibits NO production by NR during all the time of assay (Figure 2.12.B). On the contrary, this delay can be due to the time needed for depleting the dissolved oxygen by NO in the assay solutions, which were not anaerobic.

Interestingly, Cytb<sub>5</sub>-1 and Cytb<sub>5</sub>-R were much less efficient than NR in ARC-dependent NO production. Conversely, *in vitro* NR was less efficient than Cytb<sub>5</sub>-1 plus Cytb<sub>5</sub>-R in the reduction of the benzamidoxime (Figure 2.14). These different efficiencies suggest that the interaction between ARC and the electrons suppliers might modify the active center of ARC and therefore increase the activity for one substrate and decrease it for another. These data highlight that NR by itself only produces NO under very particular conditions, i.e. very high nitrite and very low nitrate concentrations. Thus, under standard physiological conditions, where nitrate will always appear inside the cell, ARC would be the main enzyme responsible in producing NO from nitrite with electrons provided by NAD(P)H-NR.



**Figure 2.14.** ARC activities with different reductases. Comparison between the activities of benzamidoxime reduction and NO production of ARC, and using either Cytb<sub>5</sub>-1/Cytb<sub>5</sub>-R or NR is shown. Activities were measured as described in methods under equivalent conditions. Error bars indicate the standard deviation of three independent assays.





## **Discussion of Chapter II**





### 2.3. Discussion

Since its discovery, the ARC protein has been enigmatic. Its activity can be assayed with artificial electron acceptors as benzamidoxime promoting reduction of N-hydroxylated amines or N-hydroxylated nitrogenous bases, like 6-hydroxyamino purine (Kozmin et al., 2008). Thus it was proposed that a possible function of ARC would be to maintain properly reduced bases, avoiding the harmful and mutagenic effects of its oxidized forms (Chamizo-Ampudia et al., 2011). Our results herein support that in plants ARC fulfil an important role in the production of the critical second messenger NO and this production takes place with electrons from NAD(P)H provided by NR. At present in the absence of a better candidate, NR was highlighted as the responsible for NO production in plants because of its capability of NO synthesis (Yamasaki and Sakihama, 2000), in spite of data on activity and cellular nitrate/nitrite concentrations that do not fit well with such a proposal (Rockel et al., 2002; Xiong et al., 2012). The NR with high amount of nitrite, interaction with outer membrane mitochondrial and it loses the terminal activity, but not lost diaphorase activity (Siverio et al., 1993).

Production of NO catalysed by hmARC (hmARC1 and hmARC2) in the outer membrane of mitochondria has been recently reported (Klein et al., 2012). Both hmARCs produce NO from nitrite, what might represent an additional signalling pathway for a sustained NADH-dependent hypoxic NO production (Sparacino-Watkins et al., 2014).

In this way, animals would show two pathways for the production of the critical signalling molecule NO: 1, the oxidative one, dependent on an L-Arginine NADPH:oxygen-oxidoreductase activity (NOS) producing NO and citruline, and 2, the reductive one, dependent on an ARC NO-forming nitrite reductase activity, operative under hypoxic conditions. Evolutionarily ARC has been maintained in plants, being able to accept electrons from NADH through the electron transport chain of Cytb5-R and Cytb5-1 (Chamizo-

Ampudia et al., 2011). However, plant ARC seems to be a cytosolic enzyme and the central metabolism in plant photosynthetic cells occurs aerobically. Thus, it does not result strange what has been found in the present work, i.e. that this reductive NO production from nitrite would take place under aerobiosis and using NR, a central enzyme for nitrogen acquisition, which has a remarkable similarity to Cytb5-R and Cytb5-l (Ott et al., 2015).

The ARC and NR proteins would produce NO with nitrite from nitrate assimilation, but it is also possible that under other different conditions, under which NR seems to produce NO (Cookson et al., 2005), these proteins could also work together. ARC protein family is well conserved in plants, trees, herbaceous plants and algae and show a high similarity among them. Dicotyledoneous plants contain, like animals, two ARC versions, whereas others, like *Chlamydomonas* have a single ARC gene (Tejada-Jimenez et al., 2013).

On the view of the reports on NO production in plants from L-Arginine (Barroso et al., 1999; Corpas et al., 2009), we could speculate on that the oxidative pathway of NO production is also operative in plants but, like in the reductive pathway with NR and ARC, it could involve other protein partners different from those appearing in the domains of the typical animal NOS (Smith et al., 2013), which might explain why the animal-type NOS has not yet been found in plants.

We have shown herein that ARC produces NO with a high specificity for nitrite as a substrate in the presence of 1mM nitrate, a condition under which NR cannot do it. Plant cells accumulate nitrate into vacuoles at high concentrations to keep the cytosolic homeostasis of this important anion, which not only provides the nitrogenous nutrient for making cell biomass but also a signal for metabolic adaptations, root growth and plant architecture (Stitt, 1999). Under standard conditions, cytosolic nitrate concentrations in

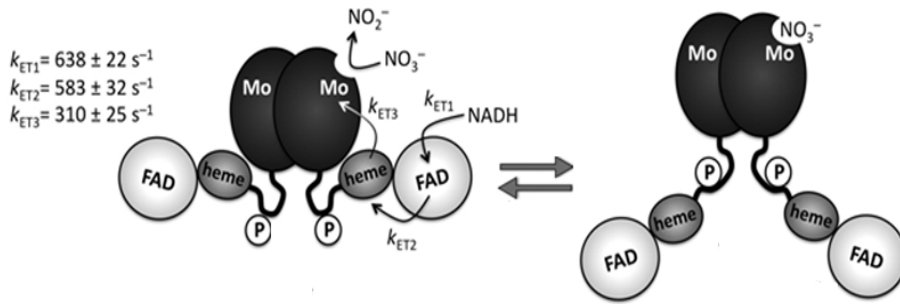
root and leaf mesophyll cells are usually in millimolar amounts (Miller and Smith, 1996; Cookson et al., 2005), being nitrite concentrations probably much smaller (Rockel et al., 2002; Wang et al., 2007), making it impossible that NR produce by itself significant NO. The calculated  $K_m$  value for nitrite with dithionite of hmARC1  $636 \pm 139 \mu\text{M}$  (Sparacino-Watkins et al., 2014) is similar to that estimated for crARC. Though ARC  $K_m$  for nitrite might look high, synthesis of NO might occur efficiently by ARC mediated by NR but not by NR itself. It is important to remark that NR, as a component of the electron transport chain from NAD(P)H, is playing a double role: 1) promoting reduction of nitrite by ARC for NO synthesis and 2) promoting reduction of THB1 for NO conversion to nitrate. THB1 is a truncated hemoglobin, which has NO-dioxygenase activity, when reduced, and NR seems to mediate also this reduction (Sanz-Luque et al., 2015).

In this way, by distributing electrons to ARC and THB1, NR would be playing a central role in the control of NO amounts in the cell for signalling of numerous processes. At the same time, the draining of electrons towards those enzymes would inhibit NR activity for producing nitrite as already shown for THB1 (Sanz-Luque et al., 2015). The balance of the activities of those enzymes involved would modulate NO levels in the cells. In this study we have found that the NR activity increases when ARC is added to the reaction. This maybe because the ARC protein improves the interaction between the two NR subunits to form the dimer (Figure 2.15.).

This would produce an enhanced electronic flow through the NR (Figure 2.16.).

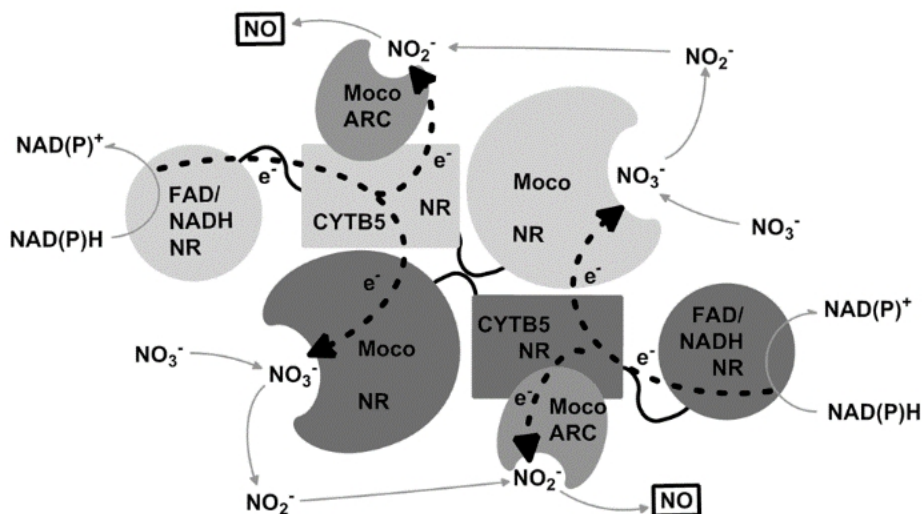
The balance of the activities of those enzymes involved would modulate NO levels in the cells. These levels would affect cell responses, which might occur directly, as reported for the post-translational regulation of transporters (Sanz-Luque et al., 2013), and probably by NO-dependent

guanylate cyclases, whose existence has been demonstrated in plants (de Montaigu et al., 2010; Mulaudzi et al., 2011), after the first discovery of guanylyl cyclases (Ludidi and Gehring, 2003), generating the downstream signalling molecule cGMP from GTP.



**Figure 2.15.** Different conformations of the NR dimer. The ARC protein could help to NR dimers to adopt the first conformation of the figure, and thus to improve the activity of NR. Modified from (Lambeck et al., 2012).

Thus cGMP was shown to regulate transcriptionally expression of the NR gene (de Montaigu et al., 2010). To conclude, our data show that generation of NO occurs efficiently in plants by a reductive pathway involving ARC and NR. This could be a mayor way to produce NO, however an additional oxidative pathway from L-arginine cannot be discarded.



**Figure 2.16.** Scheme of the possible interaction between NR domains and ARC. The domains of NR are FAD/NADH, Heme (cytochrome  $b_{557}$ ) and Moco. The ARC protein has a Moco domain only. The arrows with solid lines are the reactions of substrates to products, and arrows with dashed lines are the electronic steps from NADH. The electronic way from NR to ARC is suggested with dashed lines. It is unknown whether the electronic step is from the FAD or cytochrome  $b_{557}$ .



# CONCLUSIONS





## Conclusions

These data allow to get the following conclusions:

1. The ARC protein is a molybdoenzyme that belongs to the sulfite oxidase family.
2. The ARC protein needs the Cytb5-1 and Cytb5-R to conduct the reduction of mutagenic compounds such as the HAP. Zinc also increases the activity around 10 times.
3. The interaction of the proteins crARC, Cytb5-1 and Cytb5-R has a stoichiometry 1: 2: 1, where the ARC complex has two Cytb5-1 and a Cytb5-R.
4. The ARC protein has a number of amino acids that interact with the Moco, such as the C252, the F210 and R276. Moreover ARC has important amino acids in the active site as D182, R211 and the C249. Finally other residues important for interaction with the Cytb5-1 and Cytb5-R are E224, E267 and R276, where this latter residue seems to participate in both the Moco active site and the interactions.
5. The ARC protein seems to begins its degradation by the carboxyl terminus and mutants at residues in this region form aggregates. Similarly, temperature causes in the wild-type protein first the loss of the ARC activity with NADH and afterwards that with dithionite.
6. The NR protein has a high homology with the Cytb5-1 and Cytb5-R, and the antisense mutants of ARC have a high activity of nitrate

reductase, supporting that there is some kind of common regulation or interaction between NR and ARC. In addition that the ARC antisense mutants excrete nitrite in media with nitrate, and do not grow well with nitrate.

7. The ARC and NR interaction occurs in medium containing both nitrate and nitrite, to produce nitric oxide and to regulate nitrate assimilation. Moreover, NR is capable of producing NO from nitrite, but not in the presence of nitrate. Thus, NO can be synthesized in the cell by this dual system of NR and ARC.
  
8. The mutants in the terminal activity of NR produce nitric oxide in the cell, but not the antisenses of ARC. On the other hand, mutants in the diaphorase activity of NR do not produce nitric oxide in the cell.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## M. Material y Métodos

### M.1. Compuestos Químicos y Estirpes

Los compuestos que hemos usado en esta tesis son los siguientes: N6-Hydroxylaminopurine (HAP) y Benzamidoxima fueron suministrados por la empresa ICN Biochemicals, el resto de compuestos empleados se adquirieron de la empresa Sigma-Aldrich.

#### M.1.1. Estirpes de *Chlamydomonas reinhardtii*

ESTIRPE	GENOTIPO	FENOTIPO	REF*
704	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 <sup>+</sup> NIA1:ARS ( <i>silvestre</i> )	wt	(1)
1.78 (Cnx1G)	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 <sup>+</sup> NIA1:ARS Rbc:AphVIII Cnx1G <sup>-</sup>	Nit <sup>-</sup> Par <sup>R</sup>	(2)
7.96 (Cnx2)	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 <sup>+</sup> NIA1:ARS Rbc:AphVIII Cnx2 <sup>-</sup>	Nit <sup>-</sup> Par <sup>R</sup>	(2)
11.40 (Cnx3)	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 <sup>+</sup> NIA1:ARS Rbc:AphVIII Cnx3 <sup>-</sup>	Nit <sup>-</sup> Par <sup>R</sup>	(2)
70.9 (Cnx1E)	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 <sup>+</sup> NIA1:ARS Rbc:AphVIII Cnx1E <sup>-</sup>	Nit <sup>-</sup> Par <sup>R</sup>	(2)
204.81 (Cnx5)	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 <sup>+</sup> NIA1:ARS Rbc:AphVIII Cnx5 <sup>-</sup>	Nit <sup>-</sup> Par <sup>R</sup>	(2)
117.42	mt <sup>+</sup> cw15 ARG7 <sup>+</sup> NIA1:ARS Rbc:AphVIII :NIA1	Nit <sup>-</sup> Par <sup>R</sup>	(2)
6145c	mt <sup>+</sup> (Silvestre)	wt	(4)
301	mt <sup>+</sup> Nia1	Nit <sup>-</sup>	(4)
704- antiARC1	mt <sup>+</sup> 704 ARC:pChlamiRNA3	ARC <sup>-</sup> (77%)	(5)
704- antiARC2	mt <sup>+</sup> 704 ARC:pChlamiRNA3	ARC <sup>-</sup> (73%)	(5)

**Tabla M.1.** Estirpes de *Chlamydomonas* usadas en este trabajo. Las abreviaturas del fenotipo son: wt, fenotipo silvestre para la asimilación de nitrato; AI, insensible a amonio para la expresión del promotor NIA1; Par<sup>R</sup>, resistente al antibiótico paromomicina; ARC<sup>-</sup> porcentaje de silenciamiento de ARC. \*Referencias: (1) (Loppes et al., 1999); (2) (González-Ballester et al., 2005a); (3) (Sanz-Luque et al., 2015); (4) (Fernández and Matagne, 1986); (5) Este trabajo.



Las diferentes estirpes de *C. reinhardtii* que se describen a continuación se caracterizan por la presencia de marcadores genéticos relevantes para el desarrollo experimental de este trabajo. Los genotipos *mt*<sup>+</sup> y *mt*<sup>-</sup> se refieren al tipo de competencia sexual (sexo), mientras que la mutación *cw15* origina la ausencia de pared celular (fenotipo *cw*<sup>-</sup>).

### M.1.2. Estirpes bacterianas

La estirpe bacteriana DH5 $\alpha$ F' se utilizó para la transformación con plásmidos, clonación y purificación de los mismos. Las otras estirpes, TP1000, BL21, se usaron para la sobreexpresión y purificación de proteína, y las estirpes BW25113 y JW5126-1 son estirpes silvestre y mutante, respectivamente, en YcbX (homólogo a la proteína ARC en bacterias), se usaron para estudiar la reversión del fenotipo con la proteína ARC y citocromos b5 de *Chlamydomonas*.

ESTIRPE	GENOTIPO	REFERENCIA
<b>DH5<math>\alpha</math>F'</b>	F' $\phi$ 80dlacZAM15, AlacU169, recA1, endA1, hsdR17, supE44, thi-1, gyrA96, relA1	(Sambrook et al., 1989)
<b>TP1000</b>	MC4100, $\Delta$ mobAB::Km <sup>R</sup>	(Palmer et al., 1996)
<b>BL21</b>	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm	(Studier and Moffatt, 1986)
<b>BW25113</b>	F <sup>-</sup> , $\Delta$ (araD-araB)567, $\Delta$ lacZ4787(::rrnB-3), $\lambda$ -rph-1, $\Delta$ (rhaD-rhaB)568, hsdR514	(Baba et al., 2006)
<b>JW5126-1 (-YcbX)</b>	F <sup>-</sup> , $\Delta$ (araD-araB)567, $\Delta$ lacZ4787(::rrnB-3), $\lambda$ -, $\Delta$ ycbX763::kan, rph-1, $\Delta$ (rhaD-rhaB)568, hsdR514	(Baba et al., 2006)

**Tabla M.2.** Estirpes de *Escherichia coli* usadas en este trabajo.

## M.2. Vectores

### M.2.1. Vectores de clonación

VECTOR	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
<b>pBluescript II SK</b>	Vector derivado de pUC usado para la clonación de fragmentos originados por enzimas de restricción. Contiene la región codificante del péptido $\alpha$ de la $\beta$ -Galactosidasa interrumpida por una zona con sitios de corte para enzimas de restricción. Confiere resistencia a ampicilina.	(Sambrook et al., 1989)
<b>pSpark® (Canvax)</b>	Vector comercial que contiene los promotores <i>T7</i> y <i>SP6</i> , <i>lac</i> , <i>AmpR</i> , $\beta$ -lactamasa. NCBI: GQ489184.	(Sanz-Luque et al., 2015)
<b>pChlami RNA3</b>	Vector empleado en el silenciamiento mediante microRNA, que posee un precursor de microRNA flanqueado por el promotor y el 3'UTR del PSAD. Además posee el promotor de la rubisco y el gen de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias.	(Molnar et al., 2009)

**Tabla M.3.** Vectores de clonación usados en este trabajo.

### M.2.2. Vectores de expresión de proteínas

VECTOR	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
<b>pQE80L</b>	Vector utilizado para sobreexpresar proteínas. Presenta un promotor inducible por IPTG. La clonación en este vector etiqueta la proteína a expresar con un conjunto de 6 histidinas que permiten la retención en una matriz que contenga níquel. Confiere resistencia a ampicilina. El vector pASK - IBA5C permite la expresión de Strep-tag® - proteínas de fusión en E. coli.	Qiagen
<b>pASK-IBA5C</b>	El vector contiene el promotor de tetraciclina/operador inducible para la expresión regulada de proteínas, la Strep-tag® para la fusión N-terminal de la proteína recombinante y el casete de resistencia a cloramfenicol. Se puede utilizar con cualquier cepa de E. coli porque el promotor funciona independientemente del fondo genético de E. coli.	Lifesciences

**Tabla M.4.** Vectores de expresión de proteínas.

### M.3. Medios y condiciones de cultivo

Todos los medios de cultivo que se describen a continuación fueron previamente esterilizados en autoclave (1,2 atm, 20 min, 121°C) y, ocasionalmente, por filtración a través de membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,2 µm.

#### M.3.1. Medios de *Chlamydomonas*

Los distintos medios utilizados para el cultivo de *C. reinhardtii* se prepararon a partir de las siguientes soluciones concentradas (Harris, 1989):

- *Solución Tris*: 121 g/l Tris
- *Solución A*: 5 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 10 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 40 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- *Solución A-N*: Igual que la solución A pero sin  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- *Solución B*: 115 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 46 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- *Solución de oligoelementos*: 50 g de EDTA (ácido libre) fueron disueltos en 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  (se facilita la disolución añadiendo 21 gr de KOH). A continuación, se disolvieron en 550 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  las demás sales, siguiendo este orden: 11,4 g/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 22 g/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5,1 g/l  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 5 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,6 g/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 1,6 g/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,214 g/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Tras mezclar ambas soluciones, se calentó hasta 100°C, se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 80-90°C y se ajustó el pH a 6,8, usando para ello KOH al 20% y procurando que la temperatura no bajase de 70°C. Finalmente, se enrasó el volumen hasta 1 litro, manteniéndose en oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 días antes de su uso.

Preparación de medios:

- Medio TAP: 10 ml/l de solución Tris 2M, 10 ml/l de solución A ó A-N, 1 ml/l de solución B, 1 ml/l de solución de oligoelementos y 0,95 ml/l de ácido acético glacial.

- Medio Mínimo: 10 ml/l de solución A ó A-N, 10 ml/l de solución B y 1 ml/l de solución de oligoelementos.

Para la preparación de medio sólido se añadió agar a una concentración de 1,6% (p/v). Los medios sólidos, tras ser esterilizados, fueron enfriados en un baño termostatizado a 50°C. Los medios sólidos suplementados con el antibiótico paromomicina se prepararon a una concentración de 50 µg/ml y el antibiótico se añadió cuando el medio estaba a 50°C, para evitar su degradación. Los medios sólidos se vertieron a esta temperatura en placas de Petri y se dejaron enfriar hasta su solidificación.

Todos los medios resultantes poseían un pH de 7,2, aproximadamente.

Para preparar medios con una fuente de nitrógeno diferente de NH<sub>4</sub>Cl (8 mM) se utilizó la solución A-N suplementándose con las concentraciones requeridas de NH<sub>4</sub>Cl, KNO<sub>3</sub>, KNO<sub>2</sub> o arginina. En el caso de los medios sin nitrógeno no se añadía nada a la solución A-N.

Los cultivos se llevaron a cabo en cámaras con una temperatura mantenida de 23-25°C, con iluminación continua de 15-20 W/m<sup>2</sup> proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca. De forma rutinaria, las células se recogieron al final de la fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación (3000 x g, 1-2 min) a temperatura ambiente.

Para la conservación de las estirpes de *Chlamydomonas* se emplearon tubos de poliestireno cristalino estériles, donde se inocularon. Se cultivaron con luz intensa y a una temperatura de 23-25°C durante un periodo de 3 a 6 días, según la fuente de nitrógeno utilizada. Tras este periodo, los tubos se transfirieron a temperatura ambiente y luz difusa hasta el momento de su utilización. Los cultivos que se utilizaron rutinariamente se renovaron de forma periódica cada dos semanas, en caso contrario cada seis meses,

comprobando la pureza de los mismos antes de su utilización mediante observación directa al microscopio óptico.

### **M.3.2. Medios de bacterias**

#### **M.3.2.1. Medio LB**

El medio de crecimiento de bacterias Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) empleado, estaba compuesto por: bacto triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l) y NaCl (5 g/l). Para el caso de medios sólidos se añadía además agar al 1,6% (p/v).

Para la selección, por actividad, de  $\beta$ -Galactosidasa se suplementó el medio LB con 500  $\mu$ M de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) y 40  $\mu$ g/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) (solución madre 40 mg/ml en N,N-dimetilformamida).

Los cultivos de estirpes bacterianas resistentes a ampicilina fueron suplementados con dicho antibiótico en el medio, a una concentración de 100  $\mu$ g/ml, mientras que los resistentes a Kanamicina fueron suplementados con 30  $\mu$ g/ml. En los medios sólidos el antibiótico se añadió siempre, tras la esterilización, a temperaturas inferiores a los 50°C.

Las bacterias se cultivaron a 37°C manteniendo la agitación continua, en caso de medios líquidos, (150-290 r.p.m.) durante periodos de 14 -16 h.

#### **M.3.2.2. Medio VB**

Otro medio de crecimiento fue el medio mínimo Vogel- Bonner (VB) (Vogel and Bonner, 1956), donde la bacteria tiene que sintetizar todo lo que necesita. Este medio contiene  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2g/L, ácido cítrico 2g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10g/L y  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en unos 3,5g/L. Posteriormente, tras la esterilización por autoclave, se añadió glucosa a una concentración final de

0,2% (se esterilizó aparte). Para medios sólidos antes de esterilizar se añadió agar al 1.6% (p/v).

En caso de medios líquidos, las bacterias se cultivaron a 37°C con agitación continua, (150-290 r.p.m.) durante periodos de 24h.

### **M.3.2.3. Medio para células competentes**

Para la preparación de células competentes de *Escherichia coli* se utilizó el medio PSI que contiene: Extracto de levadura (5 g/l), bactotripton (20 g/l), y MgSO<sub>4</sub> (5 g/l). El pH del medio se ajustó a 7,6 usando KOH.

Las bacterias se cultivaron a 37°C con agitación continua, en el caso de medios líquidos, (150-290 r.p.m.) durante periodos de 14 -16 h.

### **M.3.2.4. Conservación de bacterias**

Las estirpes bacterianas se conservaron a -80°C, en medio líquido con glicerol al 15% (v/v), y a 4°C en placas de LB sólido, con los antibióticos apropiados para cada caso.

### **M.3.3. Test de crecimiento con estirpes de *Chlamydomonas reinhardtii* con HAP**

Los tests de crecimiento se realizaron en placas translúcidas de 24 pocillos, donde cada pocillo estéril tenía una capacidad de unos 2,5 ml, en estas placas se añadieron 2 ml de medio líquido rico en amonio, al cual se agregaron 1000 células por pocillo de la estirpe correspondiente, pero en un volumen de 5 µl. Una vez añadidas las estirpes en cada pocillo, añadimos las diferentes concentraciones de HAP (6-N-Hydroxy Amino Purine) con un volumen de gota de 5µl, con el fin de que el volumen final de todos los pocillos fuera exactamente el mismo. Una vez realizada cada estirpe por triplicado, se dejaron crecer las placas bajo una luz continua de baja

intensidad durante 5 días. Transcurridos esos 5 días fue cuantificada la clorofila de cada pocillo.

#### **M.3.4. Test de crecimiento con estirpes de *Escherichia coli* con HAP**

Para realizar el test de crecimiento con estirpes de *Escherichia coli*, el primer paso fue inocular la estirpe de *E.coli*, transformada o sin transformar, en 1 ml de LB líquido, dejándolo crecer a continuación durante 2 horas a 37°C. Una vez transcurridas esas 2 horas, se diluyeron 50 veces las bacterias en una disolución al 0,9 % de NaCl. De esta dilución añadimos gotas de 2,5 µl a las placas de medio mínimo VB. Cuando las gotas de bacterias se secaron en las placas, procedimos a añadir 100 µg, en una única gota, en el centro de la placa para que la concentración de HAP difunda hasta los bordes, obteniendo un gradiente de concentración. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C, pudiendo verse una inhibición de crecimiento en mutantes YcbX.

#### **M.3.5. Test de resistencia en Bacterias**

Para la realización de los experimentos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se usó una estirpe silvestre de bacterias BW25113 y la mutante en la proteína homóloga de crARC (YcbX) en bacterias, JW5126-1. El test de gota se realizó con un inóculo de 10 µl, que fue sembrado en placas de VB con agar que contenían las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> siguientes: 0 (control), 300 µM, 400 µM y 500 µM.

#### **M.3.6. Excreción de nitrito en *Chlamydomonas* en medio rico en Nitrato**

Las células fueron crecidas en medio rico en amonio y posteriormente se llevaron a una concentración de 2 millones de células por ml, induciéndolas en medio rico en nitrato (concentración de nitrato de 4 mM). Se recogieron muestras del medio sin células en el tiempo indicado y se les determinó la concentración de nitrito que habían excretado, haciendo uso la técnica descrita por Snell (Snell and Snell, 1948).

#### **M.4. Transformación genética**

##### **M.4.1. Transformación genética de *Chlamydomonas reinhardtii***

Se siguió, el método descrito por Kindle (1990) con algunas modificaciones. Las células de *C. reinhardtii* se cultivaron en medio TAP amonio hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, a continuación se recogieron por centrifugación a 3000 x g durante 1 min, se lavaron con medio mínimo sin fuente de nitrógeno, y se resuspendieron en este medio a una densidad de  $3-5 \times 10^7-10^8$  células/ml. La mezcla de transformación contenía 0,9 ml de células, 0,1 ml de polietilenglicol (PEG) 8000 al 20% (p/v), 0,1-1 µg de DNA y unos 0,3 g de perlas de vidrio silanizadas. En último lugar se añadió el PEG e inmediatamente se agitó la mezcla vigorosamente en un vórtex durante 8 s (tiempo para mutantes de pared cw<sup>-</sup>). Seguidamente, se lavaron las células con 10 ml de medio mínimo sin nitrógeno con el fin de eliminar el PEG, se centrifugaron a 3000 x g, y se resuspendieron en 25-30 ml de medio mínimo sin nitrógeno donde se mantuvieron con luz continua durante 6-12 h. Esto se hace con el propósito de inducir la expresión de la proteína responsable de la resistencia, antes de la inoculación del cultivo, en medios con paromomicina, limitando al mismo tiempo la división celular al retirar la fuente de nitrógeno.

Finalmente, se centrifugó el cultivo a 3000 x g durante 1 min y se transfirió a placas de medio selectivo (paromomicina 50 µg/ml en medio mínimo o 100 µg/ml en medio TAP).

##### **M.4.2. Transformación genética de *Escherichia coli***

###### **M.4.2.1. Preparación de células competentes**

Se inocularon 5 ml de medio PSI con una colonia de la estirpe DH5αF' de *E. coli* y se incubó a 37°C, con agitación, durante toda la noche. Posteriormente, las células se diluyeron 20 veces con medio PSI nuevo y se cultivaron hasta alcanzar una absorbancia de 0,45-0,5 a 550 nm. Una vez



crecido, el cultivo se enfrió en hielo durante 5 min, para después centrifugar las células a 4°C a 3000 x g durante 5 min, y resuspenderlas con suavidad en 40 ml de solución TFB-1 fría. Una vez resuspendidas las células se mantuvieron en hielo durante 5 min. Seguidamente, se volvieron a centrifugar las células y el precipitado obtenido se resuspendió usando 4 ml de TFB-2 y posteriormente se mantuvo en hielo durante 15 min. De inmediato se congelaron en nitrógeno líquido alícuotas de 150 µl y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Solución TFB-1. Acetato potásico 30 mM, KCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM y glicerol al 15% v/v. El pH se ajustó a 5,8 con ácido acético 0,2 M. Se esterilizó mediante filtración y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Solución TFB-2. MOPS 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, KCl 10 mM y glicerol 15% v/v. El pH se ajustó a 6,5 con KOH. Se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C hasta su uso.

#### **M.4.2.2. Transformación de células competentes**

Las células competentes se descongelaron lentamente en baño de hielo, justamente después se añadió 1 µl por cada 10 µl de células competentes de una solución de β-mercaptoetanol al 1,8%, y se mantuvo en hielo durante 10 min. Transcurrido este tiempo, a cada DNA plasmídico o mezcla de ligación, se le añadieron 50 µl de células competentes y se incubó en hielo durante 30 min. La mezcla de células competentes y DNA se sometió a un tratamiento de choque térmico de 37°C durante 3 min, entonces rápidamente se incubó en hielo durante 2 min. Posteriormente se añadieron 0,5 ml de LB y se incubó a 37°C durante 40-60 min con agitación suave. El tiempo de recuperación con LB varió en función del antibiótico de resistencia utilizado. Para ampicilina fue suficiente con 40 min, mientras que para kanamicina se hizo necesario

recuperar durante 50-60 min. Por último, se inoculó la mezcla de transformación en medio LB de selección.

## **M.5. Determinación de actividades enzimáticas**

### **M.5.1. Actividad NAD(P)H de ARC**

La reducción de HAP o Benzamidoxima se determinó mediante la incubación en condiciones aeróbicas a 37°C en un baño de agua con agitación. A menos que se indique lo contrario, las mezclas de incubación estándar del sistema contenían 100 pmol crARC, 10 pmol Cytb5-R, crCysJ ó NR, 100 pmol Cytb5-1, b5-2, b5-3, b5-4 ó b5-5 (con NR no hacía falta b5), 0,5 mM de HAP ó 1 mM benzamidoxima, 1 mM de NADH o NADPH, 15 µl de tampón fosfato 1M a pH 6,5 y cuando la reacción tiene Cytb5-1 se le añade 1mM de ZnCl<sub>2</sub> (mejora 10 veces la actividad), siendo en todos los casos el volumen final de 150 µl.

Después de la preincubación durante 3 minutos a 37°C, la reacción se iniciaba con la adición de NADH o NADPH y se terminaba tras 15 minutos por la adición de metanol a una concentración final del 15 %. Las proteínas precipitadas se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

### **M.5.2. Actividad BVH-ARC (Bencil Viológeno con ARC)**

La actividad directa de ARC con bencil viológeno se determinó de la siguiente manera:

La reducción de benzamidoxima y HAP por ARC se realizó mediante incubación a 37°C con agitación en un baño de agua. La mezcla de incubación contenía ARC 100 pmol, 1 mM Benzamidoxima o 0,5 mM de HAP, 2 mM bencil viológeno, 3 mM de ditionito, y en caso de que se midiera la inhibición por nitrito se añadieron diferentes concentraciones de nitrito, toda esta mezcla

también llevaba 100 mM de fosfato potásico a pH 7,4. Una vez que preincubamos a 37°C durante 3 min, añadimos el ditionito para comenzar la reacción y la terminamos a los 15 minutos al añadir 15% metanol. Las proteínas precipitadas se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante se analizó por la técnica correspondiente de HPLC.

### **M.5.3. Actividad NAD(P)H-Nitrato Reductasa (NAD(P)H-NR)**

La actividad se determinó *in vitro* empleando extractos crudos, obtenidos por congelación/descongelación y por rotura con escisión por pipeteo, en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (Fernandez and Cardenas, 1982a). La actividad NAD(P)H-NR se determinó midiendo el nitrito que aparecía en el medio de reacción como resultado de la reducción enzimática del nitrato. Como donador de electrones se utilizó NADPH (Paneque and Losada, 1966).

Para la determinación de la actividad se mezclaron 100 µl de extracto crudo junto con 50 µl de agua destilada y 100 µl de una mezcla de reacción que contenía: 2 volúmenes de Tris-HCl 0,5 mM a pH 7,5; un volumen de KNO<sub>3</sub> 100 mM y un volumen de NADPH 3 mM disuelto en Tris-HCl 50 mM a pH 7,5. La reacción comenzó con la adición de la mezcla de reacción y se desarrolló a 30°C durante 30 min. El nitrito producido se determinó colorimétricamente (Snell and Snell, 1948), utilizando como blanco muestras en las que la reacción se paró a tiempo inicial.

### **M.5.4. Actividad BVH-NR**

La actividad BVH-NR se determinó *in vitro* con extractos obtenidos por congelación/descongelación en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (Fernandez and Cardenas, 1982a). Los ensayos de actividad se realizaron midiendo colorimétricamente el nitrito producido durante la reacción. Como donador de electrones se utilizó bencil viológeno reducido químicamente con ditionito (Paneque and Losada, 1966).

La reacción se llevó a cabo añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de extracto celular a 150  $\mu\text{l}$  de una mezcla de reacción que contenía: Tris-HCl 0,25 M, pH 7,5;  $\text{KNO}_3$  25 mM y bencil viológeno 5 mM. El inicio de la reacción se produjo con la adición de 5,7  $\mu\text{mol}$  de ditionito disuelto en el tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0 y se desarrolló a 30  $^\circ\text{C}$  durante 10 min. La reacción se detuvo por oxidación del ditionito, mediante agitación brusca de los tubos de ensayo. El nitrito producido se determinó colorimétricamente (Snell and Snell, 1948), tomando como blanco muestras en las que la reacción se detuvo al tiempo inicial.

#### **M.5.5. Determinación de la actividad NAD(P)H de flavin reductasas**

La actividad NAD(P)H flavin reductasas se midió a través de dos métodos, mediante la reducción de FeCN (ferricianuro de potasio), que actúa como un aceptor de electrones artificial o por la reducción de Cytb5.

La actividad de Cytb5-R y crCysJ con FeCN se ensayó como se describió previamente (Strittmatter, 1957). La mezcla de reacción contenía 0,1 M de tampón fosfato potásico (pH 7,5), 0,112 mM NADH o NADPH, FeCN 0,2 mM, y la concentración apropiada de enzima en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició por la adición de NADH o NADPH, y la reducción de FeCN fue seguida por la cinética de la reacción midiendo la disminución que se producía de la absorbancia a 420 nm.

La actividad enzimática fue calculada utilizando el coeficiente de extinción de  $1,02 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Schellenberg and Hellerman, 1958). Una unidad de actividad reductasa se define como la cantidad de enzima que produce la reducción de 1  $\mu\text{mol}$  de FeCN por minuto.

La actividad de Cytb5-R y crCysJ en presencia de Cytb5 se comprobó haciendo uso del método de Strittmatter y Velick (Strittmatter and Velick, 1956). La mezcla de reacción utilizada fue tampón 0,1 M de fosfato potásico

(pH 6,8), 0,112 mM NADH o NADPH, 2 nmol de Cytb5 purificada, y la cantidad apropiada de Cytb5-R o crCysJ, en un volumen final de 1 ml, a 25 ° C. La reacción se inició por la adición de NADH o NADPH. El desarrollo de la reacción fue seguido por el aumento de la absorbancia a 423 nm. El coeficiente de extinción molar aumenta entre las formas reducida y oxidada de Cyt b5, por eso se estableció como coeficiente de extinción molar 100 mM<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>. Para los cálculos tuvimos en cuenta que una unidad de reductasa se define como la cantidad de reductasa que cataliza la reducción de 1 mol de Cytb5 por minuto.

## **M.6. Medidas de Óxido Nítrico (NO)**

### **M.6.1. Cuantificación de NO mediante fluorescencia medida con DAF-FM DA**

Las células cultivadas en medio TAP fueron concentradas (10 millones de células por ml) e inducidas en un medio que contenía 5 mM de nitrito durante 3 h. En el transcurso de estas 3 horas, se añadió un control para comprobar que la fluorescencia obtenida era debida al óxido nítrico, el compuesto utilizado fue el PTIO. El PTIO es capaz de reducir el NO a nitrito.

Antes de la medida (30 min) se aplicó el DAF-FM DA (1 μM; Invitrogen Molecular Probes) (Kojima et al., 1998). Estas células (200 μl) fueron transferidas a una placa negra de 96 pocillos (Perkin-Elmer OptiPlate-96 Black Opaque 96-well Life Sciences) para la medición de la fluorescencia. Las medidas fueron tomadas en un lector de microplacas (Tecan SpectraFluor Plus). Las longitudes de onda de excitación y emisión registradas fueron 495 y 515 nm, respectivamente. En cada placa se realizaron al menos 3 réplicas por condición.

### M.6.2. Cuantificación de NO mediante el Analizador de Óxido Nítrico (NOA)

El analizador de óxido nítrico utilizado en este trabajo fue un Sievers Nitric Oxide Analyzer 208i (GE). El NOA nos permitió monitorizar la producción de óxido nítrico en continuo, ya que es capaz de detectar el óxido nítrico mediante la reacción llevada a cabo entre el óxido nítrico y ozono, el producto de esta reacción contiene un electrón excitado que a medida que pierde esta excitación emite una energía en la longitud de onda del Infrarojo cercano. Por eso, este método se basa en el análisis de óxido nítrico mediante el registro de la quimioluminiscencia.



**Figura M.1.** Bote específico para medir óxido nítrico. Adaptado de (Sparacino-Watkins et al., 2014).

Se tuvo que fabricar un bote específico que permitió medir la producción de óxido nítrico con NR y crARC (Figura M.1). Este bote contiene 1 boca lateral que permite la entrada del gas portador arrastrando todo el espacio de cabeza, y otra boca que permite la salida del gas portador con todos los gases del espacio de cabeza, esta salida del gas va directamente al analizador para su detección. En la parte superior de este bote hay una boca mayor que se sella con un cierre de goma. Este cierre de goma sirve para poder añadir, con jeringa y aguja, todo lo que se necesite durante la reacción, sin tener que perder la anaerobiosis.

Se utilizó nitrógeno como gas portador a una presión aproximada de 6,7 Torr, y una presión de oxígeno para la producción de ozono de 6,1 psi para todos los ensayos analizados de óxido nítrico (NOA). (Sparacino-Watkins et al., 2014).

## **M.7. Aislamiento de ácidos nucleicos**

### **M.7.1. Extracción de RNA total de *Chlamydomonas***

Las células de 50 ml de cultivo fueron cultivadas en las condiciones de interés y se recogieron por centrifugación a 3000 x g durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 800 µl de tampón de lisis, que contenía 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 0,3 M de NaCl y 5 mM de EDTA. Seguidamente, se añadió SDS en una concentración final del 2% y se agitó por inversión unas 8-10 veces. Llegados a este paso, cabían dos opciones: congelar las mezclas a -80 °C para su almacenamiento y posterior extracción, o bien mantenerlas a 4°C durante unos 5-10 min para favorecer la lisis antes de empezar con la extracción.

Para el procesamiento de las muestras se hicieron extracciones con mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) saturada con 50mM Tris-HCl a pH 4.3 , tantas veces como fuese necesario, hasta que la interfase quedara totalmente limpia. A continuación, se procedió a extraer con

cloroformo saturado con agua. Tras lo cual, se añadió LiCl hasta alcanzar una concentración final de 4 mM. Se incubó al menos 4 h a 4°C y se centrifugó a esta misma temperatura a 15.000 x g durante 30 min, obteniéndose un precipitado de RNA y un sobrenadante en el que se encontraba el DNA genómico. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se volvió a centrifugar a 15.000 x g durante 30 min, tras este tiempo retiramos el sobrenadante y por último, el pellet fue resuspendido en 35 µl de agua miliQ estéril.

### **M.7.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *Escherichia coli* mediante lisis alcalina**

Se utilizaron 1,5 ml de cultivo bacteriano en fase estacionaria de crecimiento que se centrifugaron a 15.000 x g durante 1 min. El precipitado obtenido se resuspendió en 175 µl de una solución que contenía: 50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl (pH 8,0) y 10 mM de EDTA. Tras incubarlo durante 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 175 µl de una solución 0,1 M de NaOH y 1% de SDS. El tubo que contenía la mezcla se agitó suavemente y se incubó 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 175 µl de una solución fría de 5 M de acetato potásico (pH 4,8) y se agitó suavemente varias veces por inversión. La mezcla resultante se centrifugó a 15.000 x g, en una microcentrífuga, a 4°C durante 10 min. El precipitado recogido, que contenía los restos celulares, se desechó, y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo al que se añadieron dos volúmenes iguales de etanol al 95%, para precipitar el DNA. Este tubo se incubó durante 20 min a una temperatura de -20 °C y se centrifugó a 4°C y 15.000 x g, y el precipitado adquirido se lavó con etanol al 70%. Después de centrifugar nuevamente, el DNA precipitado se dejó secar al aire y se disolvió en 30 µl de agua. El rendimiento medio conseguido fue de 3 a 5 µg de DNA por ml de cultivo.



## **M.8. Cuantificación, Manipulación y Tratamientos Enzimáticos de ácidos nucleicos**

### **M.8.1. Cuantificación de ácidos nucleicos**

Los ácidos nucleicos se cuantificaron siguiendo alguno de los procedimientos que se detallan a continuación.

#### **M.8.1.1. Cuantificación espectrofotométrica**

Espectrofotométricamente, los ácidos nucleicos se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm y teniendo en cuenta para los cálculos que el coeficiente de extinción molar del DNA bicatenario es  $50 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{ml}$ , el del DNA monocatenario es  $30 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{ml}$  y el del RNA,  $40 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{ml}$ . Generalmente, se prepararon diluciones 1:100 en agua de las preparaciones de ácidos nucleicos cuya concentración se pretendía determinar. Además, se realizaron mediciones de absorbancia a 320 nm y 280 nm, que permitieron determinar la presencia de contaminantes de naturaleza glucídica y proteica en las muestras, y a 260 y 280 nm cuya razón nos permite conocer la calidad del ácido nucleico aislado.

#### **M.8.1.2. Cuantificación electroforética.**

La electroforesis de los DNAs en geles de agarosa permite estimar la concentración de ácidos nucleicos de forma visual y semicuantitativa, por comparación de los valores de fluorescencia obtenidos por la unión del bromuro de etidio, respecto a la mostrada por patrones de DNA de concentración conocida (DNA del fago  $\lambda$ ).

### **M.8.2. Electroforesis en geles de agarosa**

#### **M.8.2.1. Separación de fragmentos de DNA**

Los fragmentos de DNA se separaron atendiendo a su tamaño en geles de agarosa normalmente que tenían una concentración de entre 0,6 y 2% en tampón 1 x TAE y  $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$  de bromuro de etidio para visualizar los ácidos nucleicos mediante un transiluminador de luz UV. El porcentaje de agarosa se

modificó para cada caso según el tamaño de los fragmentos que nos interesaran separar (Sambrook et al., 1989). Antes de proceder a cargar las muestras en el gel, se les añadieron 1 µl de una solución de carga por cada 10 µl de muestra. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales a un voltaje constante de 2-5 voltios/cm.

Solución TAE 50X: Tris base 242 g/l; ácido acético glacial 57,1 ml/l y EDTA 50 mM (100 ml de una solución EDTA 0,5 M, pH 8,0).

Solución de carga 10X: 0,25% azul de bromofenol; 0,25% azul de xilenocianol; 50% glicerol.

#### **M.8.2.2. Visualización de los ácidos nucleicos**

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se visualizaron mediante iluminación con luz UV de onda corta (254 nm), o de onda larga (366 nm) cuando se requería aislar algún fragmento de DNA del gel. Los datos se analizaron con un sistema de imágenes Gel Doc 2000 (Bio-Rad) conectado a un PC, utilizando para ello el software Quantity One® 4.1 (Bio-Rad). Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador comercial 1 kb Ladder plus (Invitrogen).

#### **M.8.2.3. Rescate de DNA de geles de agarosa mediante congelación**

El fragmento cortado del gel de agarosa que contenía el DNA de interés se congeló a -80°C durante un tiempo mínimo de 10 min. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 15.000 x g a temperatura ambiente. En este proceso, la pieza de agarosa se compacta en el fondo del tubo quedando un sobrenadante que contiene el DNA de interés. En los casos en que el proceso de purificación diluyó mucho la muestra la preparación de DNA se concentró mediante precipitación con etanol.

### **M.8.3. Digestión de moléculas de DNA**

Los tratamientos de DNA con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones recomendadas por los fabricantes (GE Healthcare, Roche, Takara) tanto en lo referente al tampón como a la temperatura.

La digestión de plásmidos y fragmentos pequeños de DNA se llevó a cabo utilizando 2-5 U de enzima/ $\mu\text{g}$  de DNA. Los tiempos utilizados fueron de 1-3 h. En los casos necesarios se añadió 1  $\mu\text{g}$  RNasa (libre de DNasa) por cada  $\mu\text{g}$  de DNA a digerir.

### **M.8.4. Desfosforilación de extremos de moléculas de DNA**

La desfosforilación de DNA, para disminuir la frecuencia de religación no deseada, se llevó a cabo mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Boehringer Mannheim). Se utilizó 1 U de enzima por cada 50 ng de DNA, incubándose con el tampón suministrado por el fabricante al 1X a 37°C durante 30-60 min. Para comprobar que el DNA no se había degradado y eliminar la enzima, los fragmentos de DNA tratados se cargaron en un gel de agarosa y se purificaron como se detalla en el punto 8.2.

### **M.8.5. Clonación de moléculas de DNA**

#### **M.8.5.1. Ligación de fragmentos de DNA generados mediante enzimas de restricción**

La ligación se realizó utilizando la enzima T4 DNA ligasa en el tampón suministrado por la casa comercial (Roche) y siguiendo las instrucciones recomendadas. Las ligaciones se llevaron a cabo a 14°C durante un tiempo de 4 a 16 h para las ligaciones de extremos cohesivos y de 12-16 h para las ligaciones de extremos romos.

#### **M.8.5.2. Ligación de fragmentos de DNA generados mediante PCR**

La clonación de fragmentos generados por PCR usando polimerasas de DNA con actividad adenosina transferasa terminal, se realizó mediante la ligación de los mismos con el vector pGEM-T, utilizando para ello el sistema comercial “pGEM®-T Vector Systems” (Promega) y siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. En algunas ocasiones se empleó para la clonación de este tipo de fragmentos el vector “pSpark® I DNA Cloning Systems” (Canvax), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

Los fragmentos de DNA generados por PCR con enzimas “Proof Reading”, sin actividad adenosina transferasa terminal, fueron clonados en el vector pBK digerido con la enzima de restricción EcoRV, que deja extremos romos.

#### **M.8.6. Secuenciación de DNA**

La secuenciación del DNA fue llevada a cabo por el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, en secuenciadores automáticos (modelo ABI 377; Applied Biosystems, Perkin-Elmer Co.), empleando terminadores marcados con cromóforos fluorescentes y cebadores adecuados para cada caso, de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el fabricante.

#### **M.9. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La obtención de fragmentos de DNA mediante amplificación por PCR se llevó a cabo en distintos termocicladores dependiendo del tipo de experimento que se hiciese: TGradient (Biometra); Mastercycler® (Eppendorf); iCycler (Bio-Rad).

### M.9.1. PCR estándar

Para estas amplificaciones se empleó una Taq polimerasa termoestable (Biotoools) con el tampón recomendado por el fabricante y las condiciones de reacción que se indican en la tabla M.5. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl que contenía: 1 X tampón de DNA polimerasa; 0,4 mM de cada dNTP; 0,2 pmoles de cada cebador; 0,5 U de polimerasa. Los cebadores utilizados en cada reacción se detallan en el apartado 16.

La cantidad de DNA molde utilizada fue de 10 ng de DNA plasmídico o DNA de pequeño tamaño. En las amplificaciones de DNA genómico se utilizaron 100 ng de DNA y 2% de DMSO (Dimethyl Sulfoxide). Para realizar la PCR a partir de una colonia (PCR de colonias) se recogió una colonia con un palillo estéril y se resuspendió en 50 µl de agua destilada (en el caso de colonias bacterianas) o 50 µl de una solución de DMSO al 5% en agua (en el caso de colonias de *Chlamydomonas*), se calentó durante 10 min a 96°C, se enfrió en hielo 5 min y se centrifugó durante 5 min a 15.000 x g. Como molde para la PCR se utilizaron 5 µl de sobrenadante.

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	
Desnaturalización inicial	96°C	5 min	
Desnaturalización	96°C	60 s	
Unión de Cebadores	T <sub>m</sub>	30 s	35 ciclos
Extensión	72°C	T <sub>ex</sub>	
Extensión Final	72°C	10 min	

**Tabla M.5.** Condiciones usadas en la PCR estándar. T<sub>m</sub>, la temperatura de unión de los cebadores utilizada fue optimizada mediante la realización de una PCR previa en la que se probaron al menos 10 temperaturas diferentes cercanas de la recomendada por el fabricante de los cebadores (Invitrogen, Isogen); T<sub>ex</sub>, el tiempo de extensión usado correspondió a 1 min por cada kb a amplificar.

### **M.9.2. PCR con Polimerasa de alta fidelidad**

En los casos en los que se requirió una mayor fidelidad de copia en la amplificación, se utilizó el kit “CERTAMP-Amplification kit”, (Biotools) que contenía una mezcla de enzimas, una Taq polimerasa normal y una polimerasa que posee actividad correctora exonucleasa 3'-5'. También se usó la polimerasa de alta fidelidad “iProof” (BioRad). En el caso de esta última se utilizó el buffer de alta fidelidad (HF) cuando la amplificación era sobre vector, y el buffer para regiones ricas en guanina y citosina (GC) cuando era sobre DNA genómico o cDNA. En ambos casos los reactivos utilizados y las concentraciones de los mismos fueron las descritas por el fabricante.

### **M.9.3. Síntesis de cDNA**

El RNA obtenido de la forma que se indica en el apartado 7.1, se sometió a transcripción inversa con la enzima “Superscript II Reverse Transcriptase” (Invitrogen), siguiendo en todo caso las instrucciones suministradas por el fabricante.

Para la síntesis de cDNA, se añadieron 1-3 µg de RNA total a una mezcla que contenía agua, 1 µl de cebador Q<sub>T</sub> u Oligo(dT) 10 µM y 1 µl de dNTPs 10 mM. Dicha mezcla se calentó a 65°C durante 5 min y posteriormente se enfrió en hielo. A continuación, se añadieron 6,5 µl de una solución de retrotranscripción que contenía, para un volumen final de 20 µl: 4 µl de tampón Superscript II RT © 5 X; 1 µl DTT 100 mM; 1 µl inhibidor de RNasa (20 U/ml) o agua en su defecto, y 0,5 µl de la enzima Superscript II RT (2 U/µl). La retrotranscripción se realizó en un termociclador con el siguiente programa: 25°C 5 min; 42°C 50 min; 50°C 10 min; 70°C 15 min.

Para la síntesis de DNA copia con la enzima iScript™ (alta fidelidad) se añadieron 1-3 µg de RNA a una mezcla que contenía agua, 4 µl de “iScript™ select reaction mix”, 2 µl de Oligo(dT) 10 µM y 1 µl de “iScript

reverse transcriptase". La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador siguiendo este programa: 42°C 60-90 min, 85°C 5 min. El cDNA sintetizado fue almacenado hasta su uso a -20°C.

#### **M.9.4. PCR cuantitativa a tiempo real**

La técnica de PCR cuantitativa a tiempo real permite cuantificar la cantidad de mRNA correspondiente a un gen determinado en una muestra a través de la medida de la fluorescencia que emita el amplicón correspondiente a ese gen. Esta cuantificación se consigue mediante la medida del incremento de fluorescencia durante la fase exponencial de la PCR en cada ciclo de amplificación.

La cuantificación a tiempo real de la expresión de un gen se basa en el cálculo del ciclo umbral (Ct), que se define como el número de ciclos al cual la fluorescencia es estadísticamente significativa sobre el ruido de fondo. Este valor de Ct es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias iniciales de un gen. El resultado obtenido es normalizado frente al obtenido con un gen control (de expresión constitutiva) amplificado en las mismas condiciones. En este trabajo, el gen que se ha tomado como control es una ubiquitina ligasa de *Chlamydomonas*, cuya expresión no se ve alterada por la variación en la fuente de N o C (Gonzalez-Ballester et al., 2004). Si los valores de Ct del gen de estudio son menores que los obtenidos en el control, indicaría una mayor abundancia de ese gen sobre el de control.

El cDNA correspondiente a cada muestra de RNA se sintetizó como se describe en el apartado 9.3.

Aunque existen varias estrategias de emisión de fluorescencia detectable en la PCR a tiempo real, en este trabajo se usó el fluoróforo SYBR Green I (10,000 X en DMSO, Molecular Probes/ Leiden, The Netherlands) en el caso de RT-PCR con mezcla de reacción casera o el fluoróforo EvaGreen®

(BioRad) en los casos en los que se empleó el kit comercial “SsoFast EvaGreen® Supermix”. Ambos compuestos emiten fluorescencia cuando se intercalan en la doble hebra de DNA, perdiendo esta capacidad cuando el DNA se encuentra en cadena sencilla.

Todas las reacciones de PCR se realizaron en placas de 96 pocillos en un termociclador iCycler® de BioRad. En cada placa se incluyeron muestras controles paralelas a las experimentales para normalizar los datos obtenidos en la PCR cuantitativa. Por tanto, cada placa incluía, además de las muestras problema por triplicado, un número igual de muestras correspondientes al control de referencia (ubiquitina ligasa), utilizando en todos los casos los mismos reactivos y condiciones de PCR que los que se emplearon en las muestras problema. En todas las placas se incluyeron al menos dos muestras sin cDNA, que fueron tomadas como control negativo.

#### **M.9.4.1. Diseño de cebadores y especificidad de las reacciones**

Dado que los RNAs no fueron tratados con DNAsa, los cebadores se diseñaron para amplificar específicamente sobre los cDNAs y evitar la amplificación de DNA genómico. Para ello, el extremo 3' de uno de los cebadores de cada pareja estaba diseñado entre dos exones del gen estudiado. La especificidad de los cebadores fue comprobada corroborando que el tamaño de la banda amplificada correspondía al del cDNA sin intrones. Para más seguridad, todas las bandas fueron secuenciadas. La secuencia de los cebadores se muestra en la Tabla M.10.

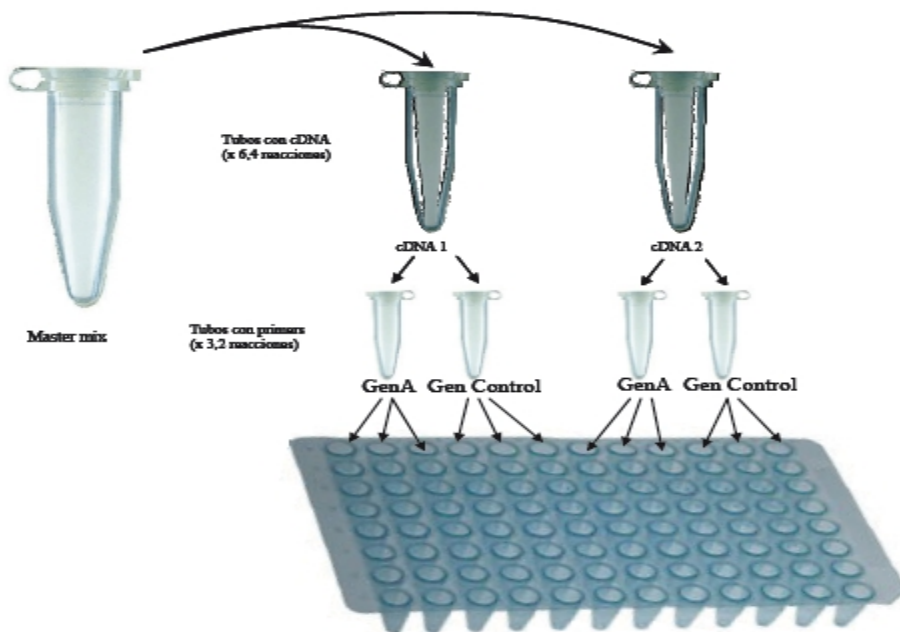
La optimización de los cebadores se realizó mediante un gradiente de temperatura de hibridación (50-70°C). La eficiencia de cada pareja de cebadores se determinó a su temperatura óptima mediante el cálculo de la pendiente de una curva de dilución estándar (Bustin et al., 2009). La especificidad de las reacciones de PCR fue comprobada mediante un



programa diseñado para determinar la curva de fusión que consistía en un calentamiento de las muestras desde 60 a 100°C, a una velocidad de 0,5° C/s, midiendo de forma continua la fluorescencia. Cada curva de fusión era característica de una banda amplificada. La especificidad también se comprobó mediante análisis electroforético en geles de agarosa al 4%, una vez determinado el tamaño en el gel, se mandaba a secuenciar para verificar que era nuestro gen el que producía la amplificación. Sólo en el caso de coincidir los datos de las curvas de fusión, tamaño de la banda amplificada y una secuenciación positiva se procedía al análisis de los valores de Ct.

#### M.9.4.2. RT-PCR a tiempo real con mezcla de reacción casera

Siguiendo el esquema de la Figura M.2 se procedió a la realización de las PCR a tiempo real con la mezcla de reacción casera.



**Figura M.2.** Esquema de la preparación de una placa para RT-PCR.

Las muestras se mantenían en hielo para evitar el funcionamiento de la Taq polimerasa. La mezcla de reacción denominada “master mix” se preparó como se indica en la Tabla M.6. Aunque el volumen final de reacción fue de 25 µl, todas las reacciones están calculadas para un volumen de 26,7 µl, con el fin de eliminar los errores por pipeteo.

Una vez preparada la mezcla se añadieron 153,6 µl a los tubos que contenían 6,4 µl del cDNA a amplificar. El volumen de “master mix” necesario fue calculado a partir del número de cDNAs distintos a amplificar (N).

<b>Mezcla de reacción para N reacciones</b>	
Tampón de PCR 10 x (Biotools)	N x 17,4 µl
dNTPs 10 mM	N x 3,5 µl
Biotools DNA polimerasa	N x 2,8 µl
SYBR-Green (1/10000 en DMSO)	N x 4,35 µl
H <sub>2</sub> O	N x 125,6 µl
<b>Volumen final = N x 153,6 µl</b>	

**Tabla M.6.** Composición de las reacciones de PCR a tiempo real.

Posteriormente, y como se indica en la Figura M.2, la mezcla preparada con el cDNA se repartió en partes iguales (76,8 µl) en dos tubos que contenían 3,2 µl de una mezcla 10 mM de los cebadores Upper y lower. Uno de los tubos contenía los cebadores específicos del gen a estudiar y otro de ellos los cebadores específicos del gen control ubiquitina ligasa. Por último, la mezcla de PCR resultante (para tres reacciones) se repartió en las placas de 96 pocillos (BioRad), de forma ordenada y evitando la formación de burbujas que impidieran una correcta detección de la fluorescencia.

Posteriormente la placa se cubría con una lámina transparente de plástico (BioRad). La PCR se realizó siguiendo el programa que se detalla a continuación (Tabla M.7.).

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	30 s	50 ciclos
Unión de Cebadores	T <sub>m</sub>	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Conservación	4°C	Indefinido	

**Tabla M.7.** Condiciones de amplificación utilizadas en la PCR a tiempo real. La T<sub>m</sub> es la correspondiente para cada uno de los cebadores.

#### M.9.4.3. RT-PCR a tiempo real con el kit comercial “SsoFast™ EvaGreen® Supermix” (BioRad)

Para la utilización de dicho kit se siguieron las indicaciones proporcionadas por el fabricante (Tabla M.8). El esquema que se siguió en este caso fue el mismo que en el caso anterior (Figura M.2), salvo por el hecho de que se llevaron a cabo las reacciones con un volumen final de 10 µl. El SsoFast de EvaGreen Supermix ya contenía los dNTPs, el tampón, la polimerasa y el fluoróforo, lo cual simplificó su uso.

La PCR se realizó siguiendo el programa siguiente (Tabla M.8.).

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	
Desnaturalización inicial	95°C	30 s	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	5 s	35-40 ciclos
Unión de Cebadores	T <sub>m</sub>	20 s	
Extensión	65-95°C	Continuo	
Conservación	4°C	Indefinido	

**Tabla M.8.** Condiciones de amplificación utilizadas en la PCR a tiempo real con kit comercial. La T<sub>m</sub> es la correspondiente para cada uno de los cebadores. Se probaron a diferentes temperaturas.

#### **M.9.4.4. Análisis, normalización y validación de los datos**

Para la validación de los datos, se les determinaron las correspondientes curvas de fusión de los productos de amplificación y se analizaron por electroforesis para comprobar el tamaño de la banda. Una vez comprobado el tamaño de la banda se mandaba a secuenciar para ratificar que era nuestro transcrito. Sólo en el caso de coincidir los datos de las curvas de fusión, tamaño de la banda amplificada con lo esperado y secuenciación se procedía al análisis de los valores de Ct.

Los valores de Ct de cada una de las reacciones se obtuvieron automáticamente con el programa iCycler™ iQ versión 3.0 (BioRad), a partir de los valores obtenidos de la intersección de las curvas de amplificación con una línea base. El valor de esta línea base fue fijado para todos los experimentos realizados. Debido a que todas las amplificaciones (tanto problema como control) fueron realizadas por triplicado, se tomó como valor final la media de los Ct obtenidos en las tres repeticiones.

Los valores de Ct obtenidos para cada una de las muestras analizadas fueron normalizados frente a los valores de Ct del gen constitutivo (ubiquitina ligasa). La normalización se llevó a cabo según la siguiente fórmula (Pfaffl, 2001).

Incremento de expresión =  $2^{-\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen constitutivo}$ .

De esta fórmula se deduce que al gen control se le da valor de expresión 1. Si el valor obtenido para el gen problema es mayor de 1, este gen se expresa más que el control. Si el valor obtenido es menor de 1, éste se expresa menos que el control.

**M.10. Estrategia de silenciamiento mediante miRNA**

Esta estrategia se basa en el silenciamiento específico de genes mediante microRNA publicado por Molnar (Molnar et al., 2009) que consiste en formar una horquilla con una secuencia específica del gen que se quiere silenciar. Para diseñar los oligos se empleó la página (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Se trataron de dos oligos de 90 nt.

En primer lugar estos oligos se hibridaron. Para ello se resuspendieron en agua estéril a una concentración de 100  $\mu$ M. De esta mezcla se tomaron 10  $\mu$ l y se les añadieron 20  $\mu$ l del tampón 2X: 20 mM Tris, pH 8.0, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl. Se hirvió esta mezcla en un baño de agua durante 5 minutos y se dejó enfriar gradualmente durante toda la noche.

A continuación se llevó a cabo la fosforilación de los oligos hibridados mezclando 1  $\mu$ l de éstos con 1  $\mu$ l de buffer 10x de la enzima T4 DNA ligasa de Roche (el buffer de la quinasa PNK no funciona), 1  $\mu$ l de quinasa PNK y 7  $\mu$ l de agua estéril e incubando la mezcla resultante a 37°C durante 30 min. Posteriormente, la quinasa se desactivó calentándola a 65°C durante 20 min.

Por otro lado, se digirió el vector pChlamiRNA3 con la enzima de restricción *SpeI* y se desfosforiló añadiendo a 28  $\mu$ l de vector digerido, 10  $\mu$ l de fosfatasa y 4,2  $\mu$ l de buffer fosfatasa alcalina del intestino de ternera (Boehringer Mannheim), e incubando esta mezcla a 37°C durante 30 min. Se cargó en gel de agarosa y se purificó como se ha indicado en el apartado 8.2.

Finalmente se ligaron el vector digerido y desfosforilado y los oligos hibridados y fosforilados mezclando: 1  $\mu$ l de vector desfosforilado, 1  $\mu$ l dilución 1:10 oligo desfosforilado, 6,5  $\mu$ l agua, 1  $\mu$ l buffer y 1  $\mu$ l T4 DNA ligasa, ambos de Roche. Esta mezcla se incubó a 24°C durante toda la noche.

Con esta construcción se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ F' según de la forma en que se indica en el apartado 4.2.2. Se purificó el DNA siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.2., se digirió con *KpnI* y se transformó la estirpe parental 704 de *Chlamydomonas*, usando perlas de vidrio y PEG como se indica en el apartado 4.1.

## **M.11. Expresión de proteínas en Escherichia coli**

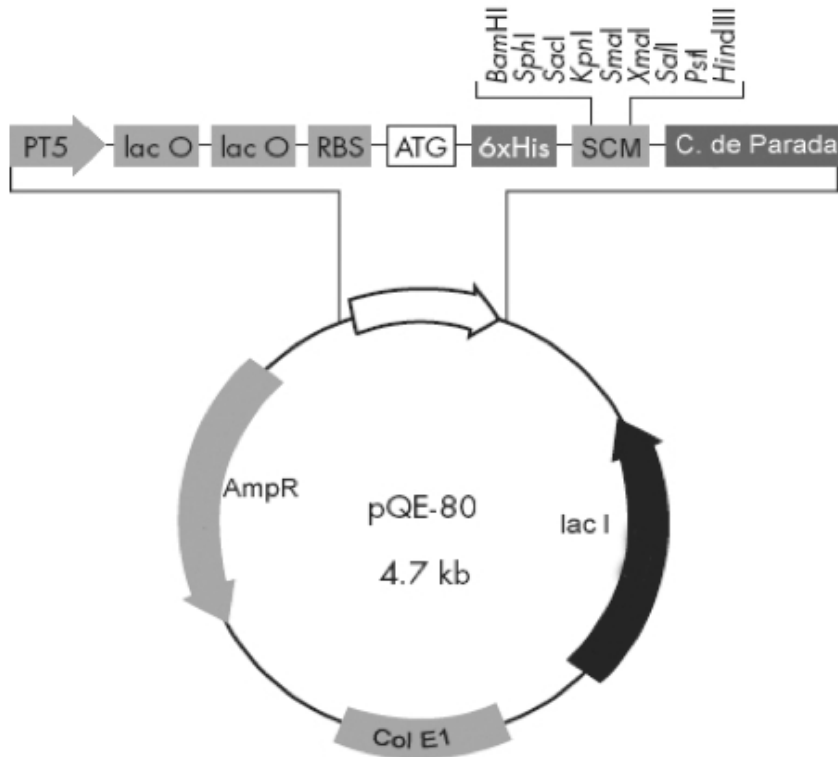
### **M.11.1. Expresión de CrARC y mutantes puntuales**

La proteína ARC, citb5-1, citb5-2, citb5-3, citb5-4, citb5-5, citb5-R, NR, crCysJ, hmARC1 y hmARC2 se expresaron en células de *E. coli* (BL-21 o TP1000 (para proteínas con Moco)) para su posterior purificación y realización de ensayos de actividad.

#### **M.11.1.1. Clonación de crARC en pQE80L (como ejemplo de clonación)**

El cDNA crARC de *Chlamydomonas* de 990 pb fue amplificado usando los cebadores crARC5BamHI y crARC3HindIII y se clonó en pSpark. Seguidamente, este cDNA fue clonado en pQE80L (Figura M3) (Qiagen) y digerido con las mismas enzimas de manera que el cDNA quedó en la misma fase de lectura que el codón de inicio.

A continuación se transformó la estirpe DH5 $\alpha$ F' de *E. coli*, de la cual obtuvimos grandes cantidades del vector. Este DNA plasmídico nos sirvió para transformar la estirpe de TP1000 de *E. coli* con el fin de conseguir la expresión de la proteína con 6 residuos de histidina en su extremo N-terminal.



**Figura M.3.** Representación esquemática del vector pQE-80. PT5, promotor T5 inducible por IPTG; lac O, operador lac; RBS, sitio de unión del ribosoma; ATG, codón de inicio; 6xHis, secuencia correspondiente a 6 residuos de histidina en tándem; SCM, sitio de clonación múltiple con sitios diana para las enzimas indicadas; C. de parada, codones de parada para las tres posibles pautas de lectura; Col E1, origen de replicación, AmpR, gen de resistencia a ampicilina.

### M.11.1.2. Clonación de crARC mutantes puntuales en pQE80L

Para la amplificación del cDNA se utilizaron los cebadores necesarios para cada mutación (mutación en cisteínas: crARC5C15 y crARC3C15, crARC5C137 y crARC3C137, crARC5C243 y crARC3C243, crARC5C249 y crARC3C249, crARC5C249 y crARC3C249, crARC5C252 y crARC3C252, crARC5Cdm y crARC3Cdm (doble mutante C249 y C252)) y resto de mutaciones como (CrARCG17Af y CrARCG17Ar, CrARCW128Af y CrARCW128Ar, CrARCL139Af y CrARCL139Ar, CrARCD182Af y

CrARCD182Ar, CrARCF210Af y CrARCF210Ar, CrARCR211Af y CrARCR211Ar, CrARCN213Af y CrARCN213Ar, CrARCE224Af y CrARCE224Ar, CrARCD225Af y CrARCD225Ar, CrARCW227Af y CrARCW227Ar, CrARCE267Af y CrARCE267Ar, CrARCP268Af y CrARCP268Ar, CrARCL272Af y CrARCL272Ar, CrARCR276Af y CrARCR276Ar), los cuales contenían el cambio de aa (aminoácidos) para producir la mutación puntual deseada para cambiar de aa. Se realizó una primera PCR con cada cebador de los anteriores con el respectivo de estos dos (crARC5BanHI o crARC3HindIII) que produjo 2 fragmentos de distinto tamaño dependiendo del aminoácido que se mutara, manteniendo siempre la suma de los 2 resultantes a 990pb. Utilizando los fragmentos obtenidos juntos como molde, se realizó una segunda PCR con los cebadores de los extremos de crARC (crARC5BamHI y crARC3HindIII) obteniendo, de esta forma, el fragmento de 990pb con la mutación que buscábamos. El cDNA amplificado, de 990 pb, se clonó de la misma manera que la versión original crARC.

#### **M.11.1.3. Clonación de citb5s y CysJ de *Chlamydomonas***

Los cDNAs de los citocromos b5s y CysJ de *Chlamydomonas* y citb5s de humanos fueron amplificados usando los cebadores, para citb5-1 son Citb515SacI y Citb513Sall, para citb5-2 son Citb525SacI y Citb523Sall, para citb5-3 son Citb535SacI y Citb533PstI, para citb5-4 son Cytb545SacI y Cytb543Sall, para Citb5-5 son Cytb555SacI y Cytb553PstI, para Citb5-R son Citb5R5KpnI y Citb5R3PstI y para crCysJ son CrCysJ5SacI y CrCysJ3Sall, cada uno de ellos fue clonado en pSpark. Seguidamente, cada cDNA fue clonado en pQE80L (Fig. 2) (Qiagen) y digerido con las mismas enzimas que tienen sus cebadores correspondientes, de manera que el cDNA quedó en la misma fase de lectura que el codón de inicio. Una vez realizada la ligación se transformó la estirpe DH5 $\alpha$ F' de *E. coli*, de la cual obtuvimos grandes cantidades del vector. Este DNA plasmídico nos permitió transformar la estirpe de BL-21 de *E. coli* para la expresión de la proteína con 6 residuos de histidina en su extremo N-terminal.



#### **M.11.1.4. Clonación de hmARCs de humanos**

Los cDNAs de las hmARCs de humanos fueron amplificados usando los cebadores, mARC1SacI y mARC KpnI para la hmARC1 y mARC2SacI y mARC2KpnI para la hmARC2. Una vez amplificados los cDNAs con estos cebadores se clonaron en pSpark. Posteriormente estos cDNAs fueron clonados en pQE80L (Fig. 2) (Qiagen) y digeridos con las mismas enzimas que tienen sus cebadores, de manera que el cDNA quedó en la misma fase de lectura que el codón de inicio y se transformó la estirpe DH5 $\alpha$ F' de *E. coli*, de la cual obtuvimos grandes cantidades del vector. Este DNA plasmídico fue utilizada para transformar la estirpe de TP1000 de *E. coli* en la expresión de la proteína con seis residuos de histidina en su extremo N-terminal.

#### **M.11.2. Clonación de la nitrato Reductasa en pQE80L**

La proteína NR de *Chlamydomonas* fue cedida por Ángel Llamas (Sanz-Luque et al., 2015). Para su clonación se amplificó el cDNA completo del gen utilizando los cebadores NRcDNAKpnIMo y NRcDNAHindIII-3 que incluían en su secuencia sitios de corte para las enzimas de restricción KpnI y HindIII. El cDNA empleado para la amplificación se obtuvo de la inducción de las células en nitrato. Este cDNA se subclonó en pBK para, posteriormente, clonarlo en pQE80L digerido con KpnI y HindIII. A continuación, se transformó la estirpe DH5 $\alpha$ F' de *E. coli*, de la cual se obtuvo grandes cantidades del vector. Este DNA plasmídico permitió la transformación de la estirpe de *E. coli* TP1000 para la expresión de la proteína con seis residuos de histidina en su extremo N-terminal.

#### **M.11.3. Purificación de las proteínas recombinantes 6xHis mediante cromatografía de afinidad**

##### **M.11.3.1. Obtención del extracto crudo**

En el caso de crARC y hmARCs de una colonia de *E. coli* transformada ésta se cultivó en LB ampicilina durante 6-8 h y de ahí se tomaron 500  $\mu$ l para inocular 500 ml de medio LB con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 100  $\mu$ M de

IPTG para la inducción del promotor del vector pQE80L. Este cultivo se llevó a cabo durante 24 h a 30°C para inducir la expresión de la proteína. Para el caso de la NR la inoculación del cultivo inoculado se realizó a 22°C durante 36 h con 50  $\mu\text{M}$  de IPTG y 500  $\mu\text{M}$  de ácido 5-aminolevulínico (usado como precursor del grupo Hemo). En cuanto a los citocromos b5, del 1 al 5, la inoculación del cultivo se llevó a cabo a 37°C durante 12 h con 100 $\mu\text{M}$  de IPTG y 500  $\mu\text{M}$  de ácido 5-aminolevulínico. Para la citocromo b5 reductasa y crCysJ el cultivo inoculado se efectuó a 37°C durante 12 h con 100 $\mu\text{M}$  de IPTG. Las células se recogieron por centrifugación a 10000 x g durante 5 min, y se resuspendieron en 10 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM, pH 8; NaCl 300 mM; 5% glicerol; imidazol 10 mM pH 7). Las células se lisaron someténdolas a ultrasonificación, centrifugando el lisado obtenido a 15000 x g durante 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido constituye el extracto crudo a partir del cual se llevó a cabo la purificación de la proteína.

#### **M.11.3.2. Cromatografía de afinidad**

Los extractos crudos que contenían la proteína recombinante con dominio 6xHis se purificaron por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado, usando una matriz de agarosa Ni-NTA (Qiagen). El proceso de purificación se resume en los siguientes pasos:

1. Lavar la matriz con 20 ml de tampón de lisis (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 300 mM de NaCl; 5-10 % de glicerol; 10 mM de imidazol, pH 8).
2. Poner en contacto la matriz y el extracto crudo durante 1 h en agitación a 4°C.
3. Dejar pasar el extracto por la columna.
4. Lavar la matriz con 20 ml de tampón de lavado (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 300 mM de NaCl; 5-10 % de glicerol; 20 mM de imidazol, pH 8).

5. Eluir la proteína recombinante con tampón de elución (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 300 mM de NaCl; 5-10 % de glicerol; 500 mM de imidazol, pH 8).

Una vez eluido en varias fracciones, se carga en un gel de acrilamida para ver que porciones contienen la proteína de interés limpia. Con estas fracciones trabajaremos o, si la estabilidad de la proteína lo permite, se cambiará de buffer con columnas “PD-10 columns” de la marca (Merck). Por otra parte, siempre es aconsejable concentrar la proteína como mínimo hasta 2 mg/ml con columnas “Amicon Ultra” de la marca (GE Healthcare), de 30kDa y 3kDa, en función del peso molecular de cada proteína purificada. Esta concentración mínima de 2 mg/ml proporciona una mayor estabilidad al proceso de congelación con nitrógeno líquido y a su posterior almacenamiento a  $-80^\circ\text{C}$ . La congelación con nitrógeno líquido de la proteína, se hizo mediante la adición en pequeñas gotas de la proteína, sobre el nitrógeno líquido para así obtener muchas perlitas en el  $-80^\circ\text{C}$ . De esta manera cuando se necesita proteína, se cogen las perlitas necesarias sin necesidad de descongelarlo todo, con la gran pérdida de proteína que conlleva volver a congelar otra vez el sobrante de proteínas.

### **M.11.3.3 Preparación de geles, electroforesis y tinción de proteínas en geles de poliacrilamida**

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes con SDS fue realizada en geles de poliacrilamida según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizaron mini-geles discontinuos de 1 mm de espesor y 10 cm de anchura con una longitud aproximada de gel separador de 4,5-5 cm y 1,5 cm de gel concentrador.

El gel separador se preparó al 12% y contenía por gel: 1,95 ml de la solución concentrada de acrilamida/bisacrilamida (50%), 2,125 ml de tampón A, 4,275 ml de agua destilada, 42,5  $\mu\text{l}$  de SDS al 20% y 30  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.5M

pH 8. Para la polimerización de los geles, se añadieron 30  $\mu$ l de persulfato amónico (APS) al 10% y 12,5  $\mu$ l de TEMED.

El gel concentrador se preparó al 8%, su composición era: 480  $\mu$ l de la solución concentrada de acrilamida/bisacrilamida (50%), 750  $\mu$ l de tampón B, 1,71 ml de agua destilada, 15  $\mu$ l de SDS al 20% y 15  $\mu$ l de EDTA 0.5M pH 8. Para la polimerización de los geles se añadieron 30  $\mu$ l de persulfato amónico al 10% y 6  $\mu$ l de TEMED.

Los reactivos empleados para la preparación del gel fueron:

*Acrilamida:* La solución concentrada de acrilamida/bis (N,N'-bismetilen-acrilamida) fue preparada al 50% en agua, usando 48,65 g de acrilamida y 1,35 de bis-acrilamida, dejando en agitación toda la noche. Una vez preparada se filtró y se almacenó a 4°C en oscuridad.

*Tampón A:* Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. Se almacenó a 4°C. *Tampón B:* Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8. Se almacenó a 4°C. *Solución de persulfato amónico (APS):* Se preparó al 10% (p/v) en el momento de uso (o se almacenó a -20°C).

Las proteínas se desnaturalizaron a 100°C durante 5 min en una solución que contenía SDS al 1%; 10 mM de DTT, 30 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol; Tris-HCl 10 mM, pH 6,8, 10% glicerol y 0,1% de azul de bromofenol. Tras enfriar las muestras, se aplicaron en los pocillos y se llevó a cabo la electroforesis en una minicubeta Mini Protean II de BIORAD en un tampón que contenía: 0,1 M de Tris, pH 8,45; 0,15 M de glicina y 0,1% de SDS.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron las siguientes proteínas suministradas por Sigma: miosina de músculo de conejo (205 kDa),  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (116 kDa), fosforilasa b de músculo de conejo (97,5 kDa), albúmina de suero bovino (BSA) de 66 kDa, ovoalbúmina de pollo (45 kDa) y anhidrasa carbónica de eritrocitos (29 kDa).

La tinción de los geles de SDS-PAGE se realizó utilizando azul de Coomassie R250. Para ello, los geles se incubaron durante 2 h manteniendo agitación continua en una solución nueva, que contenía 0.1 % Coomassie R250 disuelto en isopropanol 25% y ácido acético al 10%. Los geles se destiñeron durante 2 ó 3 h con una solución de isopropanol al 10% y ácido acético al 10%.

## **M.12. Determinaciones Analíticas**

### **M.12.1. Determinación de proteínas**

#### **M.12.1.1. Determinación colorimétrica (Bradford)**

La concentración de proteína se determinó colorimétricamente mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

#### **M.12.1.2. Determinación espectrofotométrica a 280 nm**

El registro de la absorbancia a 280 nm fue utilizada para la cuantificación de todas las proteínas recombinantes. Un volumen de 3  $\mu$ l de la solución de proteína a cuantificar se diluyó en 600  $\mu$ l de una solución  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  de 100 mM, pH 7,2. Se midió la absorbancia a 280 nm de dicha mezcla frente a un blanco sin proteína. La concentración se calculó según la siguiente fórmula:

$$C_i = \frac{A_i}{C} \cdot \frac{d}{e} \cdot \frac{M}{P} \cdot \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{1}{n} \cdot 10^3$$

Proteína	Peso Molecular (kDa)	Coefficiente de extinción Molar 280nm (1/M.cm)	Punto Isoeléctrico teórico
crARC	35,106	64190	5.66
Cytb5-1	12,699	11460	6,36
Cytb5-2	13,180	11585	9.07
Cytb5-3	20,033	22460	8,62
Cytb5-4	12,151	16960	5,78
Cytb5-5	12,807	18115	8.86
Cytb5-R	28,677	14440	8,55
NR	97,766	152595	5,90
hmARC1	37,499	52410	9.12
hmARC2	38,023	59525	9,32
crCysJ	76,6099	102510	5,90

**Tabla M.9.** Datos para la cuantificación de todas las proteínas purificadas. crARC, los Cytb5, Cytb5-R, NR y crCytJ son del organismo *Chlamydomonas reinhardtii*., hmARC1 y 2 son de humanos.

### M.12.2. Determinación de molibdopterina (MPT)

Para la detección y cuantificación de molibdopterina, tanto libre como en forma de Moco activo, el MPT fue convertido en su producto de degradación fluorescente (desfosfo-Forma A) (Johnson et al., 1984). La formación de desfosfo-Forma A se obtuvo mediante un paso de oxidación y un segundo paso de desfosforilación.

**Oxidación:** a 140 µl de una solución Tris-HCl 100 mM, pH 7,2 conteniendo la muestra problema se le añadieron 17,5 µl de la solución yodada y se incubó toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad. Tras este tiempo se centrifugaron las muestras 5 minutos a 15000 rpm a temperatura ambiente. Una vez centrifugado recogemos el sobrenadante de color amarillo en un nuevo eppendorf para su desfosforilación.

**Desfosforilación:** a la mezcla oxidada se le añadieron 20 µl de una solución 10 mg/ml de ácido ascórbico; 70 µl de Tris 1 M (no tamponado); 5 µl de MgCl<sub>2</sub> 1 M, 0.5 µl de enzima fosfatasa alcalina

(Roche) diluida 1:10 en una solución tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,3. Se incubó durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se midió en HPLC.

Solución yodada: (para 1 ml) 915  $\mu$ l de una solución que contenía I<sub>2</sub> al 1,5 % (p/v) y KI al 2,5 % (p/v); y 85  $\mu$ l de HCl 11 M.

La cuantificación de la desfosfo-Forma A se llevó a cabo en un HPLC Agilent serie 1200 de la marca Agilent Technologies usando una columna C18 de fase reversa (Zorbax Eclipse XDB-C18 column, con un diámetro interno de 4,6 mm, una longitud de columna de 150 mm y un tamaño de por de 5 $\mu$ m) que tenía un detector espectrofluorimétrico. Las muestras se sometieron a un flujo isocrático de 1 ml/min en 50 mM de acetato de amonio y 17,5 % de metanol como fase móvil. La desfosfo-Forma A fue detectada fluorimétricamente (excitación, 370 nm; emisión, 450 nm); y cuantificada por integración de la fluorescencia del pico en comparación con la intensidad integrada de un estándar. Dicho estándar fue MPT, el cual fue purificado siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, es decir, obtenido por oxidación directa de la enzima MCP (molybdenum cofactor carrier protein of *Chlamydomonas reinhardtii*). La concentración del estándar se calculó mediante el registro de su absorbancia a 380 nm teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar es de 13200 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> para la desfosfo-Forma A (Johnson et al., 1984).

### **M.12.3. Determinación por HPLC de HAP y Adenina**

HAP y adenina fueron separados y cuantificados por HPLC. El análisis se realizó en un HPLC Agilent serie 1200 de la marca Agilent Technologies. La separación se llevó a cabo por elución isocrática con 3 mM de la sal 1-octanosulfónico sódico a pH 4 y al 15% (vol/vol) de metanol. El flujo de trabajo se mantuvo a 0,5 ml/min. El detector utilizado fue un diodo array, que se programó para que recogiera la señal de absorbancia a la longitud de onda

260 nm durante todo el proceso. La separación del HAP y la Adenina se realizó usando una columna C18 simétrica (Zorbax Eclipse XDB-C18 column) con un diámetro interno de 4,6 mm, una longitud de columna de 150 mm y un tamaño de por de 5 $\mu$ m.

Los tiempos de retención para el HAP son de  $4,2 \pm 0,02$  min y para la adenina de  $5,3 \pm 0,02$  min. Se construyó una recta patrón por triplicado con datos que iban desde 1 a 1000  $\mu$ M de Adenina y HAP. Para hacer la recta patrón se utilizó patrones de HAP y Adenina de concentración conocida, usando el mismo procedimiento que en las muestras experimentales. Las curvas estándar obtenidas tenían una tendencia lineal con un coeficiente de correlación de 0,999, el número de patrones para cada analito fue de doce.

#### **M.12.4. Determinación por HPLC de Benzamidoxima y Benzamidina**

Benzamidoxima y benzamidina se separaron y cuantificaron por HPLC. El análisis mediante HPLC se realizó en un equipo modelo Agilent serie 1200 de la compañía Agilent Technologies. La separación se llevó a cabo mediante elución isocrática con acetato de amonio 50 mM (pH 7) y 10 % de metanol (vol/vol). El caudal se mantuvo constante a una velocidad de 1 ml/min. La longitud de onda de detección se fijó a 229 nm. La separación se llevó a cabo con una columna C18 simétrica (Zorbax Eclipse XDB-C18 column) con un diámetro interno de 4,6 mm, una longitud de columna de 150 mm y un tamaño de por de 5 $\mu$ m.

Los tiempos de retención característicos fueron  $4,5 \pm 0,02$  min para benzamidina y  $10 \pm 0,02$  min para benzamidoxima. Para la determinación de la concentración de los analitos, se usaron las mezclas de reacción con concentraciones definidas de las sustancias de referencia (1 a 1,000  $\mu$ M). Éstas se incubaron y se elaboraron en las mismas condiciones que los utilizados para las muestras experimentales. Las curvas de calibración fueron



lineales en este rango, los coeficientes de correlación de 0,999 y el número de concentraciones de referencia por analito de diez.

#### **M.12.5. Determinación de cantidad de Hemo en los citocromos b5**

Para la determinación del grupo hemo unido a los Cytb5s, se midió la absorción a 413 nm, para calcular la cantidad de hemo total se consideró que el coeficiente de extinción molar del hemo era  $117 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Strittmatter and Velick, 1956).

Midiendo la proteína total por espectrofotómetro a 280 nm obtuvimos una relación de hemo/proteína total, la cual nos permitió calcular el porcentaje de citocromos b5 que estaban cargados de hemo en la purificación de estos.

#### **M.12.6. Determinación de cantidad de FAD en las reductasas**

La determinación de FAD (Flavina-adenina dinucleótido) en las diferentes reductasas se hizo registrando la absorbancia a 450 nm. A partir del valor de absorbancia obtenida y sabiendo que el coeficiente de extinción molar para el FAD es de  $11,3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Whitby, 1953) se calculó la concentración de FAD.

Con el valor de la concentración de FAD y la medición de proteína total (absorbancia a 280nm), se obtuvo el porcentaje de reductasa cargada con FAD, esto se calculó en la relación FAD/proteína total.

#### **M.12.7. Determinación de cantidad de Mo y Zinc por ICP-OES**

Para medir las cantidades de Mo y Zn unidos a las proteínas se utilizó un analizador ICP- OES. El modelo de ICP-OES utilizado fue un Yobin-Ivon Ultima 2 ICP-OES.

La respuesta del instrumento se ha optimizado y calibrado con estándares preparados de una solución de multielementos (Merck multielement solution VI), utilizando una solución de ácido nítrico al 5%

(vol/vol) como blanco. La precisión del sistema se evaluó mediante la ejecución de muestras control de las concentraciones inferior y superior a la concentración de las muestras de interés al principio y al final de cada medición.

Los ajustes del instrumento fueron los siguientes: Potencia de 1.200 W; flujo de gas de plasma a 12 L/min; y gas portador a 0,6 litros/min. El Zn se analizó determinando la absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 206,200 nm y el Mo a 202,030 nm.

### **M.12.8. Determinación del peso molecular por cromatografía**

En la determinación de pesos moleculares de proteínas nativas, se usó un AKTA STAR de la casa (GE Healthcare), con el cual pudimos detectar todas las proteínas mediante un detector de absorbancia a la longitud de onda fija de 280 nm. La columna de exclusión molecular utilizada fue una “Superdex 200 16/600 GL” de la casa (GE Healthcare). Para esta cromatografía se utilizó, en fase isocrática, el buffer fosfato 50 mM a pH 7,2 con una concentración de NaCl de 0,15 M y un flujo de 0.75 ml/min. El recolector de fracciones empleado permitía saber en qué fracción estaba cada pico obtenido del cromatograma. Como comprobación seguidamente se cargaron en gel de acrilamida.

Lo primero que se hizo para esta columna fue inyectar proteínas monoméricas de tamaño conocido, de esta manera se construyó una recta patrón de esta columna que permitía obtener el peso molecular de cualquier proteína a partir del valor del volumen de elución. Una vez conocida esta ecuación, realizamos pinchazos de las proteínas de estudio, tanto separadas como juntas, para verificar los diferentes picos que se obtienen y determinar sus pesos moleculares, de esta forma se calcularon, mediante los pesos moleculares individuales, la proporción a la cual interactúan o si forman dímeros, trímeros o multímeros.

Hay que indicar que el volumen máximo de carga para esta columna es de 4.9 ml, siendo recomendable utilizar el menor volumen posible para obtener una mejor resolución. Por otra parte, la máxima cantidad de proteína óptima es 2 mg que debe contenerse en el menor volumen posible, en la práctica el valor máximo es de 10 mg.

#### **M.12.9. Separación de proteínas por cromatografía de intercambio aniónico**

En la separación por intercambio aniónico de proteínas nativas se usó un AKTA STAR de la casa (GE Healthcare) con el cual pudimos detectar todas las proteínas mediante la detección de la absorbancia a la longitud de onda fija de 280 nm. La columna de intercambio aniónico que se utilizó fue una “UNO Aion Exchange Columns” de la casa (BioRad). Para esta cromatografía se utilizó un gradiente con los siguientes buffer: Buffer A (20 mM de Tris pH = pI (punto isoeléctrico de la proteína de estudio) + 0,5) y como Buffer B (20 mM de Tris pH = pI + 0,5 y 1 M NaCl), en un flujo de trabajo entre 1 ml/min. Se utilizó un recolector de fracciones que permitía saber en qué fracción estaba cada pico obtenido del cromatograma, para luego cargar en gel de acrilamida como comprobación.

Con esta columna se pueden retener todas las proteínas que tengan un pI por debajo del pH de la solución, y luego eluir las con un gradiente de NaCl, con el cual iremos eluyendo en función de lo cerca que este el pI al pH del buffer. De esta manera las proteínas purificadas con cola de Histidina, pueden ser limpiadas de restos de otras que puedan haber quedado retenidas.

Indicar que la concentración máxima de proteína total que es capaz de retener la columna son 20 mg por ml de columna, pero es recomendable lo menos posible para una mejor resolución.

### **M.13. Estudios de estructura terciaria y cuaternaria de mutantes de CrARC**

Se usó la técnica de fluorescencia, donde esta técnica consiste en ver la emisión de fluorescencia mediante una excitación de los aminoácidos tirosina, tryptofano y phenylalanina. Donde los aminoácidos que más fluorescencia dan, son los triptófanos (Eftink, 2006). La proteína crARC tiene 10 triptófanos en los 330 aa que contiene. Por lo que se puede estudiar bien en que ambientes se encuentran estos 10 aminoácidos repartidos por toda la proteína. La fluorescencia cambia a medida que el ambiente de estos aminoácidos son más polares o apolares. Esto comparado con el silvestre nos dice si tenemos partes que no se respetan el ambiente de este triptófano y por tanto se pierde la estructura (Eftink, 2006).

### **M.14. Otros métodos analíticos**

#### **M.14.1. Determinación de clorofila en *Chlamydomonas***

Se determinó espectrofotométricamente la clorofila total, donde se extrae dicho pigmento con etanol (preferido sobre metanol por motivos de seguridad) al 95% por el método de Spreitzer (Winterma.Jf and Demots, 1965).

$$\text{Clorofila total} = [(6,1 * A665) + (20,04 * A649)]$$

$$A665 = \text{Absorbancia } 665 \text{ nm}$$

$$A649 = \text{Absorbancia } 649 \text{ nm}$$

También se determinó a partir de la absorbancia a 652 nm tras extraer dicho pigmento en acetona al 80% (Arnon, 1949).

#### **M.14.2. Conteo de células de *Chlamydomonas***

Se utilizó el contador de células “microcellcounter F-500” de Sysmex. Las células se diluyeron en solución salina isotónica de Sysmex y se hicieron pasar por el contador. En algunas ocasiones se empleó para el conteo de

células una cámara de Neubauer y el microscopio.

### M.15. Cebadores utilizados.

**Tabla M.10.** Cebadores usados.

- ◆ Comprobar antisentido crARC
- Construcción de micro RNA interferente (miRNA)
- Cebadores de comprobación de la construcción miRNA

Nombres de cebadores		Secuencia de cebadores 5'-3'	ADN clonado	Vector	Aplicación
1	crARC5BanHI	<u>GGATCC</u> ATGCTCACAATCGGCGGTCT	crARC	pQE80	Expresión
	crARC3HindIII	<u>AAGCTT</u> TTCACGGCGCTGGCACCAGGT CCG			
2	crARC5NheI	<u>GCTAGC</u> ATGCTCACAATCGGCGGTCT	crARC	pASK- IBA5c	Expresión
	crARC3SalI	<u>GTCGACT</u> CACGGCGCTGGCACCAGGT			
3	crARC5-C15	ATCAAGTCAGCTCGCGGTGTG	crARC- C15A	pQE80	Expresión
	crARC3-C15	CACACCGCGAGCTGACTTGAT			
4	crARC5-C137	GGGACTGCCCGCTCGCCTGGTGCGC	crARC- C137A	pQE80	Expresión
	crARC3-C137	CGCACCAGGCGAGCGGGCAGTCCA			
5	crARC5-C243	GATGTGGCCGCCGGCGCCGACGG	crARC- C234A	pQE80	Expresión
	crARC3-C243	CCGTCGGCGCCGGCGGCCACATC			
6	crARC5-C249	TCAAGCCCGCTCCCGCTGCAAGGTG AC	crARC- C249A	pQE80	Expresión
	crARC3-C249	GTCACCTTGCAGCGGGAGGCGGGCTT GA			
7	crARC5-C252	TCAAGCCCTGCTCCCGCGCCAAGGTG AC	crARC- C250A	pQE80	Expresión
	crARC3-C252	GTCACCTTGGCGCGGGAGCAGGGCTT GA			
8	crARC5- C249/250	TCAAGCCCGCTCCCGCGCCAAGGTG AC	crARC- C249/25 0A	pQE80	Expresión
	crARC3- C249/250	GTCACCTTGGCGCGGGAGGCGGGCTT GA			
9	FDX15NheI	<u>GCTAGC</u> TACAAGGTCACCCTGAAGAC CCCTTC	crFDX1	pASK- IBA5c	Expresión
	FDX13PstI	<u>CTGCAG</u> TTAGTACAGGCCTCCTCCT GGTGGGT			
10	FDX25NheI	<u>GCTAGC</u> TTTAAGGTCACGTTTAAGAC CCCCAA	crFDX2	pASK- IBA5c	Expresión
	FDX23PstI	<u>CTGCAG</u> TTAGAGCTTGGACTCCTGGT CGGTCA			
11	FDX35NheI	<u>GCTAGC</u> TACAAGGTCACCTTCGTCCG TGCCGA	crFDX3	pASK- IBA5c	Expresión
	FDX33XhoI	<u>CTCGAG</u> CTACTTCTGCAGCTCCGCC AACCTT			

12	FDX45NheI	<u>GCTAGCTACAAGATCAGCCTGACGCA</u> TGAAGG	crFDX4	pASK- IBA5c	Expresión
	FDX43PstI	<u>CTGCAGTTACTGGCTGGTCATCAGCT</u> GCATG			
13	FDX55NheI	<u>GCTAGCTTTTCAGGTGACGCTGCGCAT</u> GC	crFDX5	pASK- IBA5c	Expresión
	FDX53PstI	<u>CTGCAGTTACTGGTGTGCCGTACT</u> CGCAGG			
14	FDX65NheI	<u>GCTAGCCCGGTGACAAGATCAAGAT</u> CTTTGACC	crFDX6	pASK- IBA5c	Expresión
	FDX63XhoI	<u>CTCGAGTCACTCGTCCATGTTGGCAA</u> TGGACA			
15	Citb515SacI	<u>GAGCTCATGGCCCCCTCAGGGAAAAAC</u> ATA	crCytb5- 1	pQE80	Expresión
	Citb513SalI	<u>GTCGACTCATCGCTCGCCGCACTCT</u> TA			
16	Citb525SacI	<u>GAGCTCATGGCGAACACGGCCCC</u>	crCytb5- 2	pQE80	Expresión
	Citb523SalI	<u>GTCGACCTATAAGCTGAACAAACGCT</u> TGAAGATG			
17	Citb535SacI	<u>GAGCTCATGAGCGCGGACGACCTCGG</u> T	crCytb5- 3	pQE80	Expresión
	Citb533PstI	<u>CTGCAGCTATGACGAGCCGGCTTGG</u> C			
18	Cyt b545SacI	<u>GAGCTCGTCGCGCAGCTCGACCCTAA</u> GAA	crCytb5- 4	pQE80	Expresión
	Cyt b543SalI	<u>GTCGACTCACTCCTCGCCCGCGCAA</u>			
19	Cyt b555SacI	<u>GAGCTCAGCAACACGTTACGCAGGA</u> GGA	crCytb5- 5	pQE80	Expresión
	Cyt b535SalI	<u>GTCGACTCACGCCGTCAAAGCCGTAG</u> CCG			
20	Citb5R5KpnI	<u>GGTACCCGGAAGAAGACCAAGAAGC</u> CGTCC	Cytb5-R	pQE80	Expresión
	Citb5R3PstI	<u>CTGCAGTCAGAACTGGAAGTCTTGT</u> CCTCGG			
21	CrCysJ5SacI	<u>GAGCTCGAGCCGGTTGGCTCTACTGG</u> CA	CysJ	pQE80	Expresión
	CrCysJ3SalI	<u>GTCGACTCAGTACCAGACATCGCGCT</u> GGT			
22	Ycbx5E.c;KpnI	<u>GGTACCGGCGACATTAATCCGGCTTT</u> TTATTCATCC	YcbX	pQE80	Expresión
	Ycbx3E.c;PstI	<u>CTGCAGCTAACGCGCCAACTTAAGTG</u> CAGTCTC			
23	Ycbx5E.c;KpnI	<u>GGTACCGGCGACATTAATCCGGCTTT</u> TTATTCATCC	ecMOSC o YcbX- Mosc	pQE80	Expresión
	Ycbx3Mosc;PstI	<u>CTGCAGCTATACATTTGCGTCCGGTT</u> GTTGCG			
24	Ycbx5Fer;KpnI	<u>GGTACCGGAGGTGAAATTCTGGCAA</u> CGGCTC	ecFDX	pQE80 y pASK- IBA5c	Expresión
	Ycbx3E.c;PstI	<u>CTGCAGCTAACGCGCCAACTTAAGTG</u> CAGTCTC			
25	CysJ5SacI	<u>GAGCTCATGACGACACAGGTCCCACC</u> TTC	EcCysJ	pQE80	Expresión
	CysJ3SalI	<u>GTCGACTTAGTAGACATCTCGCTGAT</u> AACGGC			
26	CysJ5SacI	<u>GAGCTCATGACGACACAGGTCCCACC</u> TTC	EcCysJ- N	pQE80	Expresión
	CysJ3FSalI	<u>GTCGACCGATTAAAGCGCATCAACCA</u> CG			

27	CysJ5NSacI	<u>GAGCTCGCACCTTCGCAATCCGTCG</u>	EcCysJ- C	pQE80	Expresión
	CysJ3Sall	<u>GTCGACTTAGTAGACATCTCGTGAT AACGGC</u>			
28	mARC1SacI	<u>GAGCTCTGGCCACGCGGCCGGC</u>	hmARC 1	pQE80	Expresión
	mARC1KpnI	<u>GGTACCTTACTGGCCAGCAGGTACA</u>			
29	mARC2SacI	<u>GAGCTCTGGCCAGGCGGCCGGC</u>	hmARC 2	pQE80	Expresión
	mARC2KpnI	<u>GGTACCCTACACCATCCGATACACA</u>			
30	CrARCG17Af	CATGTCGCGCTGTGTCCCTCC	G17A	pQE80	Expresión
	CrARCG17Ar	GAGGGACACAGCGGACATGA			
31	CrARCW128Af	CGCCGACAGCTTACCACCT	W128A	pQE80	Expresión
	CrARCW128Ar	AACGCTGCGGCGGCTCG			
32	CrARCL139Af	CCCTGTGCGCGGTGCGCT	L139A	pQE80	Expresión
	CrARCL139Ar	AGCGACCCGCGGACAGGG			
33	CrARCD182Af	CTTCAGCGCCGGCTACCCCA	D182A	pQE80	Expresión
	CrARCD182Ar	ATGGGGTAGCCGGCGCTGAAG			
34	CrARCF210Af	AACCGCGCCCGGCCAACA	F210A	pQE80	Expresión
	CrARCF210Ar	TGTTGGGCCGGCGCGGTT			
35	CrARCR211Af	AACCGCTTCGCGCCCAACA	R211A	pQE80	Expresión
	CrARCR211Ar	TGTTGGGCGCGAAGCGGTT			
36	CrARCN213Af	GCTTCCGGCCCGCCATTGAGGT	N213A	pQE80	Expresión
	CrARCN213Ar	ACCTCAATGCGGGCCGGAAGC			
37	CrARCE224Af	CCTGGGCTGCGGACACCTGGC	E224A	pQE80	Expresión
	CrARCE224Ar	CGCCAGGTGTCCGAGCCAG			
38	CrARCD225Af	CCTGGGCTGAGGCCACCTGGC	D225A	pQE80	Expresión
	CrARCD225Ar	CGCCAGGTGGCCTCAGCCAG			
39	CrARCW227Af	GAGGACCCGCGCGGACATC	W227A	pQE80	Expresión
	CrARCW227Ar	GTCGCGCGGGTGTCTCAG			
40	CrARCE267Af	GCGGATGCGCCGCTGGACA	E267A	pQE80	Expresión
	CrARCE267Ar	TGTGTCCAGCGGCGCATCGC			
41	CrARCP268Af	GCGGATGAGGCGCTGGACA	P268A	pQE80	Expresión
	CrARCP268Ar	TGTGTCCAGCGCCTCATCGC			
42	CrARCL272Af	CTGGACACAGCGGGAGAGTTCAGGA	L272A	pQE80	Expresión
	CrARCL272Ar	GTCCTGAACTCTCCCGCTGTGTCCA			
43	CrARCR276Af	GAGAGTTCGCGACGGGCAAGGTG	R276A	pQE80	Expresión
	CrARCR276Ar	CACCTTGCCCGTCGCGAACTCTC			
44	crARC5BanHI	<u>GGATCCATGCTACAATCGGCGGTCT</u>	CrARC MOSCNI	pQE80	Expresión
	crARC3MOSC NKpnI	<u>GGTACCTCAACAGGGCAGTCCCAGGT AGGTG</u>			

45	crARC5MOSCS acI	GAGCTCCGCAACACGGAGCCGGAGT	CrARC MOSC	pQE80	Expresión
	crARC3HindIII	AAGCTTTCACGGCGCTGGCACCAGGT CCG			
46	NReDNAKpnI Mo	GGTACCATGACCGTTGCCGAGCA	NR	pQE80	Expresión
	NReDNAHindIII I-3	AAGCTTCTAGAACTGGATCTGGCGGT			
47	CrARCRT5	GGACACACTGGGAGAGTTCAGGACG	crARC		PCR tiempo Real
	CrARCRT3	CGTGACGGGCGTGAGGGTGT			
48	UBIUP	GTACAGCGGCGCTAGAGGCAC	Ubiquiti na		PCR tiempo Real
	UBILO	AGCGTCAGCGGCGGTTGCAGGTATCT			
49	NRlower	CTGGATCTGGCGTCTTGCTGTA	NR		PCR tiempo Real
	NRupper	CCGAGCGCTTCCGGCTGTGGTACA			
50	RTUCrARC	GGTACAGCCTAGCCC GCCAGA ACT	◆		PCR tiempo Real
	RTLcrARC	TGCTCACGCACCACCATCC			
51	UTR5ForcrARC	ctagtTAGCTGAAAGCTACCGGCATAtctc gctgatcgccaccatgggggtggtggtgatcagcgctaTA TGTTGGTAGCTTTCAGCTAg	■	pChlamiRN A3	Micro RNA interferente
	UTR5RevrAR C	ctageTAGCTGAAAGCTACCAACATAtag cgtgatcaccaccacccatggtgccgatcagcgagaT ATGCCGGTAGCTTTCAGCTAa			
52	AmiRNAprecfor	GGTGTTGGGTGCGGTGTTTTG	●		Micro RNA interferente
	Spacerrev	TAGCGCTGATCACCACCACCC			
53	YcbxRPD1	CGGCAGGTCGAGGATTTTGCT	REDA- PCR crARC		REDA-PCR
54	YcbxRPD2	CCCTCCGCTCACTTGCTTCA			REDA-PCR
55	YcbxRPD3	CAATGCGCACGCCGACAAGT			REDA-PCR
56	YcbxRPD4	GGAGCCGGCGGCAAAAAGA			REDA-PCR
57	YcbxRPD5	GACGGCGATAACACGGTGGCTT			REDA-PCR
58	YcbxRPD6	GGCACTGCGCGGTGGGAT			REDA-PCR
59	YcbxRPI1	GCTCATGCGCGTTGGAGGGT			REDA-PCR
60	eYcbxRPI2	CCACAGGAGCCAAGAGCCACAG			REDA-PCR
61	YcbxRPI3	GGCGGCGACTGAAGCAACA			REDA-PCR
62	YcbxRPI4	TTGGGGGTTGTTTACAGGCGTTAGT			REDA-PCR
63	YcbxRPI5	CATGCCGTCCCTGCGTCCT			REDA-PCR
64	YcbxRPI6	CAATTGCACAAGTACAGCAGGGTCA A			REDA-PCR
65	Rb1	AGCTGGCCCACGAGGAGGAC	REDA- PCR primer para inserto		REDA-PCR



66	Rb2	CCAGAGCTGCCACCTTGACA	REDA-PCR primer para inserto		REDA-PCR
----	-----	----------------------	------------------------------	--	----------

## M.16. Herramientas Informáticas

Para el análisis *in silico* de secuencias se han usado diferentes herramientas informáticas. Muchos de los programas, así como bases de datos se usaron “online”. Las herramientas más usadas se detallan a continuación.

### M.16.1. Bases de datos

#### M.16.1.1. Específicas de *Chlamydomonas*

- Versión 3. <http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>
- Versión 4. <http://genome.jgi-psf.org/Chlre4/Chlre4.home.html>
- Phytozome.
  - [http://www.phytozome.net/search.php?method=Org\\_Creihardtii](http://www.phytozome.net/search.php?method=Org_Creihardtii)
  - <http://www.chlamy.org/libraries.html>

#### M.16.1.2. Bases de datos generales de proteínas y ácidos nucleicos

- National Centre for Biotechnology Information (Estados Unidos) (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>
- RCSB Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

### M.16.2. Herramientas de comparación de secuencias de nucleótidos y proteínas

- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Disponible en diferentes sitios web y con diferentes bases de datos (NCBI, EBI, genomas del JGI,...)
- ClustalW. Alineamiento múltiple de secuencias. Disponible en diferentes sitios web así como en herramientas de uso “off-line”.
- Bioedit. Alineamiento múltiple de secuencias. Disponible para descarga gratuita. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>

### **M.16.3. Herramientas para el manejo y análisis de ácidos nucleicos**

- Paquete de programas DNASTAR.  
<http://www.dnastar.com/t-dnastar-lasergene-espanol.aspx>
  - EditSeq. Manejo de secuencias.
  - MapDraw y SeqBuilder. Análisis de sitios diana de enzimas de restricción.
  - PrimerSelect. Diseño de cebadores para PCR.
  - SeqMan. Manejo y análisis de resultados de secuenciación de DNA.
- GENESCAN. Predicción de genes.  
<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>
- Geneious. Programa de alineamiento y creación de árboles filogenéticos. <http://www.geneious.com/>
- WMD3 – Web MicroRNA Designer. Diseño de micro RNA para silenciamiento. <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>

### **M.16.4. Herramientas para el análisis de secuencias de aminoácidos**

- Paquete de programas DNASTAR.  
<http://www.dnastar.com/t-dnastar-lasergene-espanol.aspx>
  - EditSeq. Manejo de secuencias.
  - MegAlign. Alineamiento de secuencias de proteínas.
  - BioEdit. Alineamiento de secuencias de aminoácidos.
- Simple Modular Architecture Research Tool (SMART). Análisis de dominios de proteínas. <http://smart.embl-heidelberg.de/>
- HMMTOP. Análisis de hidrofobicidad y dominios transmembrana. <http://www.enzim.hu/hmmtop/> y <http://www.tcdb.org/progs/TMS.php>
- TMHMM Server v. 2.0. Análisis de hidrofobicidad y dominios transmembrana. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

- NetPhos 2.0 Server. Predicción de sitios de fosforilación en residuos de serina, tirosina y treonina en proteínas de organismos eucariotas. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>
- WOLF PSORT. Predicción de la localización subcelular de proteínas. <http://wolfpsort.org/>
- iPSORT. Predicción de la localización subcelular de proteínas. <http://ipsort.hgc.jp/>
- ProtParam. Programa para darte datos químico físicos (Peso molecular, Coeficiente de extinción molar, punto isoelectrico,...). <http://web.expasy.org/protparam/>
- Swiss-PdbViewer. Programa de estructuras terciarias y alineamientos tridimensionales con estructuras ya cristalizadas. Disponible versión de descarga y on-line. <http://spdbv.vital-it.ch/>
- Swiss-Model. Programa de predicción de estructuras de proteínas a partir de su estructura primaria. Se basa en buscar en proteínas ya cristalizadas secuencias parecidas y mediante entropías y entalpías buscar la estructura más favorable y parecida a proteínas cristalizadas. Te da un archivo .pdb que podemos tratar con Swiss-PdbViewer. <http://swissmodel.expasy.org/>

#### **M.16.5. Software de análisis de cinéticas ( $K_m$ , $V_{max}$ , $K_i$ )**

- SigmaPlot 12 (Systat Software Inc). <http://www.sigmaplot.com/>
- GraphPad Prism version 6.0, GraphPad Software, San Diego California USA, <http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>





# **BIBLIOGRAFÍA**



## Bibliografía:

- Agurla, S., Gayatri, G., and Raghavendra, A.S.** (2014). Nitric oxide as a secondary messenger during stomatal closure as a part of plant immunity response against pathogens. *Nitric Oxide Biol Chem* **43**, 89-96.
- Anantharaman, V., and Aravind, L.** (2002). MOSC domains: ancient, predicted sulfur-carrier domains, present in diverse metal-sulfur cluster biosynthesis proteins including Molybdenum cofactor sulfurases. *FEMS Microbiol Lett* **207**, 55-61.
- Appleyard, M.V., Sloan, J., Kana'n, G.J., Heck, I.S., Kinghorn, J.R., and Unkles, S.E.** (1998). The *Aspergillus nidulans cnxF* gene and its involvement in molybdopterin biosynthesis. Molecular characterization and analysis of *in vivo* generated mutants. *J Biol Chem* **273**, 14869-14876.
- Arc E, Sechet J, Corbineau F, Rajjou L, Marion-Poll A.** (2013). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Front Plant Sci* **4**, 63.
- Arnon, D.I.** (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1-15.
- Arnon, D.I., and Stout, P.R.** (1939). Molybdenum as an essential element for higher plants. *Plant Physiol* **14**, 599-602.
- Asai, S., and Yoshioka, H.** (2009). Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 619-629.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H.** (2006). Construction of *Escherichia coli K-12* in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**, 2006.0008.
- Bando, S., Takano, T., Yubisui, T., Shirabe, K., Takeshita, M., and Nakagawa, A.** (2004). Structure of human erythrocyte NADH-cytochrome b5 reductase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 1929-1934.



- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma, J.M., Lupianez, J.A., and del Rio, L.A.** (1999). Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem* **274**, 36729-36733.
- Beligni, M.V., and Lamattina, L.** (2000). Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**, 215-221.
- Bergmann, W.** (1992). *Colour atlas: nutritional disorders of plants.* (Gustav Fischer Verlag). 1992 pp. 386 pp. I.S. B.N. 3-334-60423-3.
- Bernreiter, A., Ramon, A., Fernández-Martínez, J., Berger, H., Araújo-Bazan, L., Espeso, E.A., Pachlinger, R., Gallmetzer, A., Anderl, I., Scazzocchio, C., and Strauss, J.** (2007). Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **27**, 791-802.
- Bittner, F.** (2014). Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. *Frontiers in Plant Science* **5**, 6.
- Blasco, F., Dos Santos, J.P., Magalon, A., Frixon, C., Guigliarelli, B., Santini, C.L., and Giordano, G.** (1998). NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**, 435-447.
- Bloom, A.J., Sukrapanna, S.S., and Warner, R.L.** (1992). Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol* **99**, 1294-1301.
- Boyington, J.C., Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C., and Sun, P.D.** (1997). Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe4S4 cluster. *Science* **275**, 1305-1308.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D., and Kronzucker, H.J.** (2001a). Futile transmembrane NH<sub>4</sub>(+) cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4255-4258.

- Britto, D.T., Glass, A.D.M., Kronzucker, H.J., and Siddiqi, M.Y.** (2001b). Cytosolic concentrations and transmembrane fluxes of  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ . An evaluation of recent proposals. *Plant Physiol* **125**, 523-526.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., and Wittwer, C.T.** (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinic Chem* **55**, 611-622.
- Byrne, R.S., Hänsch, R., Mendel, R.R., and Hille, R.** (2009). Oxidative half-reaction of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase: generation of superoxide by a peroxisomal enzyme. *J Biol Chem* **284**, 35479-35484.
- Büsch, A., Strube, K., Friedrich, B., and Cramm, R.** (2005). Transcriptional regulation of nitric oxide reduction in *Ralstonia eutropha* H16. *Biochem Soc Trans* **33**, 193-194.
- Camargo, A., Llamas, A., Schnell, R.A., Higuera, J.J., González-Ballester, D., Lefebvre, P.A., Fernández, E., and Galván, A.** (2007). Nitrate signaling by the regulatory gene NIT2 in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **19**, 3491-3503.
- Campbell, W.H.** (1999). Nitrate Reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 277-303.
- Campbell, W.H., and Kinghorn, K.R.** (1990). Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends Biochem Sci* **15**, 315-319.
- Cantu-Medellin, N., and Kelley, E.E.** (2013). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide* **34**, 19-26.
- Castaigns, L., Camargo, A., Pocholle, D., Gaudon, V., Texier, Y., Boutet-Mercey, S., Tacconnat, L., Renou, J.P., Daniel-Vedele, F., Fernandez, E., Meyer, C., and Krapp, A.** (2009). The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J* **57**, 426-435.

- Chamizo-Ampudia, A., Galvan, A., Fernandez, E., and Llamas, A.** (2011). The *Chlamydomonas reinhardtii* Molybdenum Cofactor Enzyme crARC Has a Zn-Dependent Activity and Protein Partners Similar to Those of Its Human Homologue. *Eukaryotic Cell* **10**, 1270-1282.
- Chamizo-Ampudia, A., Galvan, A., Fernandez, E., and Llamas, A.** (2013). Characterization of *Chlamydomonas* 102 and 104 Mutants Reveals Intermolecular Complementation in the Molybdenum Cofactor Protein CNX1E. *Protist* **164**, 116-128.
- Chellamuthu, V.-R., Ermilova, E., Lapina, T., Lueddecke, J., Minaeva, E., Herrmann, C., Hartmann, M.D., and Forchhammer, K.** (2014). A Widespread Glutamine-Sensing Mechanism in the Plant Kingdom. *Cell* **159**, 1188-1199.
- Cherfas, J.** (1990). The Fringe of the Ocean--Under Siege from Land: The ecology of the ocean margins, crucial to human life, is being disrupted by our activities--and perhaps by global change. *Science* (New York, NY) **248**, 163.
- Chi, J.C., Roeper, J., Schwarz, G., and Fischer-Schrader, K.** (2015). Dual binding of 14-3-3 protein regulates *Arabidopsis* nitrate reductase activity. *J Biol Inorg Chem* **20**, 277-286.
- Cookson, S.J., Williams, L.E., and Miller, A.J.** (2005). Light-dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Physiol* **138**, 1097-1105.
- Cooper, T.G.** (2002). Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 223-238.
- Corpas, F.J., Palma, J.M., del Río, L.A., and Barroso, J.B.** (2009). Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol* **184**, 9-14.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Valderrama, R., Palma, J.M., León, A.M., Sandalio, L.M., and del Río, L.A.** (2006). Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**, 246-254.

- Corpas, F.J., Chaki, M., Fernández-Ocaña, A., Valderrama, R., Palma, J.M., Carreras, A., Begara-Morales, J.C., Airaki, M., del Río, L.A., and Barroso, J.B.** (2008). Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol* **49**, 1711-1722.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Quirós, M., León, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Gómez, M., and del Río, L.A.** (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol* **136**, 2722-2733.
- Crawford, N.M.** (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The plant cell* **7**, 859-868.
- Crawford, N.M., and Forde, B.G.** (2002). Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* **1**.
- Cullimore, J.V., and Sims, A.P.** (1981). Occurrence of two forms of glutamate synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* **20**, 597-600.
- Córdoba, F., Cárdenas, J., and Fernández, E.** (1987). Cooperative regulation by ammonium and ammonium derivatives of nitrite uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes* **902**, 287-292.
- Da Cruz, S., Xenarios, I., Langridge, J., Vilbois, F., Parone, P.A., and Martinou, J.C.** (2003). Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* **278**, 41566-41571.
- de Montaigu, A., Sanz-Luque, E., Galván, A., and Fernández, E.** (2010). A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **22**, 1532-1548.
- Dean, J.V., and Harper, J.E.** (1988). The Conversion of Nitrite to Nitrogen Oxide(s) by the Constitutive NAD(P)H-Nitrate Reductase Enzyme from Soybean. *Plant Physiol* **88**, 389-395.
- Delledonne, M., Xia, Y.J., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.

- Du, S., Zhang, Y., Lin, X., Wang, Y., and Tang, C.** (2008). Regulation of nitrate reductase by nitric oxide in Chinese cabbage pakchoi (*Brassica chinensis L.*). *Plant Cell Environ* **31**, 195-204.
- Duran, M., Beemer, F.A., van de Heiden, C., Korteland, J., de Bree, P.K., Brink, M., Wadman, S.K., and Lombeck, I.** (1978). Combined deficiency of xanthine oxidase and sulphite oxidase: a defect of molybdenum metabolism or transport? *J Inherit Metab Dis* **1**, 175-178.
- Edwards, M., Roeper, J., Allgood, C., Chin, R., Santamaria, J., Wong, F., Schwarz, G., and Whitehall, J.** (2015). Investigation of molybdenum cofactor deficiency due to MOCS2 deficiency in a newborn baby. *Meta Gene* **3**, 43-49.
- Eftink, M.R.** (2006). Fluorescence techniques for studying protein structure. *Meth Biochem Anal: Protein Struct Determ* **35**, 127-205.
- Engelsberger, W.R., and Schulze, W.X.** (2012). Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **69**, 978-995.
- Ermilova, E.V., and Forchhammer, K.** (2013). PII signaling proteins of cyanobacteria and green algae. New features of conserved proteins. *Rus J Plant Physiol* **60**, 483-490.
- Fernandez, E., and Cardenas, J.** (1982a). Regulation of the nitrate-reducing system enzymes in wild-type and mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet* **186**, 164-169.
- Fernandez, E., and Cardenas, J.** (1982b). Biochemical characterization of a singular mutant of nitrate reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. New evidence for a heteropolymeric enzyme structure. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics* **681**, 530-537.
- Fernandez, E., and Galvan, A.** (2007). Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *J Exp Bot* **58**, 2279-2287.
- Fernandez, E., and Galvan, A.** (2008). Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*. *Eukaryot Cell* **7**, 555-559.
- Fernández, E., and Matagne, R.F.** (1986). In vivo complementation analysis of nitrate reductase-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* **10**, 397-403.

- Fernández, E., Galván, A., and Quesada, A.** (1998). Nitrogen assimilation and its regulation. In *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas* (Springer), pp. 637-659.
- Fernández, E., Llamas, A., and Galván, A.** (2009). Nitrogen assimilation and its regulation. *The Chlamydomonas sourcebook 2* (San Diego, Academic Press) pp 69-114.
- Fernández, E., Schnell, R., Ranum, L.P., Hussey, S.C., Silflow, C.D., and Lefebvre, P.A.** (1989). Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6449-6453.
- Fernández-Marcos, M., Sanz, L., Lewis, D.R., Muday, G.K., and Lorenzo, O.** (2011). Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 18506-18511.
- Finnemann, J., and Schjoerring, J.K.** (2000). Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant J* **24**, 171-181.
- Fischer, K., Barbier, G.G., Hecht, H.J., Mendel, R.R., Campbell, W.H., and Schwarz, G.** (2005). Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase active site. *Plant Cell* **17**, 1167-1179.
- Forde, B.G.** (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1465**, 219-235.
- Foresi, N., Correa-Aragunde, N., Parisi, G., Caló, G., Salerno, G., and Lamattina, L.** (2010). Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**, 3816-3830.
- Fortescue, J.A.C.** (1992). Landscape geochemistry: retrospect and prospect. *Appl Geochem* **7**, 1-53.
- Franco, A.R., Cárdenas, J., and Fernández, E.** (1987). Involvement of Reversible Inactivation in the Regulation of Nitrate Reductase Enzyme Levels in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **84**, 665-669.

- Franco, A.R., Cárdenas, J., and Fernández, E.** (1988). Two different carriers transport both ammonium and methylammonium in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **263**, 14039-14043.
- Frank, A.** (2004). A review of the "mysterious" wasting disease in Swedish moose (*Alces alces L.*) related to molybdenosis and disturbances in copper metabolism. *Biol Trace Elem Res* **102**, 143-159.
- Fu, Y.H., and Marzluf, G.A.** (1987). Molecular cloning and analysis of the regulation of nit-3, the structural gene for nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8243-8247.
- Fu, Y.H., and Marzluf, G.A.** (1988). Metabolic control and autogenous regulation of nit-3, the nitrate reductase structural gene of *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **170**, 657-661.
- Galvan, A., and Fernández, E.** (2001). Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell Mol Life Sci* **58**, 225-233.
- Galván, A., Quesada, A., and Fernández, E.** (1996). Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **271**, 2088-2092.
- Galván, A., González-Ballester, D., and Fernández, E.** (2007). Insertional mutagenesis as a tool to study genes/functions in *Chlamydomonas*. *Adv Exp Med Biol* **616**, 77-89.
- Galván, A., Córdoba, F., Cárdenas, J., and Fernández, E.** (1991). Regulation of nitrite uptake and nitrite reductase expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1074**, 6-11.
- Garattini, E., and Terao, M.** (2012). The role of aldehyde oxidase in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **8**, 487-503.
- Garattini, E., Fratelli, M., and Terao, M.** (2008). Mammalian aldehyde oxidases: genetics, evolution and biochemistry. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1019-1048.
- García, R., and Bosch, N.** (1988). Aspectos toxicológicos de la presencia de nitratos y nitritos en los productos hortícolas cocidos y en sus aguas de cocción. *Alimentaria* **191**, 71-75.

- Georis, I., Feller, A., Vierendeels, F., and Dubois, E.** (2009). The yeast GATA factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *Mol Cell Biol* **29**, 3803-3815.
- Glass, A.D.** (2003). Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. *Critic Rev Plant Sci* **22**, 453-470.
- Gojon, A., Krouk, G., Perrine-Walker, F., and Laugier, E.** (2011). Nitrate transporter(s) in plants. *J Exp Bot* **62**, 2299-2308.
- Gonzalez-Ballester, D., Camargo, A., and Fernandez, E.** (2004). Ammonium transporter genes in *Chlamydomonas*: the nitrate-specific regulatory gene *Nit2* is involved in *Amt1;1* expression. *Plant Mol Biol* **56**, 863-878.
- González-Ballester, D., de Montaigu, A., Galván, A., and Fernández, E.** (2005a). Restriction enzyme site-directed amplification PCR: a tool to identify regions flanking a marker DNA. *Anal Biochem* **340**, 330-335.
- González-Ballester, D., de Montaigu, A., Higuera, J.J., Galván, A., and Fernández, E.** (2005b). Functional genomics of the regulation of the nitrate assimilation pathway in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* **137**, 522-533.
- Gouvea, C., Souza, J., Magalhaes, A., and Martins, I.** (1997). NO releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul* **21**, 183-187.
- Gruenewald, S., Wahl, B., Bittner, F., Hungeling, H., Kanzow, S., Kotthaus, J., Schwering, U., Mendel, R.R., and Clement, B.** (2008). The Fourth Molybdenum Containing Enzyme mARC: Cloning and Involvement in the Activation of N-Hydroxylated Prodrugs. *J Med Chem* **51**, 8173-8177.
- Gruez, A., Pignol, D., Zeghouf, M., Covès, J., Fontecave, M., Ferrer, J.L., and Fontecilla-Camps, J.C.** (2000). Four crystal structures of the 60 kDa flavoprotein monomer of the sulfite reductase indicate a disordered flavodoxin-like module. *J Mol Biol* **299**, 199-212.
- Guerrero, M.G., Vega, J.M., and Losada, M.** (1981). The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu Rev Plant Physiol* **32**, 169-204.



- Gupta, K.J., Fernie, A.R., Kaiser, W.M., and van Dongen, J.T.** (2011). On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci* **16**, 160-168.
- Gupta, U.C.** (1997). Symptoms of molybdenum deficiency and toxicity in crops. Molybdenum in agriculture, Gupta (ed.) Cambridge University Press, New York. pp 160-170.
- Gutiérrez, R.A., Stokes, T.L., Thum, K., Xu, X., Obertello, M., Katari, M.S., Tanurdzic, M., Dean, A., Nero, D.C., McClung, C.R., and Coruzzi, G.M.** (2008). Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4939-4944.
- Görg, B., Qvarnkhava, N., Voss, P., Grune, T., Häussinger, D., and Schliess, F.** (2007). Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration. *FEBS Lett* **581**, 84-90.
- Harris, E.H., Stern, D.B., and Witman, G.** (1989). The *Chlamydomonas* sourcebook. (Cambridge Univ Press).
- Havemeyer, A., Bittner, F., Wollers, S., Mendel, R., Kunze, T., and Clement, B.** (2006). Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem* **281**, 34796-34802.
- Havemeyer, A., Grünwald, S., Wahl, B., Bittner, F., Mendel, R., Erdélyi, P., Fischer, J., and Clement, B.** (2010). Reduction of N-hydroxy-sulfonamides, including N-hydroxy-valdecoxib, by the molybdenum-containing enzyme mARC. *Drug Metab Dispos* **38**, 1917-1921.
- He, Y., Tang, R.H., Hao, Y., Stevens, R.D., Cook, C.W., Ahn, S.M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R.B., Crawford, N.M., and Pei, Z.M.** (2004). Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**, 1968-1971.
- Heidenreich, T., Wollers, S., Mendel, R.R., and Bittner, F.** (2005). Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *J Biol Chem* **280**, 4213-4218.
- Hille, R., Nishino, T., and Bittner, F.** (2011). Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coord Chem Rev* **255**, 1179-1205.

- Hirel, B., McNally, S.F., Gadal, P., Sumar, N., and Stewart, G.R.** (1984). Cytosolic glutamine synthetase in higher plants. A comparative immunological study. *Eur J Biochem* **138**, 63-66.
- Hirsch, R.E., and Sussman, M.R.** (1999). Improving nutrient capture from soil by the genetic manipulation of crop plants. *Trends Biotechnol* **17**, 356-361.
- Hitzert, M.M., Bos, A.F., Bergman, K.A., Veldman, A., Schwarz, G., Santamaria-Araujo, J.A., Heiner-Fokkema, R., Sival, D.A., Lunsing, R.J., Arjune, S., Kosterink, J.G., and van Spronsen, F.J.** (2012). Favorable outcome in a newborn with molybdenum cofactor type A deficiency treated with cPMP. *Pediatrics* **130**, e1005-1010.
- Hoff, T., Schnorr, K.M., Meyer, C., and Caboche, M.** (1995). Isolation of two *Arabidopsis* cDNAs involved in early steps of molybdenum cofactor biosynthesis by functional complementation of *Escherichia coli* mutants. *J Biol Chem* **270**, 6100-6107.
- Howitt, S.M., and Udvardi, M.K.** (2000). Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochim Biophys Acta* **1465**, 152-170.
- Hyde, G.E., and Campbell, W.H.** (1990). High-level expression in *Escherichia coli* of the catalytically active flavin domain of corn leaf nadh-nitrate reductase and its comparison to human nadh-cytochrome-b5 reductase. *Biochem Biophys Res Commun* **168**, 1285-1291.
- Hänsch, R., Lang, C., Riebeseel, E., Lindigkeit, R., Gessler, A., Rennenberg, H., and Mendel, R.R.** (2006). Plant sulfite oxidase as novel producer of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step. *J Biol Chem* **281**, 6884-6888.
- Islinger, M., Lüers, G.H., Li, K.W., Loos, M., and Völkl, A.** (2007). Rat liver peroxisomes after fibrate treatment. A survey using quantitative mass spectrometry. *J Biol Chem* **282**, 23055-23069.
- Ivanov, N.V., Hubálek, F., Trani, M., and Edmondson, D.E.** (2003). Factors involved in the assembly of a functional molybdopyranopterin center in recombinant *Comamonas acidovorans* xanthine dehydrogenase. *Eur J Biochem* **270**, 4744-4754.

- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C.G., and Puntarulo, S.** (2006). Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiol* **142**, 1246-1255.
- Jenne, E.A.** (1976). Trace element sorption by sediments and soils--sites and processes. In *International Symposium on Molybdenum in the Environment*. Denver, Colorado (USA). 1975.
- Jin, C.W., Du, S.T., Zhang, Y.S., Lin, X.Y., and Tang, C.X.** (2009). Differential regulatory role of nitric oxide in mediating nitrate reductase activity in roots of tomato (*Solanum lycopersum*). *Ann Bot* **104**, 9-17.
- Jin, T., Huppe, H.C., and Turpin, D.H.** (1998). In vitro reconstitution of electron transport from glucose-6-phosphate and NADPH to nitrite. *Plant Physiol* **117**, 303-309.
- Johnson, J.L., Hainline, B.E., and Rajagopalan, K.V.** (1980a). Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase, and nitrate reductase. Identification of a pteridine as a structural component. *J Biol Chem* **255**, 1783-1786.
- Johnson, J.L., Hainline, B.E., Rajagopalan, K.V., and Arison, B.H.** (1984). The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J Biol Chem* **259**, 5414-5422.
- Johnson, J.L., Waud, W.R., Rajagopalan, K.V., Duran, M., Beemer, F.A., and Wadman, S.K.** (1980b). Inborn errors of molybdenum metabolism: combined deficiencies of sulfite oxidase and xanthine dehydrogenase in a patient lacking the molybdenum cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 3715-3719.
- Johnstone, I.L., McCabe, P.C., Greaves, P., Gurr, S.J., Cole, G.E., Brow, M.A., Unkles, S.E., Clutterbuck, A.J., Kinghorn, J.R., and Innis, M.A.** (1990). Isolation and characterisation of the *crnA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **90**, 181-192.
- Joshi, M.S., Johnson, J.L., and Rajagopalan, K.V.** (1996). Molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli* mod and mog mutants. *J Bacteriol* **178**, 4310-4312.

- Kaiser, B.N., Gridley, K.L., Ngaire Brady, J., Phillips, T., and Tyerman, S.D.** (2005). The role of molybdenum in agricultural plant production. *Ann Bot* **96**, 745-754.
- Kalakoutsii, K.L., and Fernandez, E.** (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* nitrate reductase complex has 105-kda subunits in the wild-type strain and a structural mutant. *Plant Science* **105**, 195-206.
- Kisker, C., Schindelin, H., and Rees, D.C.** (1997). Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. *Annu Rev Biochem* **66**, 233-267.
- Kisker, C., Schindelin, H., Baas, D., Rétey, J., Meckenstock, R.U., and Kroneck, P.M.** (1998). A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 503-521.
- Klein, J.M., Busch, J.D., Potting, C., Baker, M.J., Langer, T., and Schwarz, G.** (2012). The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **287**, 42795-42803.
- Kleinhofs, A., and Warner, R.** (1990). Advances in nitrate assimilation. The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise. (Milin J, Lea PD, eds) Academic Press. San Diego. vol. 16, pp, 89-120.
- Kletzin, A., and Adams, M.W.** (1996). Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiol Rev* **18**, 5-63.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., and Nagano, T.** (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* **70**, 2446-2453.
- Kotthaus, J., Wahl, B., Havemeyer, A., Schade, D., Garbe-Schönberg, D., Mendel, R., Bittner, F., and Clement, B.** (2011). Reduction of N( $\omega$ )-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Biochem J* **433**, 383-391.
- Kozmin, S.G., and Schaaper, R.M.** (2007). Molybdenum cofactor-dependent resistance to N-hydroxylated base analogs in *Escherichia coli* is independent of MobA function. *Mutat Res* **619**, 9-15.

- Kozmin, S.G., Wang, J., and Schaaper, R.M.** (2010). Role for CysJ flavin reductase in molybdenum cofactor-dependent resistance of *Escherichia coli* to 6-N-hydroxylaminopurine. *J Bacteriol* **192**, 2026-2033.
- Kozmin, S.G., Leroy, P., Pavlov, Y.I., and Schaaper, R.M.** (2008). YcbX and yiiM, two novel determinants for resistance of *Escherichia coli* to N-hydroxylated base analogues. *Mol Microbiol* **68**, 51-65.
- Krapp, A.** (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Curr Opin Plant Biol* **25**, 115-122.
- Kronenberger, J., Lepingle, A., Caboche, M., and Vaucheret, H.** (1993). Cloning and expression of distinct nitrite reductases in *tobacco* leaves and roots. *Mol Gen Genet* **236**, 203-208.
- Kuper, J., Llamas, A., Hecht, H.J., Mendel, R.R., and Schwarz, G.** (2004). Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* **430**, 803-806.
- LaBrie, S.T., Wilkinson, J.Q., Tsay, Y.F., Feldmann, K.A., and Crawford, N.M.** (1992). Identification of two tungstate-sensitive molybdenum cofactor mutants, chl2 and chl7, of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **233**, 169-176.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, H.M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., and Coruzzi, G.M.** (1996). The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 569-593.
- Lambeck, I., Chi, J.C., Krizowski, S., Mueller, S., Mehlmer, N., Teige, M., Fischer, K., and Schwarz, G.** (2010). Kinetic analysis of 14-3-3-inhibited *Arabidopsis thaliana* nitrate reductase. *Biochemistry* **49**, 8177-8186.
- Lambeck, I.C., Fischer-Schrader, K., Niks, D., Roeper, J., Chi, J.C., Hille, R., and Schwarz, G.** (2012). Molecular mechanism of 14-3-3 protein-mediated inhibition of plant nitrate reductase. *J Biol Chem* **287**, 4562-4571.

- Lanquar, V., Loqué, D., Hörmann, F., Yuan, L., Bohner, A., Engelsberger, W.R., Lalonde, S., Schulze, W.X., von Wirén, N., and Frommer, W.B.** (2009). Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3610-3622.
- Lee, H.J., Adham, I.M., Schwarz, G., Kneussel, M., Sass, J.O., Engel, W., and Reiss, J.** (2002). Molybdenum cofactor-deficient mice resemble the phenotype of human patients. *Hum Mol Genet* **11**, 3309-3317.
- Leimkühler, S., Wuebbens, M.M., and Rajagopalan, K.V.** (2001). Characterization of *Escherichia coli* MoeB and its involvement in the activation of molybdopterin synthase for the biosynthesis of the molybdenum cofactor. *J Biol Chem* **276**, 34695-34701.
- Lewis, N.J., Hurt, P., Sealy-Lewis, H.M., and Scazzocchio, C.** (1978). The genetic control of the molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. IV. A comparison between purine hydroxylase I and II. *Eur J Biochem* **91**, 311-316.
- Li, H.T., Kundu, T.K., and Zweier, J.L.** (2009). Characterization of the Magnitude and Mechanism of Aldehyde Oxidase-mediated Nitric Oxide Production from Nitrite. *J Biol Chem* **284**, 33850-33858.
- Lillo, C.** (2008). Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochem J* **415**, 11-19.
- Lima, L., Seabra, A., Melo, P., Cullimore, J., and Carvalho, H.** (2006). Phosphorylation and subsequent interaction with 14-3-3 proteins regulate plastid glutamine synthetase in *Medicago truncatula*. *Planta* **223**, 558-567.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., and Durner, J.** (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**, 921-930.
- Lindsay, W.L.** (1979). *Chemical equilibria in soils*. (John Wiley and Sons Ltd., New York). 1979 pp. 449pp, I.S. B.N. 0-471-02704-9.
- Little, R., and Dixon, R.** (2003). The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. *J Biol Chem* **278**, 28711-28718.

- Llamas, A., Mendel, R.R., and Schwarz, G.** (2004). Synthesis of adenylated molybdopterin: an essential step for molybdenum insertion. *J Biol Chem* **279**, 55241-55246.
- Llamas, A., Igeño, M.I., Galván, A., and Fernández, E.** (2002). Nitrate signalling on the nitrate reductase gene promoter depends directly on the activity of the nitrate transport systems in *Chlamydomonas*. *Plant J* **30**, 261-271.
- Llamas, A., Tejada-Jiménez, M., Fernández, E., and Galván, A.** (2011). Molybdenum metabolism in the alga *Chlamydomonas* stands at the crossroad of those in *Arabidopsis* and humans. *Metallomics* **3**, 578-590.
- Llamas, A., Otte, T., Multhaupt, G., Mendel, R.R., and Schwarz, G.** (2006). The Mechanism of nucleotide-assisted molybdenum insertion into molybdopterin. A novel route toward metal cofactor assembly. *J Biol Chem* **281**, 18343-18350.
- Llamas, A., Tejada-Jimenez, M., Gonzalez-Ballester, D., Higuera, J.J., Schwarz, G., Galvan, A., and Fernandez, E.** (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* CNX1E reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli* mutants. *Eukaryotic Cell* **6**, 1063-1067.
- Loppes, R., and Radoux, M.** (2002). Two short regions of the promoter are essential for activation and repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genom* **268**, 42-48.
- Loppes, R., Radoux, M., Ohresser, M.C., and Matagne, R.F.** (1999). Transcriptional regulation of the Nial gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nial promoter. *Plant Mol Biol* **41**, 701-711.
- Loqué, D., and von Wirén, N.** (2004). Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J Exp Bot* **55**, 1293-1305.
- Loqué, D., Tillard, P., Gojon, A., and Lepetit, M.** (2003). Gene expression of the NO<sub>3</sub>-transporter NRT1. 1 and the nitrate reductase NIA1 is repressed in *Arabidopsis* roots by NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, the product of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction. *Plant Physiol* **132**, 958-967.

- Loqué, D., Ludewig, U., Yuan, L., and von Wirén, N.** (2005). Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH<sub>3</sub> transport into the vacuole. *Plant Physiol* **137**, 671-680.
- Loqué, D., Lalonde, S., Looger, L.L., von Wirén, N., and Frommer, W.B.** (2007). A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature* **446**, 195-198.
- Ludidi, N., and Gehring, C.** (2003). Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278**, 6490-6494.
- Lum, H.K., Butt, Y.K., and Lo, S.C.** (2002). Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Nitric Oxide* **6**, 205-213.
- Lundberg, J.O., Gladwin, M.T., Ahluwalia, A., Benjamin, N., Bryan, N.S., Butler, A., Cabrales, P., Fago, A., Feelisch, M., Ford, P.C., Freeman, B.A., Frenneaux, M., Friedman, J., Kelm, M., Kevil, C.G., Kim-Shapiro, D.B., Kozlov, A.V., Lancaster, J.R., Lefer, D.J., McColl, K., McCurry, K., Patel, R.P., Petersson, J., Rassaf, T., Reutov, V.P., Richter-Addo, G.B., Schechter, A., Shiva, S., Tsuchiya, K., van Faassen, E.E., Webb, A.J., Zuckerbraun, B.S., Zweier, J.L., and Weitzberg, E.** (2009). Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nat Chem Biol* **5**, 865-869.
- Léran, S., Varala, K., Boyer, J.C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., David, L., Dickstein, R., Fernandez, E., Forde, B., Gassmann, W., Geiger, D., Gojon, A., Gong, J.M., Halkier, B.A., Harris, J.M., Hedrich, R., Limami, A.M., Rentsch, D., Seo, M., Tsay, Y.F., Zhang, M., Coruzzi, G., and Lacombe, B.** (2014). A unified nomenclature of Nitrate transporter 1/peptide transporter family members in plants. *Trends Plant Sci* **19**, 5-9.
- MacKintosh, C., and Meek, S.E.** (2001). Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cell Mol Life Sci* **58**, 205-214.
- Maeda, S., Konishi, M., Yanagisawa, S., and Omata, T.** (2014). Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **55**, 1311-1324.
- Maia, L.B., and Moura, J.J.G.** (2015). Nitrite reduction by molybdoenzymes: a new class of nitric oxide-forming nitrite reductases. *J Biol Inorg Chem* **20**, 403-433.



- Marini, A.M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., and Andre, B.** (1997). A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**, 4282-4293.
- Mariscal, V., Moulin, P., Orsel, M., Miller, A.J., Fernández, E., and Galván, A.** (2006). Differential regulation of the *Chlamydomonas* Nar1 gene family by carbon and nitrogen. *Protist* **157**, 421-433.
- Marschner, H., and Rimmington, G.** (1988). Mineral nutrition of higher plants. *Plant Cell Environ* **11**, 147-148.
- Martínez-Rivas, J.M., Vega, J.M., and Márquez, A.J.** (1991). Differential regulation of the nitrate-reducing and ammonium-assimilatory systems in synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEMS microbiology letters* **78**, 85-88.
- Martínez-Ruiz, A., Cadenas, S., and Lamas, S.** (2011). Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med* **51**, 17-29.
- Marzluf, G.A.** (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 17-32.
- Matthies, A., Nimtze, M., and Leimkühler, S.** (2005). Molybdenum cofactor biosynthesis in humans: identification of a persulfide group in the rhodanese-like domain of MOCS3 by mass spectrometry. *Biochemistry* **44**, 7912-7920.
- Matthies, A., Rajagopalan, K.V., Mendel, R.R., and Leimkühler, S.** (2004). Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5946-5951.
- Melo, P.M., Silva, L.S., Ribeiro, I., Seabra, A.R., and Carvalho, H.G.** (2011). Glutamine Synthetase Is a Molecular Target of Nitric Oxide in Root Nodules of *Medicago truncatula* and Is Regulated by Tyrosine Nitration. *Plant Physiol* **157**, 1505-1517.
- Mendel, R., and Muller, A.** (1976). A common genetic determinant of xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in *Nicotiana tabacum*. *Biochem Physiol Pflanzen* **170**, 538-541.
- Mendel, R.R.** (2013). The Molybdenum Cofactor. *J Biol Chem* **288**, 13165-13172.

- Mendel, R.R., and Hänsch, R.** (2002). Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *J Exp Bot* **53**, 1689-1698.
- Mendel, R.R., and Kruse, T.** (2012). Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 1568-1579.
- Mendel, R.R., and Leimkuhler, S.** (2015). The biosynthesis of the molybdenum cofactors. *J Biol Inorg Chem* **20**, 337-347.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L.H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.P., Riaño-Pachón, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martínez, D., Ngau, W.C., Otiillar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., and Grossman, A.R.** (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**, 245-250.
- Millar, L.J., Heck, I.S., Sloan, J., Kana'n, G.J., Kinghorn, J.R., and Unkles, S.E.** (2001). Deletion of the *cnxE* gene encoding the gephyrin-like protein involved in the final stages of molybdenum cofactor biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genom* **266**, 445-453.
- Miller, A.J., and Smith, S.J.** (1996). Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *J Exp Bot* **47**, 843-854.

- Miller, A.J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S.J., and Wells, D.M.** (2007). Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot* **58**, 2297-2306.
- Molnar, A., Bassett, A., Thuenemann, E., Schwach, F., Karkare, S., Ossowski, S., Weigel, D., and Baulcombe, D.** (2009). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **58**, 165-174.
- Monza, J., and Marquez, A.** (2004). El metabolismo del N en las plantas (Almuzara, Córdoba), I.S.B.N. 84-933378-2-X
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., and Klessig, D.F.** (2010). NO synthesis and signaling in plants--where do we stand? *Physiol Plant* **138**, 372-383.
- Moura, J.J., Brondino, C.D., Trincão, J., and Romão, M.J.** (2004). Mo and W bis-MGD enzymes: nitrate reductases and formate dehydrogenases. *J Biol Inorg Chem* **9**, 791-799.
- Mulaudzi, T., Ludidi, N., Ruzvidzo, O., Morse, M., Hendricks, N., Iwuoha, E., and Gehring, C.** (2011). Identification of a novel *Arabidopsis thaliana* nitric oxide-binding molecule with guanylate cyclase activity in vitro. *FEBS Lett* **585**, 2693-2697.
- Mur, L.A.J., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S.M., Moshkov, I.E., Novikova, G.V., Hall, M.A., Harren, F.J.M., Hebelstrup, K.H., and Gupta, K.J.** (2013). Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *Aob Plants* **5**.
- Márquez, A.J., Galvan, F., and Vega, J.M.** (1986). Utilization of ammonium by mutant and wild types of *Chlamydomonas reinhardtii*. Studies of the glutamate synthase activities. *J Plant Physiol* **124**, 95-102.
- Møller, H., Landt, J., Pedersen, E., Jensen, P., Autrup, H., and Jensen, O.M.** (1989). Endogenous nitrosation in relation to nitrate exposure from drinking water and diet in a Danish rural population. *Cancer Res* **49**, 3117-3121.
- Nakai, Y., Harada, A., Hashiguchi, Y., Nakai, M., and Hayashi, H.** (2012). *Arabidopsis* molybdopterin biosynthesis protein Cnx5 collaborates with the ubiquitin-like protein Urm11 in the thio-modification of tRNA. *J Biol Chem* **287**, 30874-30884.

- Nason, A., Antoine, A.D., Ketchum, P.A., Frazier, W.A., and Lee, D.K.** (1970). Formation of assimilatory nitrate reductase by in vitro inter-cistronic complementation in *Neurospora crassa*. Proc Natl Acad Sci U S A **65**, 137-144.
- Navarro, F.J., Martín, Y., and Siverio, J.M.** (2008). Phosphorylation of the yeast nitrate transporter Ynt1 is essential for delivery to the plasma membrane during nitrogen limitation. J Biol Chem **283**, 31208-31217.
- Navarro, F.J., Perdomo, G., Tejera, P., Medina, B., Machín, F., Guillén, R.M., Lancha, A., and Siverio, J.M.** (2003). The role of nitrate reductase in the regulation of the nitrate assimilation pathway in the yeast *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Res **4**, 149-155.
- Navarro, M.T., Guerra, E., Fernández, E., and Galván, A.** (2000). Nitrite reductase mutants as an approach to understanding nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol **122**, 283-290.
- Neill, S., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., and Wilson, I.** (2008). Nitric oxide evolution and perception. J Exp Bot **59**, 25-35.
- Neve, E.P., Nordling, A., Andersson, T.B., Hellman, U., Diczfalusy, U., Johansson, I., and Ingelman-Sundberg, M.** (2012). Amidoxime reductase system containing cytochrome b5 type B (CYB5B) and MOSC2 is of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. J Biol Chem **287**, 6307-6317.
- Orsel, M., Chopin, F., Leleu, O., Smith, S.J., Krapp, A., Daniel-Vedele, F., and Miller, A.J.** (2006). Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. Plant Physiol **142**, 1304-1317.
- Ott, G., Havemeyer, A., and Clement, B.** (2015). The mammalian molybdenum enzymes of mARC. J Biol Inorg Chem **20**, 265-275.
- Palmer, T., Santini, C.L., Iobbi-Nivol, C., Eaves, D.J., Boxer, D.H., and Giordano, G.** (1996). Involvement of the narJ and mob gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **20**, 875-884.
- Paneque, A., and Losada, M.** (1966). Comparative reduction of nitrate by spinach nitrate reductase with NADH<sub>2</sub> and NADPH<sub>2</sub>. Biochim Biophys Acta **128**, 202-204.

- Pateman, J.A., Cove, D.J., Rever, B.M., and Roberts, D.B.** (1964). A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature* **201**, 58-60.
- Pavlov, Y.I., Noskov, V.N., Lange, E.K., Moiseeva, E.V., Pshenichnov, M.R., and Khromov-Borisov, N.N.** (1991). The genetic activity of N6-hydroxyadenine and 2-amino-N6-hydroxyadenine in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut Res* **253**, 33-46.
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* **29**, e45.
- Pouteau, S., Cherel, I., Vaucheret, H., and Caboche, M.** (1989). Nitrate reductase mRNA regulation in *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase-deficient mutants. *Plant Cell* **1**, 1111-1120.
- Pozuelo, M., MacKintosh, C., Galván, A., and Fernández, E.** (2001). Cytosolic glutamine synthetase and not nitrate reductase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is phosphorylated and binds 14-3-3 proteins. *Planta* **212**, 264-269.
- Qiu, J.A., Wilson, H.L., Pushie, M.J., Kisker, C., George, G.N., and Rajagopalan, K.V.** (2010). The structures of the C185S and C185A mutants of sulfite oxidase reveal rearrangement of the active site. *Biochemistry* **49**, 3989-4000.
- Quesada, A., Galvan, A., and Fernandez, E.** (1994). Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **5**, 407-419.
- Rabkin, S.W., Klassen, S.S., and Tsang, M.Y.** (2007). *Sodium nitroprusside* activates p38 mitogen activated protein kinase through a cGMP/PKG independent mechanism. *Life Sci* **81**, 640-646.
- Rajagopalan, K.V., and Johnson, J.L.** (1992). The pterin molybdenum cofactors. *J Biol Chem* **267**, 10199-10202.
- Reddy, K.J., Munn, L.C., and Wang, L.** (1997). Chemistry and mineralogy of molybdenum in soils. In *Molybdenum in Agriculture*, U.C.Gupta, ed (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 4-22.
- Reiss, J., and Johnson, J.L.** (2003). Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH. *Hum Mutat* **21**, 569-576.

- Reiss, J., Cohen, N., Dorche, C., Mandel, H., Mendel, R.R., Stallmeyer, B., Zobot, M.T., and Dierks, T.** (1998). Mutations in a polycistronic nuclear gene associated with molybdenum cofactor deficiency. *Nat Genet* **20**, 51-53.
- Rexach, J., Fernández, E., and Galván, A.** (2000). The *Chlamydomonas reinhardtii* Nar1 gene encodes a chloroplast membrane protein involved in nitrite transport. *Plant Cell* **12**, 1441-1453.
- Rexach, J., Llamas, A., Fernández, E., and Galván, A.** (2002). The activity of the high-affinity nitrate transport system I (NRT2;1, NAR2) is responsible for the efficient signalling of nitrate assimilation genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **215**, 606-611.
- Richert, D.A., and Westerfeld, W.W.** (1953). Isolation and identification of the xanthine oxidase factor as molybdenum. *J Biol Chem* **203**, 915-923.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., and Kaiser, W.M.** (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* **53**, 103-110.
- Rodríguez-Trelles, F., Tarrío, R., and Ayala, F.J.** (2003). Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent duplications of the xanthine dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13413-13417.
- Rosales, E.P., Iannone, M.F., Groppa, M.D., and Benavides, M.P.** (2011). Nitric oxide inhibits nitrate reductase activity in wheat leaves. *Plant Physiol Biochem* **49**, 124-130.
- Ruemer, S., Krischke, M., Fekete, A., Mueller, M.J., and Kaiser, W.M.** (2012). DAF-fluorescence without NO: Elicitor treated tobacco cells produce fluorescing DAF-derivatives not related to DAF-2 triazol. *Nitric Oxide* **27**, 123-135.
- Rybalkin, S.D., Rybalkina, I.G., Shimizu-Albergine, M., Tang, X.B., and Beavo, J.A.** (2003). PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *EMBO J* **22**, 469-478.
- Sakihama, Y., Nakamura, S., and Yamasaki, H.** (2002). Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol* **43**, 290-297.

- Salmi, M.L., Clark, G., and Roux, S.J.** (2013). Current status and proposed roles for nitric oxide as a key mediator of the effects of extracellular nucleotides on plant growth. *Front Plant Sci* **4**, 427.
- Salmi, M.L., Morris, K.E., Roux, S.J., and Porterfield, D.M.** (2007). Nitric oxide and cGMP signaling in calcium-dependent development of cell polarity in *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol* **144**, 94-104.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning*. (Cold spring harbor laboratory press, New York).
- Santamaria-Araujo, J.A., Fischer, B., Otte, T., Nimtz, M., Mendel, R.R., Wray, V., and Schwarz, G.** (2004). The tetrahydropyranopterin structure of the sulfur-free and metal-free molybdenum cofactor precursor. *J Biol Chem* **279**, 15994-15999.
- Sanz-Luque, E., Ocaña-Calahorro, F., Llamas, A., Galvan, A., and Fernandez, E.** (2013). Nitric oxide controls nitrate and ammonium assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Exp Bot* **64**, 3373-3383.
- Sanz-Luque, E., Ocaña-Calahorro, F., de Montaigu, A., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., and Fernandez, E.** (2015). THB1, a truncated hemoglobin, modulates nitric oxide levels and nitrate reductase activity. *Plant J* **81**, 467-479.
- Schellenberg, K.A., and Hellerman, L.** (1958). Oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* **231**, 547-556.
- Schindelin, H., Kisker, C., Hilton, J., Rajagopalan, K.V., and Rees, D.C.** (1996). Crystal structure of DMSO reductase: redox-linked changes in molybdopterin coordination. *Science* **272**, 1615-1621.
- Schrader, N., Fischer, K., Theis, K., Mendel, R.R., Schwarz, G., and Kisker, C.** (2003). The crystal structure of plant sulfite oxidase provides insights into sulfite oxidation in plants and animals. *Structure* **11**, 1251-1263.
- Schwarz, G.** (2005). Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2792-2810.
- Schwarz, G.** (2014). Biogenesis, function, and catabolism of the molybdenum cofactor: from biochemistry to therapy. *J Biol Inorg Chem* **19**, S729-S729.

- Schwarz, G., and Mendel, R.R.** (2006). Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 623-647.
- Schwarz, G., Mendel, R.R., and Ribbe, M.W.** (2009). Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* **460**, 839-847.
- Schwarz, G., Schulze, J., Bittner, F., Eilers, T., Kuper, J., Bollmann, G., Nerlich, A., Brinkmann, H., and Mendel, R.R.** (2000). The molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1 complements molybdate-repairable mutants, transfers molybdenum to the metal binding pterin, and is associated with the cytoskeleton. *Plant Cell* **12**, 2455-2471.
- Schwarz, G., Santamaria-Araujo, J.A., Wolf, S., Lee, H.J., Adham, I.M., Gröne, H.J., Schwegler, H., Sass, J.O., Otte, T., Hänzelmann, P., Mendel, R.R., Engel, W., and Reiss, J.** (2004). Rescue of lethal molybdenum cofactor deficiency by a biosynthetic precursor from *Escherichia coli*. *Hum Mol Genet* **13**, 1249-1255.
- Seo, M., Koiwai, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y., and Koshiba, T.** (2000). Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **23**, 481-488.
- Simontacchi, M., García-Mata, C., Bartoli, C.G., Santa-María, G.E., and Lamattina, L.** (2013). Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Rep* **32**, 853-866.
- Siverio, J.M., González, C., Mendoza-Riquel, A., Pérez, M.D., and González, G.** (1993). Reversible inactivation and binding to mitochondria of nitrate reductase by heat shock in the yeast *Hansenula anomala*. *FEBS Lett* **318**, 153-156.
- Siverio, J.M.** (2002). Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 277-284.
- Skipper, L., Campbell, W.H., Mertens, J.A., and Lowe, D.J.** (2001). Pre-steady-state kinetic analysis of recombinant *Arabidopsis* NADH:nitrate reductase: rate-limiting processes in catalysis. *J Biol Chem* **276**, 26995-27002.
- Smith, B.C., Underbakke, E.S., Kulp, D.W., Schief, W.R., and Marletta, M.A.** (2013). Nitric oxide synthase domain interfaces regulate electron transfer and calmodulin activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E3577-E3586.



- Snell, F.D., and Snell, C.T.** (1948). Colorimetric methods of analysis, including some turbidimetric and nephelometric methods. (New York,: D. Van Nostrand Co.).
- Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., Yamaya, T., and Yamaguchi, J.** (2003). Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. *Plant Cell Physiol* **44**, 1396-1402.
- Sosa, F., and Cardenas, J.** (1977). NADPH as electron donor for nitrate reduction in *Chlamydomonas reinhardi*. *Z Pflanzenphysiol* **85**, 171-175.
- Soupene, E., Inwood, W., and Kustu, S.** (2004). Lack of the Rhesus protein Rh1 impairs growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* at high CO<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 7787-7792.
- Soupene, E., King, N., Feild, E., Liu, P., Niyogi, K.K., Huang, C.-H., and Kustu, S.** (2002). Rhesus expression in a green alga is regulated by CO<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7769-7773.
- Sparacino-Watkins, C.E., Tejero, J., Sun, B., Gauthier, M.C., Thomas, J., Ragireddy, V., Merchant, B.A., Wang, J., Azarov, I., Basu, P., and Gladwin, M.T.** (2014). Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2. *J Biol Chem* **289**, 10345-10358.
- Stallmeyer, B., Drugeon, G., Reiss, J., Haenni, A.L., and Mendel, R.R.** (1999a). Human molybdopterin synthase gene: identification of a bicistronic transcript with overlapping reading frames. *Am J Hum Genet* **64**, 698-705.
- Stallmeyer, B., Schwarz, G., Schulze, J., Nerlich, A., Reiss, J., Kirsch, J., and Mendel, R.R.** (1999b). The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1333-1338.
- Stewart, V., and Bledsoe, P.J.** (2003). Synthetic lac operator substitutions for studying the nitrate- and nitrite-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems of *Escherichia coli K-12*. *J Bacteriol* **185**, 2104-2111.
- Stitt, M.** (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 178-186.

- Strittmatter, P., and Velick, S.F.** (1956). The isolation and properties of microsomal cytochrome. *J Biol Chem* **221**, 253-264.
- Strittmatter, P.V., S. F.** (1957). The purification and properties of microsomal cytochrome reductase. *J Biol Chem* **228**, 785-799.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Takata, T., Kimura, J., Tsuchiya, Y., Naito, Y., and Watanabe, Y.** (2011). Calcium/calmodulin-dependent protein kinases as potential targets of nitric oxide. *Nitric Oxide* **25**, 145-152.
- Tejada-Jimenez, M., Chamizo-Ampudia, A., Galvan, A., Fernandez, E., and Llamas, A.** (2013). Molybdenum metabolism in plants. *Metallomics* **5**, 1191-1203.
- ter Schure, E.G., van Riel, N.A., and Verrips, C.T.** (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 67-83.
- Terauchi, A.M., Lu, S.F., Zaffagnini, M., Tappa, S., Hirasawa, M., Tripathy, J.N., Knaff, D.B., Farmer, P.J., Lemaire, S.D., Hase, T., and Merchant, S.S.** (2009). Pattern of expression and substrate specificity of chloroplast ferredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **284**, 25867-25878.
- Thomas, G.H., Mullins, J.G., and Merrick, M.** (2000). Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol Microbiol* **37**, 331-344.
- Tong, Y., Zhou, J.J., Li, Z., and Miller, A.J.** (2005). A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *Plant J* **41**, 442-450.
- Tsay, Y.F., Chiu, C.C., Tsai, C.B., Ho, C.H., and Hsu, P.K.** (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* **581**, 2290-2300.
- Uhrig, R.G., Ng, K.K.S., and Moorhead, G.B.G.** (2009). PII in higher plants: a modern role for an ancient protein. *Trends Plant Sci* **14**, 505-511.

- Ullrich, W.R., Larsson, M., Larsson, C.M., Lesch, S., and Novacky, A.** (1984). Ammonium uptake in *Lemna gibba* G 1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake. *Physiol Plant* **61**, 369-376.
- Unkles, S.E., Smith, J., Kanan, G.J., Millar, L.J., Heck, I.S., Boxer, D.H., and Kinghorn, J.R.** (1997). The *Aspergillus nidulans* *cnxABC* locus is a single gene encoding two catalytic domains required for synthesis of precursor Z, an intermediate in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem* **272**, 28381-28390.
- van Severen, M.C., Andrejić, M., Li, J., Starke, K., Mata, R.A., Nordlander, E., and Ryde, U.** (2014). A quantum-mechanical study of the reaction mechanism of sulfite oxidase. *J Biol Inorg Chem* **19**, 1165-1179.
- Vega, J., Cárdenas, J., and Losada, M.** (1980). [23] Ferredoxin-nitrite reductase. *Methods in Enzymology* **69**, 255-270.
- Veldman, A., Santamaria-Araujo, J.A., Sollazzo, S., Pitt, J., Gianello, R., Yaplito-Lee, J., Wong, F., Ramsden, C.A., Reiss, J., Cook, I., Fairweather, J., and Schwarz, G.** (2010). Successful treatment of molybdenum cofactor deficiency type A with cPMP. *Pediatrics* **125**, e1249-1254.
- Villarreal, N.M., Martínez, G.A., and Civello, P.M.** (2009). Influence of plant growth regulators on polygalacturonase expression in strawberry fruit. *Plant Sci* **176**, 749-757.
- Vogel, H.J., and Bonner, D.M.** (1956). Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* **218**, 97-106.
- von Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, A., and Frommer, W.B.** (2000a). The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 254-261.
- von Wirén, N., Lauter, F.R., Ninnemann, O., Gillissen, B., Walch-Liu, P., Engels, C., Jost, W., and Frommer, W.B.** (2000b). Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant J* **21**, 167-175.

- Wahl, B., Reichmann, D., Niks, D., Krompholz, N., Havemeyer, A., Clement, B., Messerschmidt, T., Rothkegel, M., Biester, H., Hille, R., Mendel, R.R., and Bittner, F.** (2010). Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 suggests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes. *J Biol Chem* **285**, 37847-37859.
- Walker, R.B.** (1948). Molybdenum Deficiency in Serpentine Barren Soils. *Science* **108**, 473-475.
- Wang, J., Krizowski, S., Fischer, K., Niks, D., Tejero, J., Sparacino-Watkins, C., Wang, L., Ragireddy, P., Frizzell, S., Kelley, E.E., Zhang, Y., Basu, P., Hille, R., Schwarz, G., and Gladwin, M.T.** (2014). Sulfite oxidase catalyzes single electron transfer at molybdenum domain to reduce nitrite to nitric oxide. *Antioxid Redox Signal*. **23**, 283-294.
- Wang, M.Y., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., and Glass, A.** (1993). Ammonium Uptake by Rice Roots (II. Kinetics of  $^{13}\text{NH}_4^+$  Influx across the Plasmalemma). *Plant Physiol* **103**, 1259-1267.
- Wang, R., Xing, X., and Crawford, N.** (2007). Nitrite acts as a transcriptome signal at micromolar concentrations in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* **145**, 1735-1745.
- Warner, C.K., and Finnerty, V.** (1981). Molybdenum hydroxylases in *Drosophila*. II. Molybdenum cofactor in xanthine dehydrogenase, aldehyde oxidase and pyridoxal oxidase. *Mol Gen Genet* **184**, 92-96.
- Whitby, L.G.** (1953). A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *Biochem J* **54**, 437-442.
- Wilkinson, J.Q., and Crawford, N.M.** (1993). Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Mol Gen Genet* **239**, 289-297.
- Winterma.Jf, and Demots, A.** (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochimica Et Biophysica Acta* **109**, 448-&.
- Wittenberg, J.B., Bolognesi, M., Wittenberg, B.A., and Guertin, M.** (2002). Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *J Biol Chem* **277**, 871-874.

- Wray, J.L., and Filner, P.** (1970). Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley. *Biochem J* **119**, 715-725.
- Wray, J.L., and Fido, R.J.** (1990). Nitrate reductase and nitrite reductase. *Meth Plant Biochem* **3**, 241-256.
- Wuebbens, M.M., Liu, M.T., Rajagopalan, K., and Schindelin, H.** (2000). Insights into molybdenum cofactor deficiency provided by the crystal structure of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaC. *Structure* **8**, 709-718.
- Xiong, J., Fu, G., Yang, Y., Zhu, C., and Tao, L.** (2012). Tungstate: is it really a specific nitrate reductase inhibitor in plant nitric oxide research? *J Exp Bot* **63**, 33-41.
- Xue, Y., Liu, Z., Gao, X., Jin, C., Wen, L., Yao, X., and Ren, J.** (2010). GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PLoS One* **5**, e11290.
- Yamasaki, H., and Sakihama, Y.** (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* **468**, 89-92.
- Yang, J., Giles, L.J., Ruppelt, C., Mendel, R.R., Bittner, F., and Kirk, M.L.** (2015). Oxyl and Hydroxyl Radical Transfer in Mitochondrial Amidoxime Reducing Component-Catalyzed Nitrite Reduction. *J Am Chem Soc* **137**, 5276-5279.
- Yesbergenova, Z., Yang, G., Oron, E., Soffer, D., Fluhr, R., and Sagi, M.** (2005). The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *Plant J* **42**, 862-876.
- Zhang, H., and Forde, B.G.** (1998). An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**, 407-409.
- Zhang, P., Yu, P.C., Tsang, A.H., Chen, Y., Fu, A.K., Fu, W.Y., Chung, K.K., and Ip, N.Y.** (2010). S-nitrosylation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) regulates its kinase activity and dendrite growth during neuronal development. *J Neurosci* **30**, 14366-14370.

**Zhang, T., Wang, Q., Chen, X., Tian, C., Wang, X., Xing, T., Li, Y., and Wang, Y.** (2005). Cloning and biochemical properties of CDPK gene OsCDPK14 from rice. *J Plant Physiol* **162**, 1149-1159.

**Zhou, J., and Kleinhofs, A.** (1996). Molecular evolution of nitrate reductase genes. *J Mol Evol* **42**, 432-442.

**Zhou, K., and Zhang, J.** (2014). Nitric oxide in plants and its role in regulating flower development. *Yi Chuan* **36**, 661-668.



# **PUBLICACIONES**





**Chamizo-Ampudia, A., Galvan, A., Fernandez, E., and Llamas, A.** (2011). The *Chlamydomonas reinhardtii* Molybdenum Cofactor Enzyme crARC Has a Zn-Dependent Activity and Protein Partners Similar to Those of Its Human Homologue. *Eukaryotic Cell* **10**, 1270-1282.

**Chamizo-Ampudia, A., Galvan, A., Fernandez, E., and Llamas, A.** (2013). Characterization of *Chlamydomonas* 102 and 104 Mutants Reveals Intermolecular Complementation in the Molybdenum Cofactor Protein CNX1E. *Protist* **164**, 116-128.

**Fernandez-Reyes, E., Tejada-Jimenez, M., Llamas, A., Chamizo-Ampudia, A., and Galvan, A.** (2012). Specific molybdate transporters and molybdoenzymes in *Chlamydomonas*. *Febs Journal* **279**, 389-389.

**Sanz-Luque, E., Ocana-Calahorro, F., de Montaigu, A., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., and Fernandez, E.** (2015). THB1, a truncated hemoglobin, modulates nitric oxide levels and nitrate reductase activity. *Plant Journal* **81**, 467-479.

**Tejada-Jimenez, M., Chamizo-Ampudia, A., Galvan, A., Fernandez, E., and Llamas, A.** (2013). Molybdenum metabolism in plants. *Metallomics* **5**, 1191-1203.

**Sanz-Luque E., Chamizo-Ampudia A., Llamas A., Galvan, A. and Fernandez E.** (2015). Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant Sci. - Plant Biotechnology* (Not yet published).

**Chamizo-Ampudia A., Sanz-Luque E., Llamas A., Ocaña-Calahorro F., Barroso J., Carreras A., Galván A. and Fernández E.** The ARC molybdoenzyme is the key enzyme in the reductive nitric oxide production with electrons supplied by nitrate reductase. (Not yet published)