

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



**ESTUDIOS MOLECULARES DEL SISTEMA
REGULADOR DE LA DEGRADACIÓN ANAERÓBICA DE
BENZOATO EN *Azoarcus* sp. CIB**

TESIS DOCTORAL

GONZALO DURANTE RODRÍGUEZ

Madrid, 2009

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



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIOS MOLECULARES DEL SISTEMA
REGULADOR DE LA DEGRADACIÓN ANAERÓBICA DE
BENZOATO EN *Azoarcus* sp. CIB**

GONZALO DURANTE RODRÍGUEZ

DIRECTORES:

Dr. EDUARDO DÍAZ FERNÁNDEZ

Dr. MANUEL CARMONA PÉREZ

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Madrid, 2009

“Cuando se dijo por primera vez que el Sol permanecía fijo y que el mundo giraba, el sentido común de la humanidad declaró la doctrina falsa; pero el viejo dicho ‘Vox populi, vox Dei’, como todo filósofo sabe, no puede ser confiado a la ciencia”

El origen de las especies, capítulo VI.
Charles Darwin (1809-1882)

“No estoy en absoluto de acuerdo con lo que usted dice, pero lucharé hasta la muerte para que nadie le impida decirlo”

Voltaire (1694-1778)

A mis padres

A Gaëlle

A aquella tan deseada que viene en camino, a tí Noa

Agradecimientos

Y yo que pensaba que la Discusión sería lo más difícil de escribir... Sin embargo, es en este apartado, al pretender plasmar con simples palabras el millón de sensaciones que acuden a mi cabeza, donde uno se enfrenta a la parte no racional de la tesis, a todo aquello que no figura en los cuadernos de laboratorio ni en los matraces ni en los gliceroles del "menos ochenta". Y supongo que, acostumbrado uno a lidiar con datos, experimentos, mililitros y demás, esto se hace más complicado.

Después de 5 años en este laboratorio, puedo decir que he acumulado tantas experiencias que necesitaría otra tesis para relatarlas. La Bibliografía de esa otra tesis no tendría tantas referencias como ésta, pero sin duda, serían mucho más valiosas, ya que se compondría de todas aquellas personas que me han acompañado a lo largo de esta aventura.

Aún recuerdo hoy mi primer contacto con Eduardo a través de una entrevista telefónica (él en Madrid y yo en Lima)... un año más tarde estaba empezando la tesis en el laboratorio 342, siendo ésta, sin duda, una de las mejores decisiones que he podido tomar. Es por ello que, en primer lugar, quiero agradecer o, mejor, "sugerir" un infinito agradecimiento, a mis directores de tesis, Eduardo y Manuel, por haberme dado la oportunidad de hacer la tesis en éste, uno de los laboratorios de los Rubenes. Mi actual conocimiento acerca del método científico, del diseño de experimentos, de la interpretación de resultados y, en general, del funcionamiento de la ciencia os lo debo a vosotros. A ti Eduardo, por enseñarme cómo se expresa un resultado al máximo o cómo resolver problemas irresolubles, por escucharme y ayudarme siempre que lo he necesitado y por esas frases míticas que tanto han calado en muchos de nosotros ("¿algo nuevo bajo el Sol?", "las espadas siguen en alto", "no queméis el laboratorio"). A ti Manuel, por esos "locos" experimentos que tan lejos nos han llevado, por prestarme tu ayuda siempre que la he necesitado, por haberme hecho participe del blog en el que tan buenos e interesantes ratos hemos pasado y por haberme introducido de lleno en el mundo de la evolución. Puedo decir orgullosamente que he tenido unos jefes envidiables.

También quiero mostrar mi agradecimiento a los demás jefes de los Rubenes. A Auxi, por sus consejos y por las risas compartidas en el 343. A Pedro, por unirse a las juergas de becarios como uno más y por su infinito conocimiento musical. A José Luis, por sus sabios consejos (o "posibilidades") y por impulsarme en mis experimentos apostándose (y perdiendo) su brazo derecho. A Ernesto, por ese buen humor constante que tanto nos hace reír. Al gran jefe, Rubén, por ser el primer responsable de montar un grupo tan genial como es éste, el de los Rubenes.

Y hablando de Rubenes, también quiero darle las gracias a todos ellos, estén o no en el laboratorio, porque, de un modo u otro, habrán contribuido al "buen rollo" que se disfruta aquí. A Pepa, por haberme iniciado en el mundo de BzdR, a pesar de mis insurrecciones, y por esa fuerza vital que desprende y contagia a los de su alrededor. A Cris, por esa santa paciencia que tiene con aquellos que solicitan su ayuda. Al Niño, por sus valiosos consejos y, sobre todo, por las inolvidables juergas que terminaban en su casa (o no...). A Irene, por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. A Merche, por ser a la vez becaria, post-doc, jefa, madre y amiga. A Dani Llull, por su calidad humana, por enseñarme qué es el teatro y cómo disfrutarlo desde dentro y por esas conversaciones tan esotéricas como interesantes. A José Perrea, por ser lo máximo. A Tere, la fuente de sabiduría anaerobia, por la ayuda prestada y por sus consejos de científica y de madre. A Bea, la fuente de sabiduría aerobia, por su valiosa ayuda 'in vitro' y por su infinita capacidad de escuchar y echar un cable donde haga falta. A Juan, por enseñarme que "si tié que salir, sale" y que se puede ligar en menos de 1 hora, por todos los momentos pre-tésicos compartidos y porque ¡Viva Extremadura! A Blas, por las apuestas, por introducirme en el Kal y en la Wikipedia, por esas conversaciones sin fin... A Javier, que me ha demostrado que los caballeros aún existen, por su interminable bondad y sus valiosas lecciones de historia. A Andrés, por casi quemar el laboratorio, por no entrar por la puerta, por grabarte (...) con la cámara de vídeo y, sobre todo, por haberte convertido en un amigo

excepcional. A Ana V, por su gran eficiencia y por ser tan brutita como divertida. A Vir, por haber conseguido concentrar en una pseudo-vasca tanta alegría y buen rollo (pero por favor, no cantes más). A Nina, por “riba ribi grize rep”, por todas las risas “serbias” que nos hemos echado y por ser la más fiestera. A Laura, por ese humor “simpsonil”, irónico y gatuno que tantas carcajadas nos han arrancado en el 343. A Isabelita, por ponerse roja y pirotécnica en tantas y tan divertidas ocasiones. A Isabel, por conseguir que no me sienta el único TOC del laboratorio y ayudarme a restablecer el orden del Universo. A Iria, por su humor inteligente y sus brillantes coreografías que nos han llevado a lo más alto. A Valle, por ese optimismo que desprende y contagia al resto. A Esther, por ser una tilde, más que un punto, tan energética. A Ana G, con quien también he compartido parte de la carrera, por ser la responsable de que yo haya comenzado la tesis aquí, por su inagotable vitalidad y por su valioso punto de vista en todas las discusiones mantenidas (científicas o no). A María, por ser una fiestera “tooooootal” e inigualable. A Miri, por los buenos ratos bailando y haciendo el ganso. A Marimar, por sus amarres, que tanto me han hecho reír, y por tener siempre una sonrisa en la recámara lista para quien la necesite. A Miriam, por su gran calidad científica. A José Yuste, por picar Streptos, Pneumos, Colis... y por todas las risas que nos ha contagiado irremediablemente. A Elisa y a Marta, por aportar una nueva fuente de sonrisas y buen humor a los Rubenes. A Patricia, a Susana, a Beatriz, a Violeta, a Elo.

No obstante, también me siento en deuda con multitud de personas que me han sufrido en algún momento a lo largo de esta tesis, como todos aquellos con los que he colaborado y, por tanto, son responsables, en mayor o menor medida, de que esta tesis llegara a buen puerto. Por ello, quiero dar las gracias a toda la gente del grupo de microscopía electrónica Ernesto, Óscar, Ángel, María Ángeles, Begoña y Cía., especialmente a Ernesto, por enseñarme a manejar el microscopio electrónico y por esos agradables ratos tanto fuera como debajo del agua. Al grupo de ultracentrifugación analítica (Carlos, Germán, Mercedes, Ariadna...), especialmente a Carlos, por convertir las esperas delante de la ultra en un show, y a Germán, por sus valiosos consejos y su infinito conocimiento. A José Miguel, por enseñarme los misterios de la cristalización y de la fluorescencia, y estar siempre dispuesto a resolver mis incontables dudas. A los Drs. Joel Mackay y Jacqui Matthews, por darme la oportunidad de hacer una estancia en su laboratorio, lo que me permitió aprender multitud de técnicas y conocer a gente tan especial como Molly, Robyn, Mugda, Eija, Ivan, Pep, Noelia, Sandra, Liza, Roland, Ingrid, Ann, Fionna, Paul, Morgan, Arwen, Sock, Paula, Cuong, Wilfred, Alex, Melinda, Jason, Chu Kong, Chu Wai, Kate, Dave y Margie.

Y qué decir de los becarios del CIB... gracias a todos ellos por esas grandiosas fiestas de la primavera, especialmente a Carlos y a Rodri, responsables de todos los tinglados. Gracias a Luque, Marta, África, Eva, Gaizka, Asier, Terepower, y demás fauna del CIB.

Por otro lado, no quisiera dejar de mencionar a todos aquellos que, si bien no pertenecen al CIB, están directamente relacionados con que esté donde estoy, como son Myriam y Ernesto, de la Universidad Rey Juan Carlos, por haberme iniciado en el mundo de la ciencia, o Flor, que fue quien me introdujo en el colegio en el apasionante mundo de la biología con sus amenas e interesantes clases. Os estaré eternamente agradecido.

En penúltimo lugar, quisiera hacer una mención especial a aquellos amigos y familiares que, de un modo u otro, me han acompañado a lo largo de estos años. Gracias a Julio, Raquel y Antonio, por esos momentos “berriondos” después de comer. A Toni, por enseñarme el inglés que me permitió sobrevivir en Australia, y a los demás aprendices, Ricardo, Adrian, Patricia y Alex. A Aran, por ser una amiga de verdad, aunque yo a veces no lo sea. A Lore, por sus lazos y globos que tanto nos han hecho reír. A Xab, por tantos viajes compartidos, por tantas experiencias vividas, en definitiva, por ser el mejor amigo. A Rob, por esas escapadas, por apuntarte a todas, por los típicos y los sinceros. A Astoria, que tanta vida me ha dado entre ensayos y conciertos. A Peke, por sus canciones, por su inquebrantable amistad que tanto aprecio y por sus contagiosas ganas de vivir. A Cobos, por sus

arreglos únicos, por su amistad sincera y por su excepcional humor. A Luigi, por sus increíbles redobles, por su humildad, por ser un artista como la copa de un pino. A Charlie, por esos solos de bajo y por sus originales ideas. A Jesus, por ese caballito que lleva en la trompeta.

Y ya en último lugar, mi familia lejana y cercana. A Marie Jose y a José Ramón, por sus ánimos constantes en todo lo que hago y por cuidarme más de lo que merezco. A Alexis y a Maylís, por haberme incluido en la familia como uno más y haberme hecho partícipe de momentos tan estelares como el show de los tres hermanos. A mis tíos Alfonso y Amparo, por el toque de buen humor que irradian allá donde vayan. A mis primos, Elena y Carlitos, por ser también amigos y haber compartido tantos buenos y divertidos momentos. A mis tíos Alejandro y Chon, por esas partidas de cartas tan intensas y por vuestra incomparable calidad humana. A mi tía Hebe quien, desde Buenos Aires o desde aquí, siempre ha mostrado un apoyo incondicional y un amor infinito a sus sobrinos "gasheguitos". A mi yayo, por haberme inoculado con el suero de la curiosidad científica. A mi yaya, por ser la persona más generosa que conozco, y ser fuente inagotable de ánimo y... croquetas. A Didi y a Vita, por ser fuente de sonrisas y diversión, y por querer tanto a mis hermanos. A mi hermano Pablo, por creer en mí, por tener un corazón que no le cabe en el pecho, por ser capaz de hacer reír a alguien en cualquier situación y porque sé que puedo contar contigo para irme al fin del mundo. A mi hermano Luis, por creer también en mí, por su infinita bondad que no siempre deja ver, por grabarnos el disco, porque "estoy arriba, pero si estoy abajo" y porque también sé que me acompañarías al fin del mundo. A mis padres, por habérmelo dado todo, por ser los ejemplos a seguir, por el orgullo que me causa hablar de vosotros, porque no hay gen en la naturaleza que explique el infinito altruismo que demostráis hacia vuestros hijos, por vuestro amor y dedicación, en definitiva, por ser los mejores. A Gaëlle, por haber sustituido para siempre en mi vocabulario el "yo" por el "nosotros", por empujarme siempre en la dirección correcta, por quererme tanto y apoyarme siempre, por construir juntos un futuro donde no cabe tu ausencia, porque no hay persona en el planeta que me haga tan feliz. Y a mi futura niña, Noa, quien, sin saberlo (o quizás sí...), ha sido mi apoyo incondicional en momentos de crisis, a base de certeras y maravillosas patadas cuando más lo necesitaba. Sigue así y sigue donde estás, al menos hasta que defienda la tesis!

Muchas gracias a todos!!!

ABREVIATURAS

A	adenina
Å	Ångström
A₆₀₀	densidad óptica medida a 600 nm
aa:	aminoácido(s)
ADP	adenosina difosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
Ap^r	resistencia a ampicilina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BCR	benzoin-CoA reductasa
Bq	bequerelio (2.7x10 ⁻¹¹ Ci)
BSA	seroalbúmina bovina
C	citocina
°C	grado centígrado
cDNA	DNA complementario
Ci	Curio (3.7x10 ¹⁰ Bq)
Cm^r	resistencia a cloranfenicol
CoA	coenzima A
CRP	proteína receptora de AMPc (<i>cAMP receptor protein</i>)
C-terminal	carboxilo terminal
Da	Dalton
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
DTT	ditiotretol
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
F	fluorescencia
FAD	dinucleótido de flavina y adenina
FADH	dinucleótido de flavina y adenina reducido
G	guanina
Gm^r	resistencia a gentamicina
GTP	guanosina 5'-trifosfato
h	hora
His₆	secuencia de aminoácidos compuesta por 6 histidinas
HTH	motivo hélice-giro-hélice
IPTG	isopropil-β-D-tiogalato piranosido
kb	1000 pares de bases
K_b	constante de asociación
K_d	constante de disociación aparente
kDa	1000 Dalton
K_m	constante de Michaelis-Menten

Km^r	resistencia a kanamicina
LB	medio Luria-Bertani
[L]_b	concentración de ligando unido
[L]_f	concentración de ligando libre
M63	medio mínimo M63
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
NAD	nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADH	nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADPH	fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	nanómetro
NMPB	unión de mononucleótidos fosfato
nt	nucleótido(s)
NTA	ácido nitrilotriacético
N-terminal	amino terminal
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
[P]_T	concentración de proteína total
p/v	relación peso/volumen
RBS	secuencia de unión al ribosoma
Rf^r	resistencia a rifampicina
RNA	ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
RNAP	RNA polimerasa
RNA_r	RNA ribosómico
RNA_t	RNA de transferencia
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
σ	factor sigma de la RNA polimerasa
SDS	dodecilsulfato sódico
SKI	siquimato quinasa I
SKII	siquimato quinasa II
T	timina
T^a	temperatura
TAE	tampón Tris-Acetato-EDTA
TBE	tampón Tris-Borato-EDTA
TE	tampón Tris-EDTA
Tp^r	resistencia a trimetoprim
Tris	tri(hidroximetil)aminometano
U	unidad de actividad enzimática
UTP	uridina trifosfato
UV	ultravioleta
v/v	relación volumen-volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 La biodegradación de los compuestos aromáticos	3
2 El catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos	5
2.1 Las rutas periféricas del catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos	7
2.2 Las rutas centrales del catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos	9
2.2.1 Bioquímica de la ruta central del benzoil-CoA	10
2.2.1.1 Ruta alta del benzoil-CoA	10
2.2.1.2 Ruta baja del benzoil-CoA	12
2.2.2 Genética de la ruta de degradación anaeróbica del benzoato	14
3 Regulación de la expresión génica en rutas de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos	18
3.1 Regulación específica de efector	21
3.1.1 Regulación del <i>cluster bad</i> de <i>R. palustris</i>	21
3.1.2 Regulación del <i>cluster bzd</i> de <i>Azoarcus</i> sp. CIB	24
3.1.3 Otros reguladores del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos	28
3.2 Regulación sobreimpuesta	31
3.2.1 Regulación dependiente de oxígeno	31
3.2.2 Regulación dependiente de fuentes de carbono alternativas (represión catabólica)	34
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1 Cepas bacterianas y plásmidos	43
2 Medios y condiciones de cultivo	46
2.1 Medios de cultivo empleados para <i>E. coli</i>	47
2.2 Medios de cultivo empleados para <i>Azoarcus</i> sp. CIB	47
2.3 Antibióticos	48
2.4 Obtención de condiciones anaeróbicas en los medios de cultivo	48
2.5 Condiciones de cultivo	49
2.6 Conservación de las cepas bacterianas	49
3 Técnicas de manipulación de DNA y RNA	50
3.1 Purificación de DNA	50
3.2 Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR)	50
3.3 Secuenciación de DNA	53
3.4 Determinación del sitio de inicio de la transcripción	53
3.4.1 Extracción de RNA	53
3.4.2 Extensión por cebador (primer-extension)	54
3.5 Ensayos de retrotranscripción-PCR (RT-PCR) en tiempo real	54
3.6 Mutagénesis dirigida del gen <i>bzdR</i>	55

3.7 Construcción de las quimeras Q1 y Q4	56
3.8 Construcción de las quimeras Q2 y Q5 mediante mutagénesis dirigida del gen <i>aroK</i>	57
3.9 Construcción de las fusiones traduccionales $P_{NI}::lacZ$ y $P_{NI+II}::lacZ$	58
4 Procedimientos de transferencia genética	59
4.1 Transformación de células de <i>E. coli</i>	59
4.2 Transferencia de plásmidos por conjugación	59
4.3 Construcción del mutante <i>Azoarcus</i> sp. CIB <i>dacpR</i>	59
5 Técnicas de manipulación de proteínas	60
5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	60
5.2 Obtención de anticuerpos anti-BzdR	60
5.3 Técnica de <i>Western Blot</i>	61
5.4 Sobreproducción y purificación de las proteínas expresadas desde el vector de expresión pQE32 ó pQE60	61
5.5 Ensayos de <i>crosslinking</i>	62
5.6 Ensayos de tripsinización	62
5.7 Ensayos de fluorescencia	63
5.8 Ensayos de dicroísmo circular (CD)	63
6 Ensayos de expresión	64
6.1 Ensayos de actividad enzimática	64
6.1.1 Ensayo de actividad β -galactosidasa	64
6.1.2 Ensayo de actividad siquimato quinasa	64
6.2 Ensayos de transcripción <i>in vitro</i>	66
6.3 Ensayos de mono-híbrido	66
6.4 Ensayo de inmunidad frente a la inducción del ciclo lítico del fago λ	67
7 Ensayos de unión de proteína a DNA	67
7.1 Marcaje de sondas radiactivas	67
7.2 Ensayos de retardo en gel	68
7.3 Ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I	68
7.4 Ensayo de protección frente a la acción del permanganato potásico ($KMnO_4$)	69
7.5 Ensayos de ultracentrifugación analítica	70
7.6 Ensayos de cristalización de la proteína BzdR y sus dominios NBzdRL y CBzdR	71
7.7 Análisis de la estructura de la proteína BzdR mediante microscopía electrónica y reconstrucción de partículas individuales	71
7.8 Análisis de la interacción proteína-DNA mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM)	72
7.8.1 Formación de los complejos proteína-DNA	72
7.8.2 Preparación y visualización de la muestra de AFM	73
8 Análisis de secuencia y estructura	73
8.1 Análisis de los datos de secuencia	73
8.2 Modelos de proteínas	74
8.3 Número de acceso de la secuencia de nucleótidos del gen <i>acpR</i>	74
RESULTADOS	75
Objetivo 1. Estudio de la regulación dependiente de oxígeno de la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	77
1.1 Papel del oxígeno en la expresión de los genes del <i>cluster bzd</i>	77

1.2 Papel de la proteína Fnr en la actividad del promotor P_N	78
1.3 Estudio de la unión de la proteína Fnr* al promotor P_N	80
1.4 Activación transcripcional del promotor P_N mediada por la proteína Fnr	82
1.5 La proteína AcpR está involucrada en la activación del promotor P_N en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	86
1.6 La proteína Fnr de <i>E. coli</i> se comporta como un regulador de la ruta central de degradación de compuestos aromáticos en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	89
Objetivo 2. Estudio del promotor P_R del gen <i>bzdR</i> y su implicación en la regulación de la degradación anaeróbica de benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	90
2.1 BzdR autorregula su expresión	90
2.2 Caracterización de la interacción BzdR- P_R	94
2.3 Papel del oxígeno en la expresión del gen <i>bzdR</i>	94
2.4 Papel de fuentes de carbono adicionales en la expresión del gen <i>bzdR</i>	95
Objetivo 3. Estudio funcional y estructural de la proteína BzdR	98
3.1 Estudios sobre la estructura nativa de la proteína BzdR	98
3.1.1 Hiperproducción de la proteína BzdR e intentos de cristalización	98
3.1.2 Determinación de la estructura nativa de BzdR mediante microscopía electrónica	99
3.2 La proteína BzdR está constituida por dos dominios funcionales	100
3.2.1 Estudio del dominio NBzdR	102
3.2.1.1 El dominio NBzdR se une y reprime al promotor P_N	102
3.2.1.2 Estado de oligomerización de BzdR y del dominio NBzdR	105
3.2.2 Estudio del dominio CBzdR	107
3.2.3 Estudio del <i>linker</i> de la proteína BzdR (LBzdR)	112
3.2.3.1 Análisis estructural de la región LBzdR	112
3.2.3.2 Análisis funcional de la región LBzdR	114
3.3 Análisis del cambio conformacional sufrido por la proteína BzdR en presencia del inductor	118
Objetivo 4. Utilización de la proteína BzdR como modelo para la generación de nuevos reguladores transcripcionales	122
4.1 La proteína quimérica Q λ controla el ciclo lítico del fago λ	122
4.2 La proteína quimérica Q1: un nuevo represor transcripcional con actividad enzimática	124
4.2.1 Funcionalidad del dominio N-terminal (NBzdRL) de la quimera Q1	124
4.2.2 Funcionalidad del dominio C-terminal (SKI) de la quimera Q1	126
4.2.3 La quimera Q1 es un represor transcripcional que responde a siquimato	128
4.3 La proteína quimérica Q2: un nuevo represor transcripcional que responde a siquimato <i>in vivo</i>	131
4.4 La región LBzdR es indispensable para la correcta actividad reguladora de la transcripción de las quimeras	134
Objetivo 5. Estudio de la arquitectura del promotor P_N y su interacción con la proteína BzdR	138
5.1 Estudios <i>in vitro</i> de la interacción de BzdR con las distintas regiones operadoras del promotor P_N	138
5.2 Estudios <i>in vivo</i> de la represión de BzdR sobre variantes truncadas del promotor P_N	140
5.3 Estequiometría de la interacción BzdR/ P_N	142
5.4 Visualización de la interacción BzdR/ P_N mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM)	145

DISCUSIÓN	151
Discusión 1. Estudio de la regulación dependiente de oxígeno de la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	153
1.1 La proteína Fnr es un activador del promotor P_N	154
1.2 AcpR es un activador esencial del promotor P_N en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	156
Discusión 2. Estudio del promotor P_R del gen <i>bzdR</i> y su implicación en la regulación de la degradación anaeróbica de benzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	163
2.1 BzdR se une a su propio promotor P_R y autorregula su expresión	163
2.2 Papel del oxígeno y fuentes de carbono preferentes en la expresión del gen <i>bzdR</i>	164
Discusión 3. Estudio funcional y estructural de la proteína BzdR	167
3.1 El dominio NBzdR interacciona específicamente con el promotor P_N	169
3.2 El dominio CBzdR modifica su conformación al unirse al inductor, benzoil-CoA	172
3.3 El <i>linker</i> de BzdR es imprescindible en la transmisión de información entre los dominios CBzdR y NBzdR	175
3.4 Un modelo de acción para la proteína BzdR	180
Discusión 4. Utilización de la proteína BzdR como modelo para la generación de nuevos reguladores transcripcionales	183
4.1 La proteína quimérica $Q\lambda$ es capaz de controlar el ciclo lítico del fago λ utilizando benzoil-CoA como inductor	183
4.2 La proteína quimérica Q1: un represor transcripcional con actividad enzimática	185
4.3 La proteína quimérica Q2: un regulador artificial de la subfamilia BzdR que responde a siquimato en la célula	191
4.4 Modelo sobre el origen evolutivo de la proteína BzdR	193
Discusión 5. Estudio de la arquitectura del promotor P_N y su interacción con la proteína BzdR	200
5.1 Modelo del mecanismo de interacción BzdR/ P_N	204
CONCLUSIONES	207
BIBLIOGRAFÍA	213

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1 La biodegradación de los compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos, tales como los componentes de la lignina, los flavonoides, las quinonas, los aminoácidos aromáticos, y muchos de los componentes de los combustibles fósiles, son los compuestos orgánicos más extendidos en la naturaleza después de los carbohidratos. De hecho, se estima que la lignina constituye aproximadamente el 25% de la biomasa terrestre, siendo el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Alder, 1977). Además, a lo largo del último siglo se ha incrementado de forma considerable la liberación de compuestos aromáticos a la biosfera como consecuencia de la revolución industrial. Muchos de estos compuestos aromáticos pertenecen al grupo de los xenobióticos, compuestos creados por el hombre que contienen sustituyentes que no existen o se encuentran raramente en la naturaleza, lo que impide que puedan ser degradados o lo hagan muy lentamente (Pieper y Reineke, 2000). La gran estabilidad termodinámica del anillo de benceno, debida a su estructura resonante, es la responsable de su persistencia en el medio ambiente. Además, la elevada hidrofobicidad de estos compuestos los convierte en una fuente importante de contaminación ambiental por su elevada toxicidad. De entre estos contaminantes, cabe destacar especialmente a los que conforman el grupo denominado BTEX, e. g., benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos, debido a que son producidos en grandes cantidades y actúan como contaminantes de acuíferos y de sedimentos procedentes de filtraciones o vertidos de petróleo o derivados de éste (Lin *et al.*, 2002). De igual forma, existen otros compuestos aromáticos muy contaminantes como los derivados polihalogenados de las dioxinas y los bifenilos (PCBs), compuestos nitroaromáticos y derivados fenólicos halogenados (Abraham *et al.*, 2002; Haggblom *et al.*, 2000). Todos estos compuestos poseen diversos índices de toxicidad que pueden llegar a provocar desde leves daños dermatológicos hasta graves afecciones del sistema nervioso central o leucemias (Chee-Sanford *et al.*, 1996).

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

que muestran las enzimas catabólicas permite a las bacterias degradar, al menos en ciertos casos, los compuestos xenobióticos cuyas estructuras se asemejan a la de compuestos aromáticos naturales (Díaz, 2004; McLeod, 2008).

El catabolismo bacteriano de los compuestos aromáticos tiene como estrategia general la evolución de una amplia variedad de rutas periféricas que engloban todas aquellas reacciones enzimáticas que convierten una gran diversidad de compuestos aromáticos en unos pocos intermediarios centrales con menor estabilidad termodinámica, los cuales son canalizados a través de unas pocas rutas centrales hasta el metabolismo central de la célula (Harwood *et al.*, 1999; Heider y Fuchs, 1997). Existen dos estrategias principales para degradar compuestos aromáticos dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno. En el catabolismo aeróbico de los compuestos aromáticos, el cual ha sido ampliamente estudiado a lo largo de varias décadas, el oxígeno es la única molécula que puede actuar como aceptor final de electrones, y además es clave como co-sustrato en dos procesos esenciales como son la hidroxilación y la rotura del anillo aromático llevadas a cabo por oxigenasas (Parales, 2006; Vaillancourt *et al.*, 2006). En el catabolismo anaeróbico, muchos menos estudiado que el catabolismo aeróbico, los compuestos aromáticos están sometidos a una estrategia totalmente diferente, basada en reacciones de reducción capaces de desaromatizar el anillo (Fuchs, 2008; Gibson y Harwood, 2002), utilizando como aceptor final de electrones compuestos inorgánicos como el NO_3^- (que es reducido a NO_2^- o a N_2) (Spormann y Widdel, 2000), el Fe^{3+} (que es reducido a Fe^{2+}) (Coates *et al.*, 2001) o el SO_4^{2-} (que es reducido a SO_3^{2-} o a SO^{2-}) (Morasch *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2004), u otros menos comunes como el Mn^{4+} , el ClO_4^- , el Cr^{4+} , el V^{4+} , el óxido de trimetilamina, e incluso algunos compuestos orgánicos como el dimetil sulfóxido (DMSO), el fumarato, etc. (Coates *et al.*, 2002; Chakraborty y Coates, 2004; Gibson y Harwood, 2002; Lovley, 2003). Por último, cabría hacer mención de un tercer tipo de catabolismo, la fermentación, donde la fuente de carbono es degradada anaeróbicamente por medio de una serie de reacciones en las cuales ciertos compuestos orgánicos actúan como aceptores de electrones, generando ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato, razón por la cual no se requiere una cadena de transporte de electrones. Sin embargo, en muchos casos la fermentación no permite la mineralización de los compuestos aromáticos, sino que los transforma en ácidos orgánicos de cadena corta que serán posteriormente mineralizados por microorganismos metanógenos o reductores de azufre

que establecen una asociación sintrófica con los microorganismos fermentadores (Elshahed *et al.*, 2001; Evans y Fuchs, 1988).

2 El catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos

Los procesos de degradación anaeróbica tienen una gran importancia a nivel ecológico, ya que muchos de los ambientes susceptibles de sufrir contaminación de compuestos aromáticos suelen ser ambientes anóxicos, como es el caso de acuíferos, sedimentos acuáticos, zonas del subsuelo, lumen intestinal, o ambientes con elevadas concentraciones de carbono, donde el oxígeno se consume más rápidamente que el tiempo que tarda en reponerse (Lovley, 2003). Por ejemplo, en los acuíferos contaminados con hidrocarburos se puede apreciar la formación de compartimentos con diferentes potenciales rédox, donde diversas comunidades microbianas son capaces de utilizar localmente los donadores y aceptores de electrones disponibles para llevar a cabo el proceso de biodegradación (Lovley, 2001; 2003). Además, debido a la baja reactividad química de los compuestos aromáticos, su biodegradación anaeróbica requiere reacciones bioquímicas muy atípicas, lo cual es de gran interés, tanto desde el punto de vista bioquímico o evolutivo, como desde el punto de vista biotecnológico. Entre estas novedosas reacciones enzimáticas, cabría destacar aquellas implicadas en la reducción anaeróbica del anillo del benceno (reducción de Birch) o en la carboxilación anaeróbica del fenol (carboxilación de Kolbe-Schmitt), las cuales sólo habían sido descritas en el campo de la química orgánica (Fuchs, 2008).

No obstante, y aunque se han estudiado con cierta profundidad determinadas rutas periféricas y centrales de la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos, aún no han sido bien establecidas las bases genéticas y los mecanismos de regulación subyacentes de la degradación anaeróbica de los compuestos aromáticos debido, principalmente, a las dificultades que entraña tanto el trabajo en condiciones anaeróbicas, como el crecimiento y la manipulación genética de los microorganismos degradadores de compuestos aromáticos. Los últimos avances en la secuenciación de genomas han aportado el primer perfil genético completo de cinco diferentes especies bacterianas capaces de degradar anaeróbicamente compuestos aromáticos utilizando diferentes aceptores de electrones, y que pertenecen a distintos subgrupos de proteobacterias: la α -proteobacteria fototrofa *Rhodopseudomonas palustris* CGA009

(Larimer *et al.*, 2004), la α -proteobacteria desnitrificante *Magnetospirillum magnetotacticum* AMB-1 (Matsunaga *et al.*, 2005), la β -proteobacteria desnitrificante *Azoarcus* sp. EbN1 (propuesta para ser renombrada como “*Aromatoleum aromaticum*” EbN1) (Rabus *et al.*, 2005), y dos δ -proteobacterias anaerobias estrictas, la reductora de hierro *Geobacter metallireducens* GS-15 (Butler *et al.*, 2007) y la fermentadora *Syntrophus aciditrophicus* SB (McInerney *et al.*, 2007) (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de las características más relevantes de los organismos degradadores anaeróbicos de compuestos aromáticos cuyo genoma ha sido totalmente secuenciado.

Características	<i>R. palustris</i> CGA009	<i>M. magnetotacticum</i> AMB-1	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	<i>G. metallireducens</i> GS-15	<i>S. aciditrophicus</i> SB
Clasificación taxonómica	α -Proteobacteria	α -Proteobacteria	β -Proteobacteria	δ -Proteobacteria	δ -Proteobacteria
Hábitat	Acuático	Acuático	Sedimentos acuáticos	Múltiples	Múltiples
Principales aceptores de electrones	O ₂ , fototrófico	O ₂ (microaerófilo), NO ₃ ⁻	O ₂ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	Fe(III), Mn(IV), NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , Co(III), U(VI), Cr(VI)	Fermentador
T ^a óptima de crecimiento	25-30	30	31	30	35
Morfología	Bacilo	Espirilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Motilidad	Sí	Sí	No	Sí	No
Fuentes de carbono aromáticas en condiciones anaeróbicas	<i>p</i> -cumarato, cinamato, ferulato, cafeato, 3-fenilpropionato, 5-fenilvalerato, mandelato, 4-hidroxibenzoato, 3-hidroxibenzoato, benzoato	Benzoato, fenilacetato	Tolueno, etilbenceno, fenilacetato, antranilato, fenol, <i>p</i> -cresol, <i>p</i> -etilfenol, fenilalanina, bencilalcohol, 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, benzoato	Tolueno, fenol, <i>p</i> -cresol, bencilalcohol, benzaldehído, 4-hidroxibenzoato, benzoato	Benzoato
Tamaño del cromosoma (pb)	5.459.213	4.967.148	4.296.230	3.997.420	3.179.300
Plásmidos (kb)	8.4	---	207/223	13.7	---
Contenido en G+C (%)	65.0	65.1	65.1	59.5	51.4
ORFs	4.836	4.559	4.603	3.532	3.169
Elementos IS	16	33	237	---	37

Entre los organismos encontrados en los ambientes anóxicos, cabe destacar la frecuente presencia de miembros del género *Azoarcus*, aislados por primera vez en la rizosfera de plantas de zonas tropicales y subtropicales, y catalogados inicialmente como organismos no desnitrificantes (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993) y con actividad nitrogenasa (Fries *et al.*, 1994). Diversos estudios posteriores ampliaron el número de

especies aisladas, revelando algunos microorganismos del género *Azoarcus* que también eran capaces de crecer anaeróbicamente en condiciones desnitrificantes en presencia de diversos compuestos aromáticos como única fuente de carbono. Entre las nuevas especies se engloban bacterias anaerobias estrictas, tales como *A. anaerobius* (Springer *et al.*, 1998), y anaerobias facultativas, tales como *A. evansii* (Anders *et al.*, 1995), *A. toluolyticus* (Zhou *et al.*, 1995), *A. toluvorans* (Fries *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1999), *A. toluclasticus* (Song *et al.*, 1999) y *A. buckelii* (Mechichi *et al.*, 2002). Todos los miembros del género *Azoarcus* son móviles gracias, en la mayoría de los casos, a la presencia de un único flagelo polar (Anders *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1999), y casi todos ellos, presentan una morfología de diplobacilo, con algunas excepciones de cepas crecidas en *m*-xileno en condiciones desnitrificantes, donde la morfología observada fue de tipo coco (Hess *et al.*, 1997). A lo largo de este trabajo, se ha trabajado con una cepa de este género, *Azoarcus* sp. CIB, aislada tal y como se describe en López-Barragán *et al.* (2004), la cual es capaz de degradar anaeróbicamente diversos compuestos aromáticos tales como *m*-xileno, tolueno, benzoato, fenilacetato, 3-hidroxibenzoato, 3-metilbenzoato, etc. A continuación, se hará un breve repaso de los principales *clusters* génicos que codifican las rutas periféricas y centrales de la degradación anaeróbica de los compuestos aromáticos, centrandó la atención en la ruta de la degradación anaeróbica de benzoato.

2.1 Las rutas periféricas del catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos

Tal y como se señaló anteriormente, las rutas periféricas son aquellas responsables de eliminar los grupos funcionales de los distintos compuestos aromáticos para dar lugar a la formación de unos pocos intermediarios centrales que prosigan posteriormente su biodegradación a través de las rutas centrales. En el catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos, la mayoría de las rutas periféricas convergen en el intermediario central benzoil-CoA (Carmona *et al.*, 2009; Harwood *et al.*, 1999; Heider y Fuchs, 1997), si bien se han descrito otros intermediarios (Fig. 1). Aunque en algunos casos las rutas periféricas implican una única reacción, como es el caso de la activación de ciertos ácidos aromáticos (benzoato, 3-hidroxibenzoato, 3-metilbenzoato, 2-aminobenzoato) a sus correspondientes ésteres de aril-CoA, existen otros muchos compuestos aromáticos que son convertidos en benzoil-CoA a través de rutas periféricas con múltiples pasos, cuyos genes no suelen estar ligados al *cluster* de degradación del benzoil-CoA.

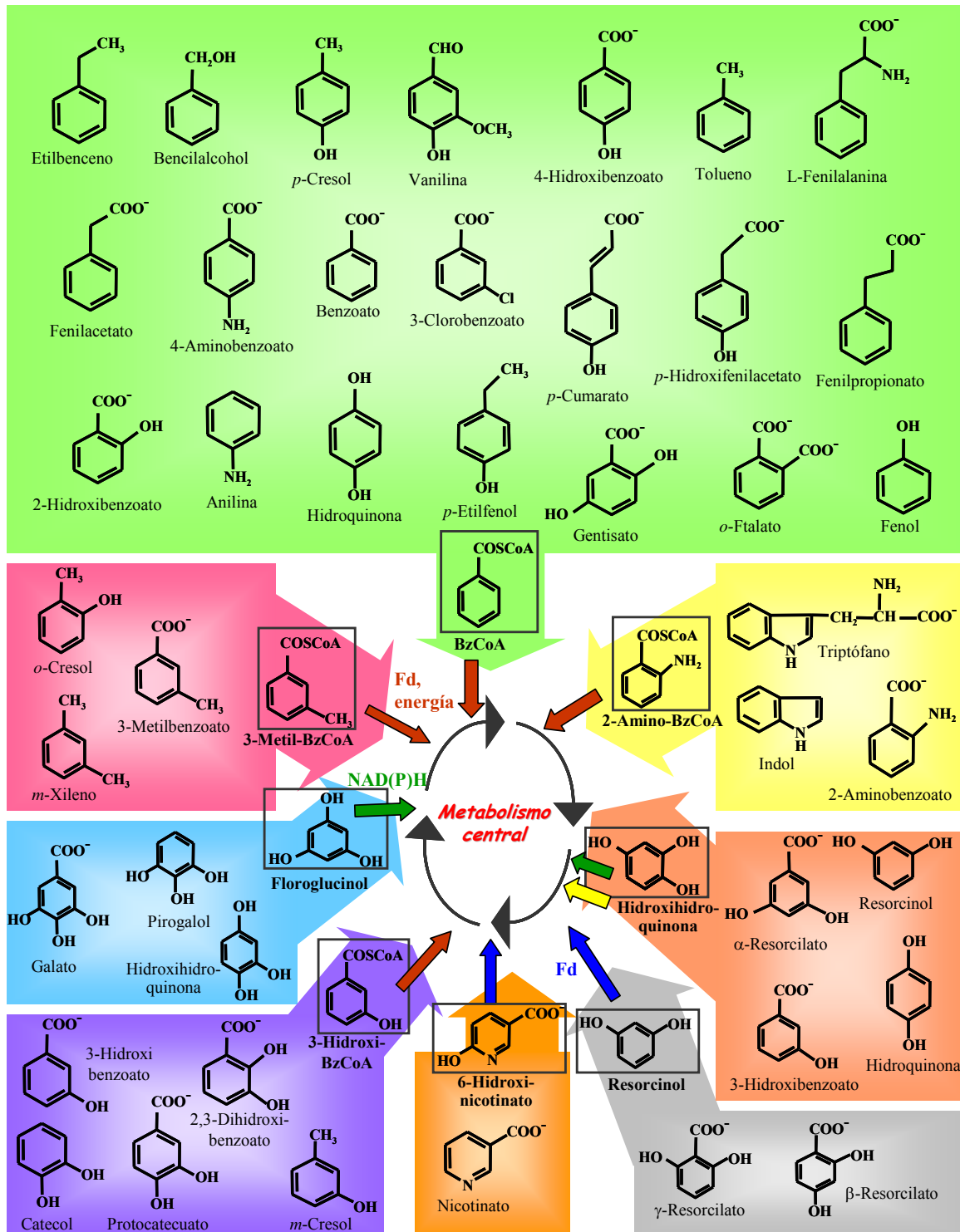


Figura 1. Rutas periféricas del catabolismo anaeróbico de los compuestos mono-aromáticos. Un amplio rango de compuestos aromáticos son degradados a través de diferentes rutas periféricas a un limitado número de intermediarios centrales (recuadrados en color gris), como el benzoyl-CoA (BzCoA), el 2-amino-benzoyl-CoA (2-Amino-BzCoA), el 3-hidroxi-benzoyl-CoA (3-Hidroxi-BzCoA), el 3-metil-benzoyl-CoA (3-Metil-BzCoA), el 6-hidroxi-nicotinato, el resorcinol, el floroglucinol, la hidroxihidroquinona, que son desaromatizados y canalizados por medio de las rutas centrales al metabolismo central de la célula. La desaromatización de estos intermediarios centrales puede implicar el uso de ferredoxina (Fd) y energía (flechas marrones), únicamente ferredoxina (flechas azules) o NAD(P)H (flechas verdes), como donadores de electrones. También se indica la desaromatización oxidativa descrita en el caso de la hidroxihidroquinona (flecha amarilla). Tal y como se puede apreciar, algunos de los compuestos aromáticos pueden ser degradados a través de diferentes rutas periféricas y centrales, dependiendo del potencial rédox del aceptor final de electrones de la célula huésped.

En cualquier caso, se ha podido establecer que todo aquel compuesto que sea metabolizado por medio de la ruta del benzoil-CoA debe poseer un grupo carboxilo, o bien un grupo alquilo capaz de oxidarse a su correspondiente carboxilo. Si no fuera así, el compuesto ha de ser carboxilado específicamente para generar el correspondiente ácido aromático al inicio del metabolismo (Gibson y Harwood, 2002; Schuhle y Fuchs, 2004). De igual forma, los ácidos aromáticos que generan benzoil-CoA en su degradación deben sufrir una activación a tioésteres de CoA mediante la acción de diversas enzimas CoA ligasas. El grupo CoA juega un papel desestabilizador del anillo aromático equivalente al que ejercen los grupos hidroxilo en el catabolismo aeróbico (Heider y Fuchs, 1997). Se han identificado y estudiado diversas CoA ligasas implicadas en el catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en diversos microorganismos, de las cuales las benzoato-CoA ligasas (Egland *et al.*, 1995; Schuhle *et al.*, 2003), las 4-hidroxibenzoato-CoA ligasas de *R. palustris* y *T. aromatica* (Biegert *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1994), y la fenilacetato-CoA ligasa de *A. evansii* (Mohamed, 1993) han sido las mejor caracterizadas.

Las CoA ligasas precisan de un cofactor, el Mg^{2+} , así como de dos sustratos, CoA y ATP, para llevar a cabo su actividad enzimática correspondiente. El CoA es incorporado al compuesto aromático y el ATP se hidroliza a AMP + 2Pi.

No obstante, aparte de la esterificación con CoA como mecanismo general de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos, también existen algunos compuestos que derivan en floroglucinol, resorcinol o hidroxihidroquinona, los cuales no requieren activación mediada por CoA para poder ser degradados (Schink *et al.*, 2000), como se puede apreciar en la Figura 1.

2.2 Las rutas centrales del catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos

Como se ha visto en el apartado anterior la degradación de los compuestos aromáticos a través de distintas rutas periféricas genera unos pocos intermediarios centrales. Los principales intermediarios centrales del catabolismo anaeróbico de los compuestos mono-aromáticos homocíclicos son benzoil-CoA (y sus derivados 2-amino, 3-hidroxi y 3-metil), floroglucinol, hidroxihidroquinona y resorcinol (Carmona *et al.*, 2009; Fuchs, 2008; Gibson y Harwood, 2002; Harwood *et al.*, 1999; Heider y Fuchs, 1997), tal y como se muestra en la Figura 1. Basándose en el intermediario central formado así como en el potencial rédox del aceptor de electrones utilizado, los microorganismos han desarrollado diversas rutas centrales que transforman dichos

intermediarios en compuestos que forman parte del metabolismo central de la célula (Schink *et al.*, 2000). De todas las rutas centrales estudiadas, la mejor caracterizada es la encargada de la degradación de benzoil-CoA, siendo también éste el intermediario central más frecuente y mejor estudiado (Breese *et al.*, 1998; Eglund *et al.*, 1997; Harwood *et al.*, 1999; López Barragán *et al.*, 2004a; López Barragán *et al.*, 2004b; McInerney *et al.*, 2007; Shinoda *et al.*, 2005; Wischgoll *et al.*, 2005).

2.2.1 Bioquímica de la ruta central del benzoil-CoA

El benzoato, al ser el compuesto aromático más comúnmente degradado por los microorganismos, ha sido utilizado como compuesto modelo para el estudio de la principal ruta anaeróbica de degradación de compuestos aromáticos, la ruta central del benzoil-CoA. El catabolismo anaeróbico del benzoato vía benzoil-CoA ha sido estudiado a nivel molecular en algunos microorganismos anaerobios facultativos como *T. aromatica* (Breese *et al.*, 1998), *Azoarcus* spp. (Fuchs, 2008; Harwood *et al.*, 1999; López Barragán *et al.*, 2004a), *Magnetospirillum* spp. (López Barragán *et al.*, 2004b; Shinoda *et al.*, 2005), *R. palustris* (Eglund *et al.*, 1997), *G. metallireducens* (Wischgoll *et al.*, 2005) y *S. aciditrophicus* (McInerney *et al.*, 2007). En todos ellos, la degradación de benzoato tiene lugar a través de una ruta periférica que consiste en una única reacción que activa el benzoato a benzoil-CoA mediante la acción de una benzoato-CoA ligasa dependiente de ATP (Fig. 2). De esta forma, el benzoil-CoA puede ser degradado hasta acetil-CoA y CO₂ a través de una serie de reacciones que constituyen la ruta central del benzoil-CoA, la cual se divide en dos segmentos catabólicos: la ruta alta, que convierte el benzoil-CoA en un compuesto alifático C₇-dicarboxil-CoA, y la ruta baja, que convierte este último en acetil-CoA y CO₂ (Fig. 2) (Blázquez *et al.*, 2008; Carmona y Díaz, 2005; Carmona *et al.*, 2009).

2.2.1.1 Ruta alta del benzoil-CoA

La ruta alta del benzoil-CoA comprende, a su vez, dos segmentos metabólicos principales: i) la reducción del anillo aromático del benzoil-CoA, y ii) la β -oxidación modificada del compuesto alicíclico generado, que dará lugar al éster de CoA sustrato de la ruta baja (Fig. 2).

- a) Reducción del anillo aromático: este paso es clave en el proceso de degradación anaeróbica del benzoil-CoA, ya que elimina el carácter aromático del anillo.

Esta reacción está catalizada por la benzoil-CoA reductasa (BCR), la única enzima de la ruta del benzoil-CoA que es estrictamente sensible a la presencia de oxígeno. La reducción de benzoil-CoA tiene lugar mediante un mecanismo semejante a la reacción de Birch, en la cual se produce una transferencia secuencial de electrones y protones a potenciales redox extremadamente bajos (Boll *et al.*, 2002; Boll, 2005a; b). Esta reducción está facilitada por el grupo tioéster, lo cual explica por qué las rutas anaeróbicas suelen implicar tioésteres de CoA (Fuchs, 2008). Se han descrito dos variantes del proceso de reducción del benzoil-CoA: en *T. aromatica*, *Azoarcus* spp., *G. metallireducens* y *S. aciditrophicus* el benzoil-CoA es reducido a ciclohex-1,5-dieno-1-carbonil-CoA, mientras que en *R. palustris*, el dienoil-CoA sufre una reducción adicional dando lugar a ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (Fig. 2) (Boll, 2005a; b; Carmona y Díaz, 2005; Eglund *et al.*, 1997).

- b) β -oxidación modificada: tras la formación del correspondiente (di)enoil-CoA cíclico por la acción de la BCR, se producen una serie de reacciones similares a las de la β -oxidación, mediante las cuales se incorpora una molécula de agua al doble enlace por la acción de una acil-CoA hidratasa, a continuación una deshidrogenación mediada por una hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y, finalmente, la hidrólisis del compuesto alicíclico por medio de una oxoacil-CoA hidrolasa, que genera un compuesto alifático C₇-dicarboxil-CoA. Hasta ahora se han descrito dos variantes de la β -oxidación (Fig. 2):
- i. β -oxidación tipo *Thauera*: fue descrita por primera vez en *T. aromatica* y utiliza como sustrato el dienoil-CoA cíclico producido por la BCR, generando como producto final 3-hidroxipimelil-CoA (Harwood, 1999; Laempe *et al.*, 1998; Laempe *et al.*, 1999).
 - ii. β -oxidación tipo *Rhodopseudomonas*: fue descrita en *R. palustris* y utiliza como sustrato el monoenoil-CoA cíclico producido por la BCR, generando como producto final pimelil-CoA (Harwood, 1999; Pelletier y Harwood, 1998; Pelletier y Harwood, 2000).

Al comparar las enzimas responsables de ambas variantes se pueden observar ciertas diferencias en las especificidades de sustrato, lo que está de acuerdo con la existencia de dos tipos diferentes de genes catabólicos. Mientras que los genes del tipo *Rhodopseudomonas* únicamente se encuentran en *R. palustris* CGA009 (y

algunas otras cepas de *Rhodopseudomonas*) (Carmona *et al.*, 2009; Eglund *et al.*, 1997), se han hallado ortólogos de los genes del tipo *Thauera* (Breese *et al.*, 1998) en otras bacterias reductoras de nitrato (*Azoarcus* spp. y *Magnetospirillum* spp.) (López Barragán *et al.*, 2004a; López Barragán *et al.*, 2004b; Rabus, 2005; Shinoda *et al.*, 2005), reductoras de Fe(III) (*Geobacter* spp.) (Butler *et al.*, 2007) y fermentadoras (*S. aciditrophicus*) (Peters *et al.*, 2007).

2.2.1.2 Ruta baja del benzoil-CoA

La ruta baja del benzoil-CoA es la responsable de la degradación de los derivados alifáticos C₇-dicarboxil-CoA, para generar tres moléculas de acetyl-CoA y una de CO₂ (Fig. 2) (Gallus y Schink, 1994; Harrison y Harwood, 2005). Las bacterias contienen multitud de genes cuyos productos génicos podrían participar en el catabolismo de los intermediarios dicarboxil-CoA formados en el metabolismo anaeróbico de ácidos aromáticos o en el catabolismo de ácidos dicarboxílicos.

Los genes *pimFABCDE* constituyen un operón inducido específicamente en *R. palustris* cuando las células crecen anaeróticamente en benzoato (o pimelato). Los genes de este operón codifican todas las enzimas necesarias para llevar a cabo la β -oxidación de los ácidos dicarboxílicos hasta glutaril-CoA (Harrison y Harwood, 2005; Larimer *et al.*, 2004; VerBerkmoes *et al.*, 2006). No obstante, las proteínas Pim no son las únicas de *R. palustris* capaces de catalizar la degradación de ácidos dicarboxílicos, siendo probable que actúen en combinación con otras enzimas cuyos niveles se ven incrementados cuando las células crecen en presencia de benzoato (VerBerkmoes *et al.*, 2006). En el genoma de *Azoarcus* sp. EbN1 se han identificado *in silico* diversos *clusters* que codifican posibles rutas de β -oxidación de ácidos dicarboxílicos (Rabus, 2005). En la mayoría de los microorganismos, la oxidación y descarboxilación del glutaril-CoA a crotonil-CoA está catalizada por una glutaril-CoA deshidrogenasa bifuncional que genera glutaconil-CoA como intermediario de la reacción (Fu *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 1981). Se ha identificado y caracterizado recientemente el gen *gcdH* que codifica la glutaril-CoA deshidrogenasa bifuncional de *Azoarcus* sp. CIB (Blázquez *et al.*, 2008) y *G. metallireducens* (Wischgoll *et al.*, 2009).

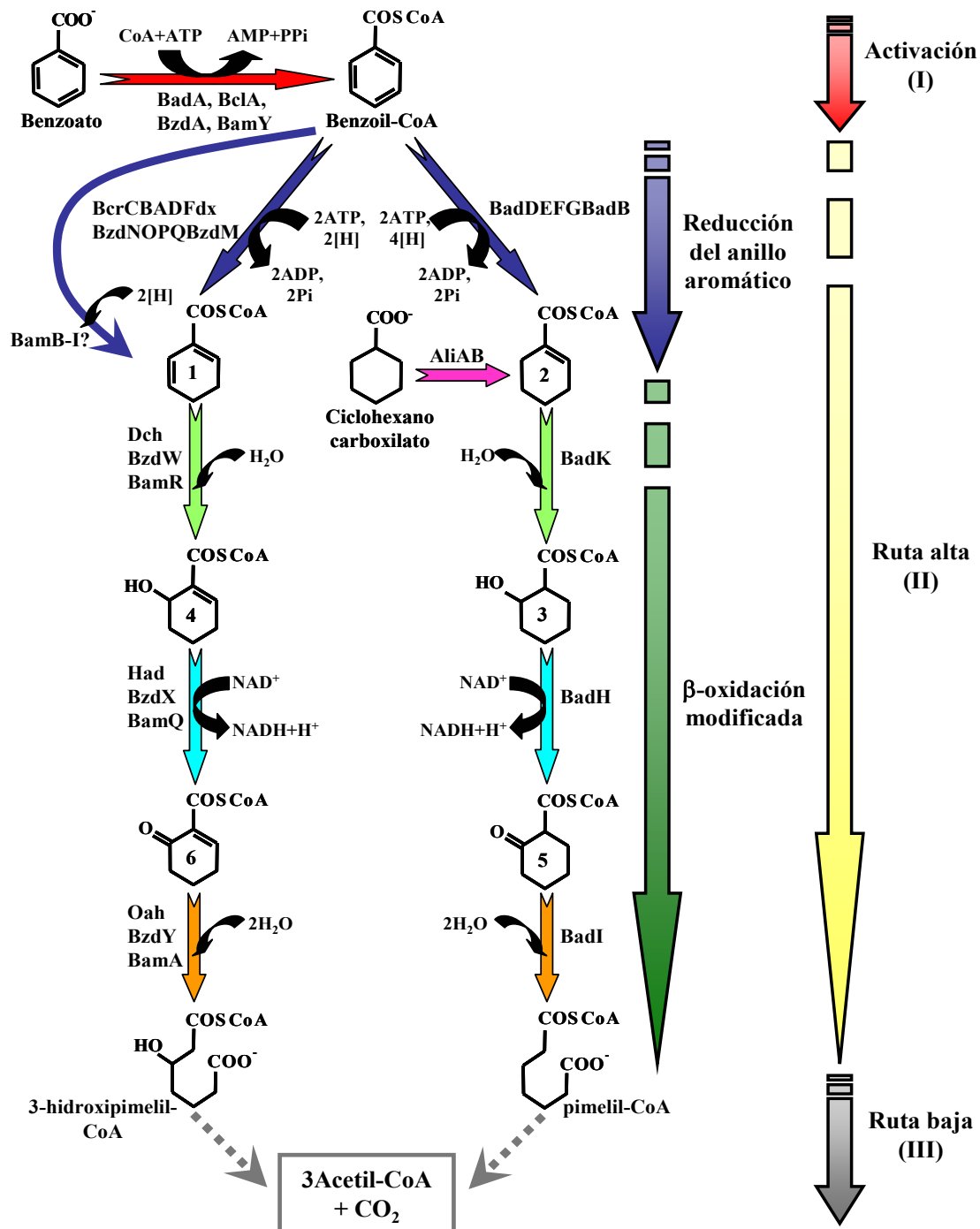


Figura 2. Reacciones enzimáticas de la ruta del catabolismo anaeróbico del benzoato en diversas bacterias. A la derecha se indican las diferentes fases de la degradación: (I) Ruta periférica o activación del benzoato a benzoil-CoA por medio de la benzoato-CoA ligasa (flecha roja); (II) Ruta alta del benzoil-CoA (flecha amarilla) donde tiene lugar la reducción del anillo aromático por medio de la benzoil-CoA reductasa (flechas azul oscuro) y la β-oxidación modificada (flecha verde oscuro) mediante hidratación (flechas verde claro), deshidrogenación (flechas azul claro) e hidrólisis del compuesto alicíclico (flechas naranja); (III) Ruta baja del benzoil-CoA (flechas grises) que genera 3 moléculas de acetil-CoA y CO₂. También se muestra la ruta convergente del ciclohexano carboxilato, que es activado por una CoA ligasa (AliA) y seguidamente deshidrogenada por una ciclohexanocarboxil-CoA deshidrogenasa (AliB) (flecha rosa). Los metabolitos representados en la figura se indican a continuación: ciclohex-1,5-dieno-1-carbonil-CoA (1), ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (2), 2-hidroxiciclohexano-1-carbonil-CoA (3), 6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (4), 2-cetociclohexano-1-carbonil-CoA (5) y 6-cetociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (6). Las enzimas implicadas también han sido indicadas correspondiéndose sus nombres con el de sus respectivos genes, detallados en la Figura 3.

En algunos organismos que presentan ciertas limitaciones en la obtención de energía, como las bacterias fermentadoras o reductoras de sulfato, el glutaril-CoA es oxidado por una glutaril-CoA deshidrogenasa dependiente de NAD y posteriormente descarboxilado por una glutaconil-CoA descarboxilasa anclada a membrana, que es dependiente de sodio y acopla la descarboxilación con la traslocación de iones de sodio a través de la membrana, dando lugar a la síntesis de ATP (Dimroth y Schink, 1998). La conversión de glutaril-CoA a crotonil-CoA acoplada a la síntesis de ATP puede ser considerada como una medida adicional para la conservación de energía, impuesta por las estrictas restricciones energéticas del metabolismo fermentador (Elshahed y McInerney, 2001; Wischgoll *et al.*, 2009).

Las actividades enzimáticas responsables del metabolismo que transforma el crotonil-CoA en acetil-CoA, como por ejemplo la de la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidratasa, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa y acetoacetil-CoA tiolasa, han sido descritas en diversas bacterias (Auburger y Winter, 1996; Elshahed *et al.*, 2001; Elshahed y McInerney, 2001; Gallus y Schink, 1994), pudiéndose encontrar los supuestos genes codificantes de dichas enzimas mediante análisis *in silico* de los genomas de algunos biodegradadores anaeróbicos (Harrison y Harwood, 2005; Rabus, 2005).

2.2.2 Genética de la ruta de degradación anaeróbica del benzoato

Los genes responsables de la degradación anaeróbica del benzoato han sido estudiados ampliamente tanto en *T. aromatica* (Breese *et al.*, 1998) como en *R. palustris* (Egland *et al.*, 1997). En *R. palustris*, los genes implicados en la degradación anaeróbica de varios compuestos aromáticos se organizan en un *cluster* de 25.4 kb que incluye los genes *bad*, responsables de la degradación de benzoato, los genes *ali*, responsables de la degradación de ácidos alicíclicos, y los genes *hba*, responsables de la degradación 4-hidroxi-benzoato (Fig. 3 y Tabla 2). Los genes *badDEFG* codifican las cuatro subunidades de la BCR de *R. palustris*, constituyendo una unidad transcripcional cuya expresión se induce por benzoato (Egland *et al.*, 1997). El gen *badA* codifica la enzima benzoato-CoA ligasa, responsable de la activación del benzoato a benzoil-CoA. El producto génico del gen *badB* posee una identidad significativa (50%) con proteínas del tipo ferredoxina, cuya función consiste en la transferencia de los electrones necesarios para la reducción del anillo aromático (Fig. 2).

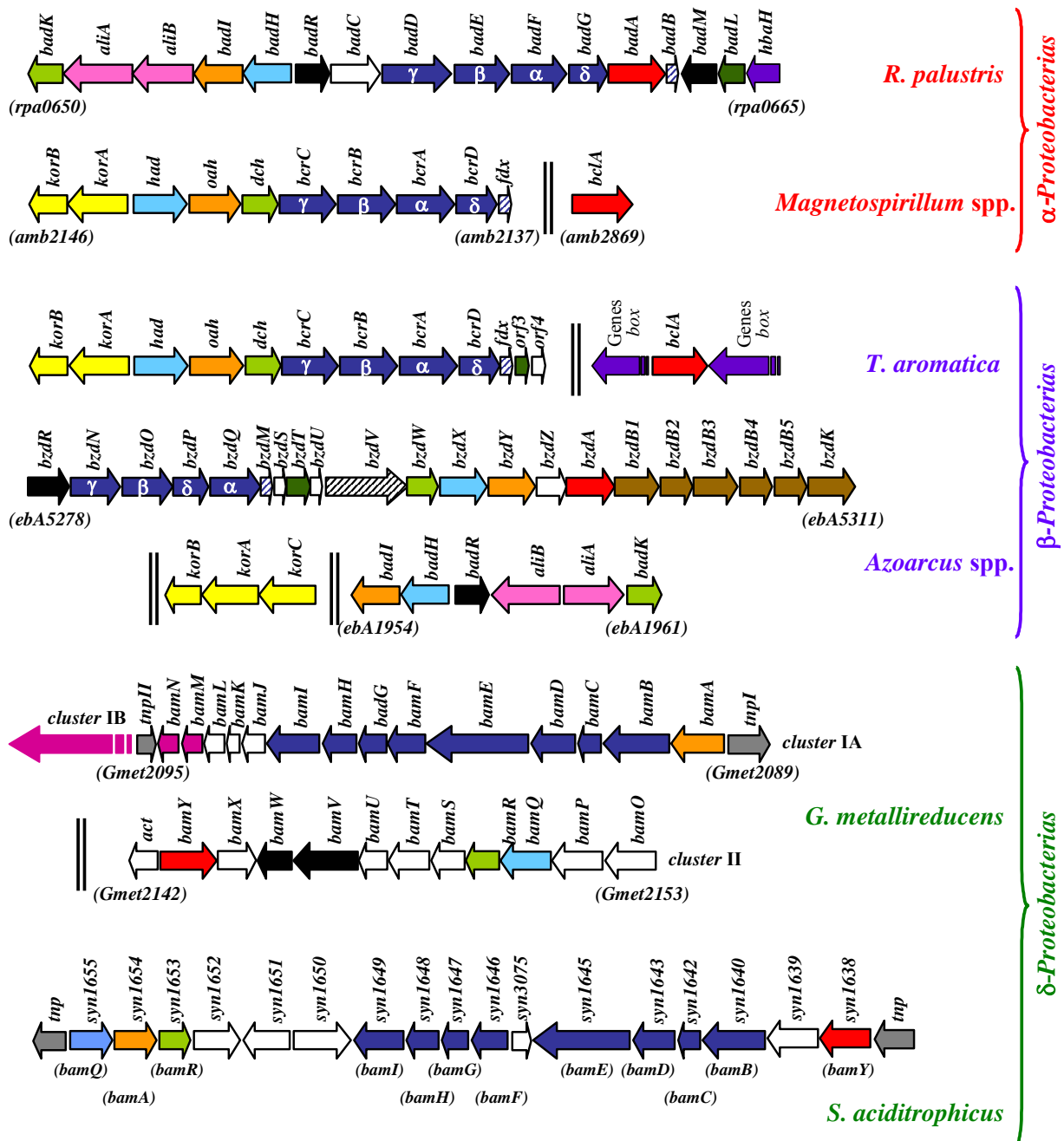


Figura 3. Organización génica de la ruta de degradación anaeróbica del benzoato en α , β y δ -proteobacterias. *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 (NC_005296), *Magnetospirillum* spp. [*M. magneticum* AMB-1 (NC_007626); *M. magnetotacticum* MS-1 (AAP00000000) y *Magnetospirillum* sp. TS-6 (AB-167726 y AB243675)], *Thauera aromatica* (AJ224959), *Azoarcus* spp. [*Azoarcus* sp. CIB (AF515816), *A. evansii* (AJ428529) y *Azoarcus* sp. EbN1 (NC_006513)], *Geobacter metallireducens* GS-15 (NC_007517) y *Syntrophus aciditrophicus* SB (NC_007759). Los nombres de los genes se detallan en la Tabla 2. Los genes han sido representados con flechas de diversos colores: **rojas**, genes que codifican benzoato-CoA ligasas; **azul oscuro**, genes que codifican las subunidades α - β - δ - γ de la benzoil-CoA reductasa; **rayas azules**, genes que codifican las ferredoxinas asociadas a las benzoil-CoA reductasas; **rayas azules**, genes que codifican las ferredoxinas asociadas a las benzoil-CoA reductasas; **amarillas**, genes KGOR; **rayas negras**, genes que codifican posibles oxidorreductasas dependientes de NADPH y ferredoxina; **verde claro**, genes que codifican enoil-CoA hidratasas; **azul claro**, genes que codifican hidroxiacil-CoA deshidrogenasas dependientes de NAD^+ ; **naranjas**, genes que codifican oxoacil-CoA hidrolasas; **negras**, genes reguladores; **verde oscuro**, genes que codifican posibles acil-transferasas; **marrones**, posibles genes transportadores; **rosas**, genes que codifican la ciclohexanocarboxilato-CoA ligasa (*aliA*) y la ciclohexanocarboxil-CoA deshidrogenasa (*aliB*); **moradas**, genes pertenecientes a otras rutas catabólicas de compuestos aromáticos; **blancas**, genes de función desconocida. Dos rayas verticales separan los genes no adyacentes en el genoma.

Ambos genes, *badA* y *badB*, constituyen una unidad transcripcional. Los genes *badH* y *badK* codifican proteínas del tipo flavín-deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa, respectivamente, implicadas ambas en las reacciones que oxidan el ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA a 2-cetociclohexano-1-carbonil-CoA (Fig. 2). La enzima codificada por el gen *badI* es responsable de la actividad 2-cetociclohexano-1-carbonil-CoA hidrolasa, que da lugar a la apertura del anillo alicíclico (Fig. 2). Los genes *badH*, *badK* y *badI* constituyen, junto con los genes *aliA* y *aliB*, otra unidad transcripcional cuya orientación es divergente respecto de los demás genes catabólicos del *cluster bad* (Fig. 3).

En *T. aromatica*, los genes implicados en la ruta de degradación anaeróbica del benzoato se agrupan en un *cluster* de 7.9 kb (*cluster bcr*), en el cual se disponen ocho genes transcritos en la misma dirección (Figs. 2 y 3 y Tabla 2). El gen que codifica la benzoato-CoA ligasa en *T. aromatica* (*bclA*) no forma parte del *cluster bcr*, sino que se encuentra localizado en el *cluster* génico *box* implicado en la degradación aeróbica de benzoato (Schuhle *et al.*, 2003), con lo que su expresión es inducida cuando las células crecen aeróbicamente en benzoato. Por otro lado, en una posición 5' respecto del gen *had*, se han localizado dos genes, *korA* y *korB*, orientados en sentido divergente al *cluster bcr*, que codifican las subunidades α y β , respectivamente, de la enzima KGOR, cuya función consiste en regenerar el estado reducido de la ferredoxina que participa en la reacción catalizada por la BCR (Dorner y Boll, 2002).

También han sido identificados los genes responsables de la degradación anaeróbica del benzoato en diferentes cepas del género *Magnetospirillum* (Fig. 3 y Tabla 2) (Kawaguchi *et al.*, 2006; López Barragán *et al.*, 2004b; Matsunaga *et al.*, 2005; Shinoda *et al.*, 2005). El *cluster bcr* de *Magnetospirillum* presenta una organización génica semejante a la del *cluster bcr* de *T. aromatica*, con dos operones divergentes (Fig. 3) cuyos genes también poseen una elevada similitud con los genes de *T. aromatica*. Además, el gen que codifica la benzoato-CoA ligasa en *Magnetospirillum* (*bclA*) también se localiza fuera del *cluster bcr*, como en el caso de *T. aromatica* (Kawaguchi *et al.*, 2006; López Barragán *et al.*, 2004b; Matsunaga *et al.*, 2005; Shinoda *et al.*, 2005).

Tabla 2. Nombres de los genes que codifican la benzoato-CoA ligasa y la ruta alta del benzoil-CoA en α y β -proteobacterias.

Enzima	Nombre del gen			
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	<i>Magnetospirillum ssp.</i>	<i>Thauera aromatica</i>	<i>Azoarcus spp.</i>
Benzoato-CoA ligasa	<i>badA</i>	<i>bclA</i>	<i>bclA</i>	<i>bzdA</i>
Subunidad α de la BCR ^a	<i>badF</i>	<i>bcrA</i>	<i>bcrA</i>	<i>bzdQ</i>
Subunidad β de la BCR ^a	<i>badE</i>	<i>bcrB</i>	<i>bcrB</i>	<i>bzdO</i>
Subunidad γ de la BCR ^a	<i>badD</i>	<i>bcrC</i>	<i>bcrC</i>	<i>bzdN</i>
Subunidad δ de la BCR ^a	<i>badG</i>	<i>bcrD</i>	<i>bcrD</i>	<i>bzdP</i>
Ferredoxina	<i>badB</i>	<i>fdx</i>	<i>fdx</i>	<i>bzdM</i>
Enoil-CoA hidratasa	<i>badK</i>	<i>dch</i>	<i>dch</i>	<i>bzdW</i>
Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	<i>badH</i>	<i>had</i>	<i>had</i>	<i>bzdX</i>
Oxoacil-CoA hidrolasa	<i>badI</i>	<i>oah</i>	<i>oah</i>	<i>bzdY</i>

^a Benzoil-CoA reductasa de organismos anaerobios facultativos.

En el género *Azoarcus* han sido identificados los genes *bzd* como los responsables de la degradación anaeróbica del benzoato (Figs. 2 y 3 y Tabla 2). El *cluster bzd* se organiza en dos operones, el operón regulador *bzdR* y el operón catabólico *bzdNOPQMSTUVWXYZA*, ambos orientados en la misma dirección (López Barragán *et al.*, 2004a). El gen *bzdR* codifica el regulador transcripcional BzdR, responsable de la regulación de la expresión del promotor catabólico P_N (Barragán *et al.*, 2005). Los genes *bzdNOPQ* y *bzdM* codifican las cuatro subunidades de la benzoil-CoA reductasa y su correspondiente ferredoxina, respectivamente. El gen *bzdV* codifica una presunta oxidorreductasa implicada en la regeneración del estado reducido de la ferredoxina (Fig. 2). Los productos génicos de *bzdW*, *bzdX* y *bzdY* muestran una mayor similitud con las correspondientes hidratasa, deshidrogenasa e hidrolasa implicadas en la ruta de β -oxidación modificada de *T. aromatica*, que con las enzimas correspondientes de *R. palustris*, lo que sugiere que *Azoarcus* podría llevar a cabo la β -oxidación del intermediario alicíclico del mismo modo que *T. aromatica*, generando 3-hidroxiipimelil-CoA como producto final (Fig. 2). El gen *bzdA* codifica la benzoato-CoA ligasa responsable de la activación del benzoato a benzoil-CoA (López Barragán *et al.*, 2004a) (Fig. 2).

Este gen se localiza al final del *cluster bzd*, al contrario que su ortólogo en *T. aromatica* (*bcrA*), que se sitúa fuera del *cluster* de degradación anaeróbica. Los genes *bzdS*, *bzdU* y *bzdZ* codifican proteínas de función desconocida hasta el momento. Por último, en una posición 3' respecto del gen *bzdA*, se han podido localizar seis genes cuyos productos génicos presentan una elevada identidad con las cinco subunidades de transportadores tipo ABC (*bzdB1B2B3B4B5*) y con un transportador (*bzdK*) de la familia MFS, respectivamente (Rabus *et al.*, 2005), lo que sugiere que el *cluster bzd* incluye los transportadores del benzoato (Fig. 3).

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

La capacidad de las células bacterianas de degradar compuestos aromáticos es dependiente no sólo de la presencia del *cluster* de genes catabólicos adecuado que codifique las enzimas necesarias para la degradación de estos compuestos, sino también de la correcta expresión de los genes en el momento y lugar adecuado. De igual manera, el control de la expresión de estos genes no depende únicamente de la presencia o ausencia de los compuestos aromáticos correspondientes, sino también de una amplia variedad de estímulos ambientales (Cases y de Lorenzo, 2005). La regulación de la expresión génica puede ser llevada a cabo a diferentes niveles, tanto transcripcionales como post-transcripcionales, siendo la mejor caracterizada la que tiene lugar a nivel transcripcional (Carmona *et al.*, 2008; Cases y de Lorenzo, 2005; Díaz y Prieto, 2000; Shingler, 2003; Tropel y van der Meer, 2004).

Si se realiza un análisis global de las proteínas reguladoras específicas que controlan el catabolismo de compuestos aromáticos se puede encontrar una gran divergencia en sus correspondientes orígenes evolutivos, lo que sugiere que genes catabólicos y reguladores podrían haber evolucionado independientemente (Cases y de Lorenzo, 2005; de Lorenzo y Pérez-Martín, 1996). Uno de los mecanismos evolutivos para obtener reguladores capaces de responder a señales semejantes de diferentes formas es la combinación de dominios reguladores similares que reconozcan el mismo ligando con diferentes dominios de unión a DNA. Otro factor de variabilidad en la regulación es el hecho de que, aunque algunos reguladores muestren una arquitectura muy similar, pueden ser responsables de diferentes efectos en la célula dependiendo de la

localización de sus sitios de unión (regiones operadoras) en los correspondientes promotores regulados. Esto permite que el mismo regulador pueda activar ciertos genes cuando se une en una posición 5' respecto de la región de unión de la RNA polimerasa (RNAP), a la vez que reprimir otros genes cuando solapa o se une en posición 3' respecto de dicha región. Todos estos factores son responsables del extraordinario grado de plasticidad y adaptabilidad que presentan las redes de regulación (Carmona *et al.*, 2008; Cases y de Lorenzo, 2005; Díaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004).

Si bien la mayor parte de la información existente sobre regulación del catabolismo de compuestos aromáticos proviene de las rutas de degradación aeróbicas, en los últimos años se ha producido un progreso notable en el estudio y determinación de los reguladores de rutas anaeróbicas, obteniéndose múltiples evidencias de que los mismos principios establecidos para la regulación aeróbica pueden ser aplicables a la regulación de rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos. No obstante, aún se desconocen multitud de elementos reguladores responsables del control de dichas rutas metabólicas, y sólo unos pocos han sido caracterizados y relacionados con la regulación transcripcional de este tipo de rutas (Carmona *et al.*, 2009). En la Tabla 3 se detallan algunos reguladores específicos de efector ya caracterizados, y otra serie, más amplia, de proteínas potencialmente reguladoras, que pertenecen a diversas familias de reguladores transcripcionales y podrían controlar la expresión de genes implicados en catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos.

Además, cuando las bacterias se encuentran en su medio natural, se enfrentan a multitud de señales químicas, físicas y biológicas que necesitan procesar e integrar con el fin de dar una respuesta fisiológica de un tipo u otro. Entre estas señales, cabe destacar las múltiples fuentes de carbono que una bacteria puede encontrar en el ecosistema, por lo que necesita decidir cuáles de ellas se deben consumir preferentemente, en detrimento de las demás, con el fin de optimizar su metabolismo. Por ello, las bacterias han desarrollado una serie de mecanismos fisiológicos de control que establecen una regulación sobreimpuesta a la regulación específica de los operones catabólicos en base al estado fisiológico y metabólico de la célula (Carmona, 2008; Cases y de Lorenzo, 2001; Prieto *et al.*, 2004; Shingler, 2003).

Tabla 3. Proteínas implicadas en la regulación transcripcional del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos.

Regulador	Familia	Microorganismo	Actividad	Ruta	Nº Acceso GenBank
Específico de efector					
BzdR	BzdR	<i>Azoarcus</i> sp. CIB	Represor	Benzoato	AAQ08805
ORF11 ^a	XylR/DmpR	<i>T. aromatica</i> K172	Desconocido	Fenol	CAC12685
PdeR ^a	XylR/DmpR	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	Desconocido	Fenol	Q5P474
Gmet1542 ^a	XylR/DmpR	<i>G. metallireducens</i> GS-15	Desconocido	Tolueno	ABB31776
EbA324	XylR/DmpR	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	Desconocido	<i>p</i> -Etilfenol	AAAD12187/ AAD12186
TutC1/B1	TCR ^b	<i>T. aromatica</i> T1	Activador	Tolueno	CAA05048/ CAA05049
TdiS/R ^a	TCR ^b	<i>T. aromatica</i> K172	Activador	Tolueno	CAI07156/ CAI07155
TdiS/R ^a	TCR ^b	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	Activador	Tolueno	AAK50369/ AAK50368
TdiS/R ^a	TCR ^b	<i>Azoarcus</i> sp. T	Activador	Tolueno	CAI07438/ CAI07439
Tcs2/Tcr2 ^a	TCR ^b	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	Desconocido	Etilbenceno	CAI07436/ CAI07437
Tcs1/Tcr1 ^a	TCR ^b	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	Desconocido	Acetofenona	ABB32375/ ABB32374
BamV/W ^a	TCR ^b	<i>G. metallireducens</i> GS-15	Desconocido	Benzoato	AAF04013
HbaR	Fnr/Crp	<i>R. palustris</i> CGA009	Activador	4-Hidroxi-benzoato	AAL87770
CprK	Fnr/Crp	<i>D. hafniese</i>	Activador	<i>o</i> -Clorofenol	ABM69269
GcdR	LysR	<i>Azoarcus</i> sp. CIB	Activador	Ruta baja benzoil-CoA	ABC88392
NicR ^a	LysR	<i>E. barkeri</i>	Desconocido	Nicotinato	CAI09182
PadR ^a	GntR	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	Desconocido	Fenilacetato	ABE38758
Rpd1521 ^a	GntR	<i>R. palustris</i> BisB5	Desconocido	Fenilacetato	O33817
ORF1 ^a	MarR	<i>T. aromatica</i> K172	Desconocido	4-Hidroxi-benzoato	ABB32362
PcmQ ^a	MarR	<i>G. metallireducens</i> GS-15	Desconocido	4-Hidroxi-benzoato	AAC23923
BadR	MarR	<i>R. palustris</i> CGA009	Activador	Benzoato	Q6N8V9
Rpa1794 ^a	MarR	<i>R. palustris</i> CGA009	Desconocido	<i>p</i> -Cumarato	CAI06487
EbA715 ^a	TetR	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	Desconocido	3-Hidroxi-benzoato	ABB31754
Gmet1520 ^a	TetR	<i>G. metallireducens</i> GS-15	Desconocido	Tolueno	O07465
BadM	Rrf2	<i>R. palustris</i> CGA009	Represor	Benzoato	AAQ08805
Dependiente de oxígeno					
AadR	Fnr/Crp	<i>R. palustris</i> CGA009	Activador	Benzoato/4-Hidroxi-benzoato	B43334

^a Predicha.

^b Sistema regulador de dos componentes.

Este tipo de regulación sobreimpuesta es llevada a cabo por reguladores globales que controlan complejas redes de regulación, cada una de ellas conteniendo distintos reguladores específicos. El concepto de regulación sobreimpuesta encaja con la idea de conectividad e integración de la señal en una red de regulación transcripcional global, lo que explica el hecho de que muchos reguladores (específicos) puedan afectar tan sólo a un escaso número de genes y, al mismo tiempo, unos pocos reguladores (globales) puedan influir en un elevado número de genes (Cases y de Lorenzo, 2005). La mayoría de los reguladores involucrados en la regulación sobreimpuesta del catabolismo de compuestos aromáticos se han descrito en rutas aeróbicas (Carmona *et al.*, 2008; Díaz y Prieto, 2000; Marqués *et al.*, 2006; Moreno y Rojo, 2008; Prieto *et al.*, 2004; Rojo, 2004; Shingler, 2003), pero, no obstante, también se han descrito un par de reguladores cuya actividad ha sido relacionada con reguladores específicos de rutas de degradación anaeróbicas, como es el caso de AadR de *R. palustris* (Dispensa *et al.*, 1992; Egländ y Harwood, 1999) (Tabla 3) y de AcpR de *Azoarcus* sp. CIB (descrita en este trabajo).

3.1 Regulación específica de efector

Las rutas catabólicas de compuestos aromáticos, tanto aeróbicas como anaeróbicas, están sometidas a una estricta regulación dependiente de sus respectivos sustratos (Tropel y van der Meer, 2004; Wohlbrand *et al.*, 2007). Aunque los sistemas de regulación mejor estudiados son los de las rutas de degradación aeróbicas y se han descrito al respecto decenas de trabajos en la literatura (Carmona *et al.*, 2008), se han descrito también unos pocos circuitos reguladores de rutas de degradación anaeróbicas (revisado por Carmona *et al.*, 2009), de los cuales los mejor estudiados son los responsables de la regulación de la expresión de los genes del catabolismo anaeróbico del benzoato, en dos organismos modelo, la bacteria fototrófica *R. palustris* CGA009 y la bacteria desnitrificante *Azoarcus* sp. CIB.

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

La bacteria *R. palustris* CGA009 presenta un *cluster* de degradación anaeróbica de benzoato denominado *bad* (*benzoic acid degradation*) cuya inducción dependiente de benzoato, ha sido confirmada tanto por experimentos clásicos de expresión génica (Egländ *et al.*, 1997; Egländ y Harwood, 1999; Pelletier y Harwood, 2000; Peres y Harwood, 2006) como por experimentos de proteómica (Pan *et al.*, 2008; VerBerkmoes *et al.*, 2006). El *cluster bad* se divide en al menos 5

operones diferentes: *badDEFGAB*, *badHliABadK*, *badC*, *badR* y *badM* (Fig. 4) (Egland *et al.*, 1997; Egland y Harwood, 1999; Pelletier y Harwood, 2000; Peres y Harwood, 2006).

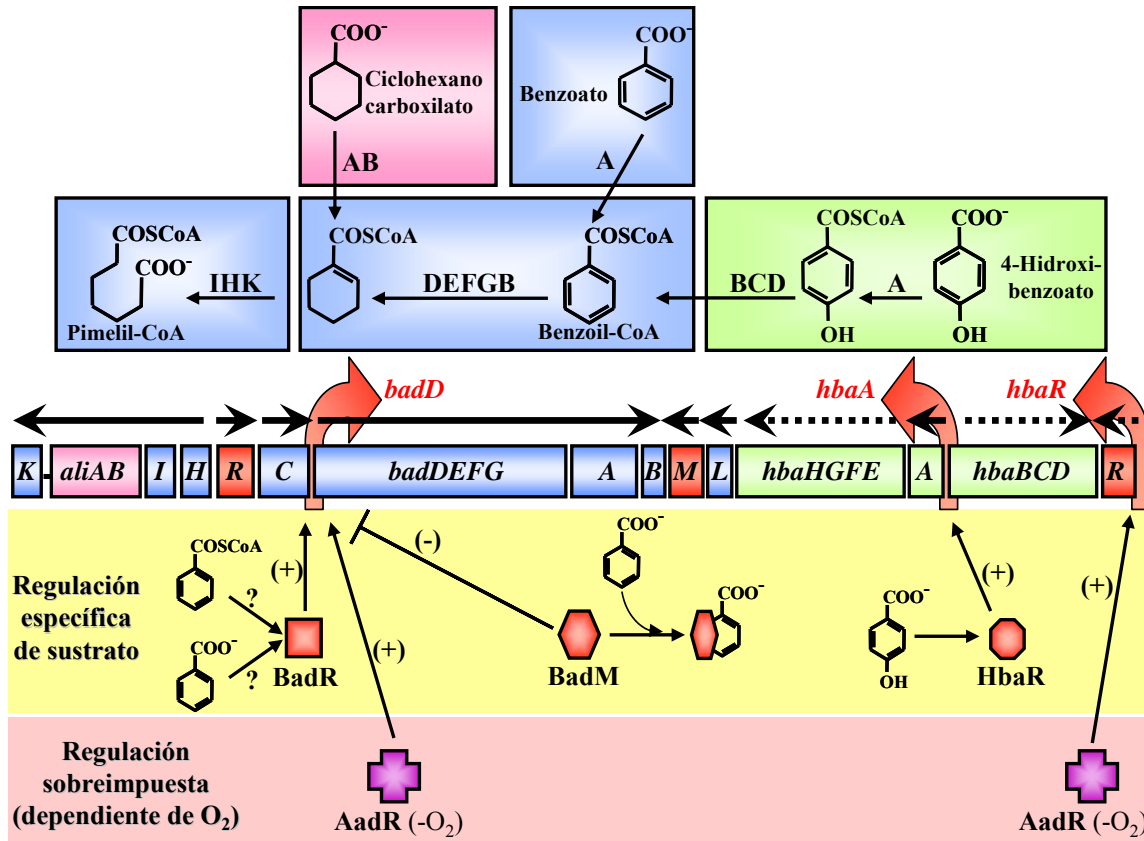


Figura 4. Organización y regulación del cluster *bad-ali-hba* de *R. palustris*. Los genes *ali*, *bad* y *hba* se muestran en rosa, azul y verde, respectivamente. Las enzimas codificadas por estos genes, así como las reacciones que catalizan estas enzimas han sido recuadradas en los mismos colores, rosa, azul y verde, respectivamente. Los genes reguladores *badR*, *badM* y *hbaR* y sus correspondientes reguladores BadR, BadM y HbaR se muestran en color rojo (regulación específica de sustrato). El regulador AadR, que se encuentra codificado fuera de este cluster, se muestra en violeta (regulación dependiente de oxígeno). Las flechas negras situadas encima del cluster indican que los genes que abarcan constituyen un operón (flechas sólidas) o un posible operón (flechas de puntos). Los promotores *badD*, *hbaA* y *hbaR* han sido representados en forma de flechas curvas de color rojo. Los símbolos (-) y (+) indican represión y activación transcripcional, respectivamente.

Los genes que constituyen el operón *badDEFG* codifican las cuatro subunidades de la proteína BCR, el gen *badA* codifica la benzoato-CoA ligasa y el gen *badB* codifica la ferredoxina (Fig. 2). El sitio de inicio de la transcripción se localiza a 71 nt respecto del codón de iniciación predicho para el gen *badD* (Egland *et al.*, 1997; Peres y Harwood, 2006). El producto del gen *badR* actúa como activador transcripcional del promotor del operón *badDEFGAB* (Fig. 4), aunque aún no se ha demostrado que la proteína BadR se una directamente a dicha región

promotora (Egland y Harwood, 1999). La proteína BadR pertenece a la familia MarR de reguladores transcripcionales bacterianos. No obstante, BadR se comporta como un activador, al contrario de lo que sucede con otros miembros de la familia MarR, entre los que cabe destacar al mejor caracterizado hasta el momento, la proteína MarR, que reprime la expresión de los genes de resistencia a antibióticos *marAB*, siendo el 2-hidroxibenzoato (salicilato) la molécula inductora (Martin y Rosner, 1995). En el caso de BadR se han sugerido como posibles inductores el benzoato o el benzoil-CoA, siendo este último el candidato más probable (Egland y Harwood, 1999).

Además de la regulación dependiente de BadR, el promotor *badD* también está controlado por la proteína AadR en respuesta a anaerobiosis (regulación sobrepuesta) (Fig. 4 y Tabla 3). El producto del gen *aadR* fue el primero cuya función fue relacionada con la regulación del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos (Dispensa *et al.*, 1992; Egland y Harwood, 1999). Los estudios iniciales realizados con cepas de *R. palustris* defectivas en el gen *aadR* demostraron la implicación de su producto génico en la regulación de la síntesis de benzoato-CoA ligasa y 4-hidroxibenzoato-CoA ligasa, dos enzimas responsables de la degradación anaeróbica de benzoato y 4-hidroxibenzoato, respectivamente (Dispensa *et al.*, 1992). Estudios posteriores sugirieron que la proteína AadR podría estar involucrada en la regulación de la expresión de rutas del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en respuesta a la presencia o ausencia de oxígeno (Egland y Harwood, 1999), debido a su significativa identidad con el regulador transcripcional Fnr de *E. coli* (Unden, 1995; 2002).

Los reguladores BadR y AadR actuando conjuntamente son capaces de inducir unas 100 veces la expresión de la fusión *badE::lacZ* que tiene lugar cuando un cultivo de *R. palustris* cultivado aeróbicamente en succinato se transfiere a condiciones anaeróbicas con benzoato. El gen *aadR* aumenta dicha expresión unas 20 veces en respuesta a la anaerobiosis, mientras que el gen *badR* sería el responsable de un incremento de 5 veces más en respuesta a la presencia de benzoato (Egland y Harwood, 1999).

Además, existe un tercer regulador transcripcional implicado en el control de la actividad del promotor *badD*, la proteína BadM, que actúa como represor del mismo (Fig. 4) (Peres y Harwood, 2006). Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que BadM podría estar reprimiendo la expresión del *cluster* de degradación

de benzoato mediante su unión al promotor *badD*, siendo posiblemente el benzoato el inductor al unirse a la proteína BadM e impedir su interacción con el promotor. Sin embargo, esta hipótesis aún no ha sido demostrada (Peres y Harwood, 2006). La proteína BadM (Tabla 3) pertenece a la familia Rrf2 de reguladores transcripcionales, que incluye a diversos represores implicados en el metabolismo del nitrito, del óxido nítrico o del hierro (Giel *et al.*, 2006), pero no conserva las cisteínas que conforman el *cluster* ferrosulfurado (Fe-S) presente en muchos de los miembros de esta familia (Peres y Harwood, 2006).

A pesar de todos los estudios mencionados, la regulación del catabolismo anaeróbico del benzoato en *R. palustris* aún no ha sido elucidada completamente, como pone de manifiesto el hecho de que no se conoce la regulación del operón *badHI-aliBAbadK* (Fig. 4), en la cual no parece que intervengan ni BadR ni BadM (Egland y Harwood, 1999; Peres y Harwood, 2006).

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

La bacteria *Azoarcus* sp. CIB contiene el *cluster bzd* responsable del catabolismo anaeróbico del benzoato (López Barragán *et al.*, 2004). Los genes catabólicos *bzdNOPQMSTUVWXYZA* constituyen un operón que se encuentra regulado por el promotor P_N (Fig. 5) (López Barragán *et al.*, 2004). En posición 5' respecto de este operón catabólico, se localiza otro operón constituido por un único gen denominado *bzdR*, cuyo producto controla la expresión de los genes catabólicos mediante su interacción con el promotor P_N (Fig. 5) (Barragán *et al.*, 2005). La proteína BzdR reprime la actividad del promotor P_N cuando las células de *Azoarcus* sp. CIB crecen anaeróticamente en un medio cuya fuente de carbono no sea un compuesto aromático. Sin embargo, el inductor de la ruta *bzd* no es el benzoato sino el primer intermediario de esta ruta, el benzoil-CoA (Barragán *et al.*, 2005). Estos resultados sugerían que la proteína BzdR se encontraba específicamente adaptada para controlar la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus*, mediante la capacidad de reconocer al benzoil-CoA (Barragán *et al.*, 2005).

El promotor P_N del *cluster bzd* ha sido caracterizado, localizándose el sitio de inicio de la transcripción a 75 nt respecto del codón ATG de inicio de la traducción del gen *bzdN*, así como las posibles cajas -10 y -35 de interacción con la subunidad σ^{70} de la RNAP. De igual forma, se han determinado mediante ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I las tres cajas operadoras del promotor

P_N a las que se une BzdR: región I (-32 a +31), región II (-83 a -63) y región III (-146 a -126). Las tres regiones poseen repeticiones de la secuencia TGCA incluidas en palíndromos más largos, dos en la región I y uno en cada una de las regiones II y III (Barragán *et al.*, 2005). Además, se ha podido observar que la unión de BzdR induce cambios en la estructura del promotor P_N , tal y como ponen de manifiesto los enlaces fosfodiéster que se vuelven hipersensibles a la digestión con DNasa I (Barragán *et al.*, 2005). La región operadora I del promotor P_N que reconoce BzdR solapa tanto con el sitio de inicio de la transcripción, como con la caja -10 que reconoce la subunidad σ^{70} de la RNAP, lo que explica el papel represor de BzdR sobre el promotor P_N (Barragán *et al.*, 2005).

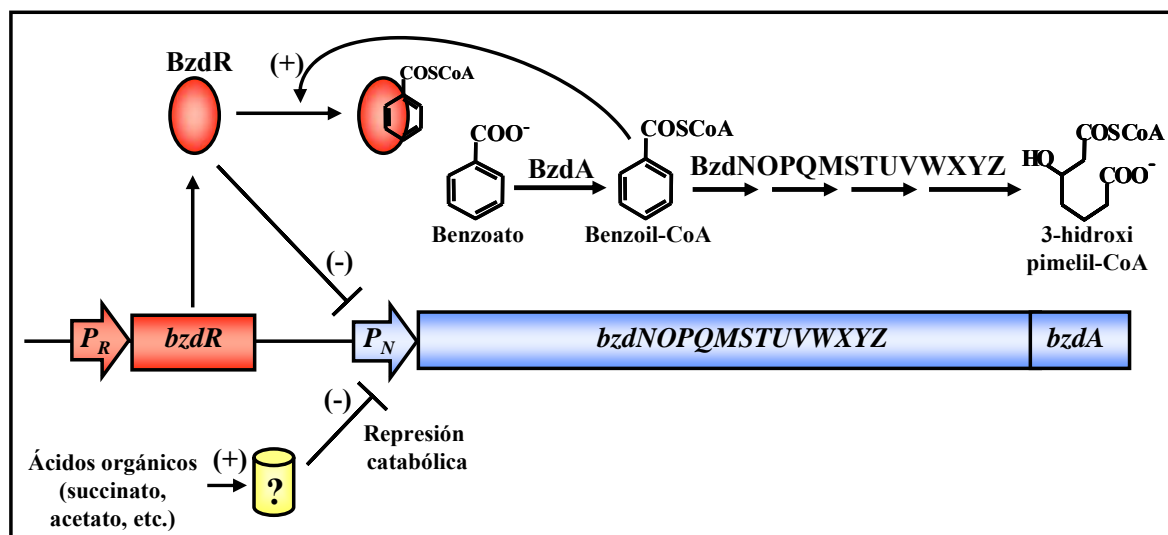


Figura 5. Organización y regulación transcripcional del cluster *bzd* de *Azoarcus* sp. CIB. Los genes se encuentran agrupados en dos operones, el operón regulador *bzdR* (rojo) y el operón catabólico *bzdNOPQMSTUVWXYZA* (azul), controlados por los promotores P_R y P_N , respectivamente. El promotor P_N está reprimido por la proteína BzdR (elipse roja). La activación del promotor P_N se produce por medio de la molécula inductora, el benzoil-CoA, que se une a BzdR. Algunas fuentes de carbono, tales como ácidos orgánicos no aromáticos, causan represión catabólica del promotor P_N por medio de un factor aún desconocido (cilindro amarillo). Los símbolos (-) y (+) indican represión y activación transcripcional, respectivamente.

El análisis de la estructura primaria del regulador BzdR (298 aa) reveló una arquitectura molecular única, no descrita en ninguna de las proteínas reguladoras caracterizadas hasta ahora, lo que convierte a BzdR en un prototipo de una nueva subfamilia de reguladores transcripcionales (Barragán *et al.*, 2005). Dicho análisis reveló la existencia de dos diferentes dominios en la proteína BzdR, el N-terminal o NBzdR (residuos 1-90) y el C-terminal o CBzdR (residuos 131-298), ambos conectados por una región *linker* o LBzdR (residuos 91-130) (Fig. 6A).

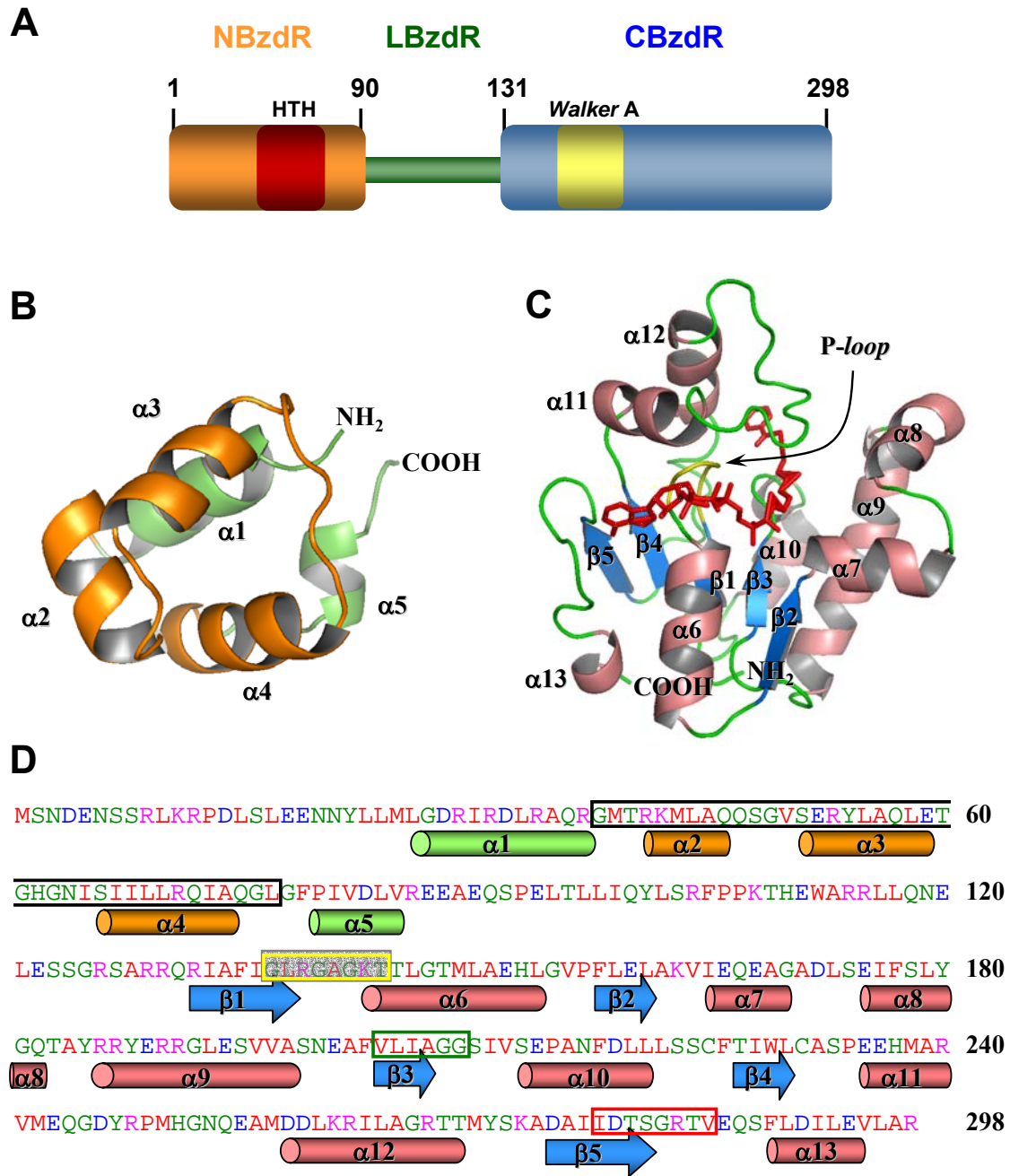


Figura 6. Arquitectura modular de la proteína BzdR. (A) Representación esquemática de los dominios de la proteína BzdR. También se señalan el motivo HTH y el motivo Walker A en color rojo y amarillo, respectivamente. (B) **Modelo tridimensional del dominio NBzdR.** Diagrama de cintas del dominio NBzdR donde se pueden apreciar las 5 hélices α (cintas verdes y naranjas). Las hélices y el loop que conforman el clásico motivo HTH de los reguladores tipo XRE han sido representados en color naranja. (C) **Modelo tridimensional del dominio CBzdR.** Diagrama de cintas del dominio CBzdR unido al benzoil-CoA. El dominio CBzdR contiene 5 cadenas β (flechas azules) y 8 hélices α (cintas rosadas). El sitio de unión del fosfato (P-loop o motivo Walker A) se puede apreciar en color amarillo. La molécula de benzoil-CoA se muestra en color rojo, con los extremos benzoilo y 3P-ADP sombreados de color azul y amarillo, respectivamente. Los correspondientes extremos N- y C-terminal de ambos dominios han sido marcados como NH₂ y COOH, respectivamente. (D) **Secuencia de la proteína BzdR.** Los aminoácidos se indican mediante el código de una letra y los cuatro colores en que se muestran representan el grupo de aminoácidos al que pertenecen: rojo = apolares; verde = polares sin carga; azul = ácidos; rosa = básicos. Se han remarcado con un rectángulo negro los residuos que pertenecen al motivo HTH, amarillo con fondo gris los residuos que constituyen el motivo Walker A ó P-loop, verde el motivo Walker B, y rojo el motivo de unión a adenina. Las hélices α ($\alpha 1$ - $\alpha 13$) y las cadenas β ($\beta 1$ - $\beta 5$) se representan con cilindros y flechas, respectivamente, cuyos colores se corresponden con los de los paneles B y C.

El dominio NBzdR muestra una significativa similitud a nivel de secuencia con los miembros de la familia de reguladores transcripcionales HTH-XRE, en la cual se incluyen más de 1300 proteínas de eucariotas, bacterias, arqueas y bacteriófagos. Esta familia se caracteriza por la presencia de un motivo hélice-giro-hélice (HTH) de unión a DNA similar a un motivo HTH muy bien caracterizado, el de la proteína Cro del fago λ (Sauer *et al.*, 1982). De todos los miembros de esta familia, el dominio NBzdR mostró una significativa identidad (34%) con la proteína SinR (14 kDa), un regulador transcripcional implicado en la esporulación de *B. subtilis* (Cervin *et al.*, 1998), cuya estructura tridimensional fue utilizada con el fin de generar un modelo tridimensional de NBzdR (Fig. 6B). Dicho modelo predecía la presencia de un motivo HTH (residuos 38-76) en el dominio NBzdR de la proteína BzdR, responsable de la interacción con el DNA. Por otro lado, el dominio CBzdR (Fig. 6C) muestra similitud con siquimato quinasa, unas enzimas encargadas de catalizar la conversión de siquimato a 3P-siquimato usando ATP como co-sustrato, en la ruta central de biosíntesis de compuestos aromáticos (Vogels y Van der Drift, 1976).

Con el fin de obtener un modelo tridimensional de la estructura de CBzdR, se utilizó la estructura tridimensional de la siquimato quinasa I (AroK) de *E. coli* (Gu *et al.*, 2002; Romanowski y Burley, 2002), con la cual comparte un 23% de identidad de secuencia. Este modelo del dominio CBzdR predice la estructura de unión de mononucleótidos característica y altamente conservada en determinadas proteínas (Krell *et al.*, 1998), que se constituye de cinco cadenas β paralelas flanqueadas por ocho hélices α (Fig. 6C). Cabe destacar en esta estructura la presencia de un motivo *Walker-A* o *P-loop* de unión de fosfato, así como una serie de residuos de glicina conservados en un motivo *Walker-B* de unión de purinas (Saraste *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1982).

El modelo tridimensional del dominio CBzdR permitió la generación de un modelo de unión entre CBzdR y la molécula inductora benzoil-CoA (Fig. 6C), cuyos dos extremos, el grupo 3P-ADP y el benzoilo, guardan cierta similitud estructural con los dos sustratos de la siquimato quinasa, ATP y siquimato, respectivamente. En el modelo del complejo CBzdR/benzoil-CoA el 3P-ADP del benzoil-CoA se posiciona en el supuesto sitio de unión de nucleótidos, y la unidad de pantotenato se posiciona en un surco conformado por los *loops* existentes entre

los residuos 158-163 y 231-271. Dicho surco desemboca en una cavidad (residuos 220-225) equivalente al sitio de unión del siquimato descrito para las siquimato quininas (Gu *et al.*, 2002; Krell *et al.*, 1998), donde se ajusta perfectamente el grupo benzoilo del benzoil-CoA (Fig. 6C) (Barragán *et al.*, 2005). En relación a la actividad enzimática de la siquimato quinasa, se ha propuesto un mecanismo donde los *loops* que constituyen el surco de interacción con los sustratos deben sufrir importantes cambios conformacionales tras producirse la unión de dichos sustratos (Gu *et al.*, 2002). La unión del benzoil-CoA a BzdR podría dar lugar a una serie de cambios conformacionales semejantes a nivel del dominio CBzdR, el cual, a través de la región *linker*, sería capaz de transmitir dicha información al dominio NBzdR con la consecuente inhibición de la represión del promotor P_N mediada por BzdR. No obstante, todavía no se ha conseguido demostrar experimentalmente la arquitectura modular propuesta para el regulador BzdR.

La proteína BzdR constituye el prototipo de una nueva subfamilia de reguladores transcripcionales cuyo número de miembros aumenta de forma constante, tal y como revelan las bases de datos, pudiéndose identificar diversos ortólogos asociados a *clusters* de degradación de benzoato en más de 30 proteobacterias desnitrificantes de los subgrupos α y β . En la mayoría de casos, estos genes reguladores se encuentran ligados a la ruta aeróbica *box* de degradación de benzoato vía benzoil-CoA (Denef *et al.*, 2006; Gescher *et al.*, 2002; Gescher *et al.*, 2006; McLeod, 2008), por lo que probablemente sus productos génicos sean los encargados de regular la expresión de dichas rutas aeróbicas. Hasta ahora sólo se han descrito dos genes *bzdR*, uno de ellos en la cepa *Azoarcus* sp. CIB y el otro en la cepa *Azoarcus* sp. EbN1, que están asociados a la ruta anaeróbica de degradación de benzoato (Carmona *et al.*, 2009).

3.1.3 Otros reguladores del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos

El único gen de la ruta baja del benzoil-CoA cuya expresión ha sido estudiada es el gen *gcdH* que codifica la proteína glutaril-CoA deshidrogenasa en *Azoarcus* sp. CIB (Blázquez *et al.*, 2008). La expresión de este gen se induce cuando la bacteria se cultiva en presencia de compuestos, tales como benzoato o pimelato, cuya degradación genera glutaril-CoA. El análisis de la región del genoma que incluye al gen *gcdH* reveló la existencia de otro gen dispuesto en sentido divergente y denominado *gcdR*, que codifica un activador transcripcional de la familia LysR

(Tabla 3), responsable de la activación del promotor *Pg* del gen *gcdH*. El glutarato y el glutaconato (2,3-dihidrogutarato) son los inductores específicos de la proteína GcdR (Blázquez *et al.*, 2008).

Por otro lado, el hecho de que el gen *gcdR* de *Azoarcus* sp. CIB sea capaz de regular eficientemente la expresión del gen *gcdH* de *P. putida* cuando éste último era expresado en una cepa de *Azoarcus* sp. CIB cuyo gen *gcdH* había sido previamente inactivado, ponía de manifiesto la existencia de una regulación cruzada entre los reguladores GcdR y los promotores *gcdH* provenientes de diferentes subgrupos filogenéticos de proteobacterias (Blázquez *et al.*, 2008), lo que sugiere que la regulación transcripcional del gen *gcdH* se ha conservado en muchas bacterias.

El *cluster hba* codifica las enzimas responsables de la ruta periférica que convierte el 4-hidroxibenzoato (4-HBA) en benzoil-CoA en el microorganismo *R. palustris*. A pesar de no existir datos acerca de la transcripción del *cluster hba*, un análisis de su organización génica permite sugerir cuatro unidades transcripcionales diferentes (Fig. 4): *hbaR*, que codifica el regulador HbaR, *hbaA*, que codifica la enzima 4-HBA-CoA ligasa, *hbaBCD*, que codifican la 4-hidroxibenzoil-CoA reductasa, y *hbaEFGH*, que codifican un posible transportador de tipo ABC (Egland *et al.*, 1997).

El producto del gen *hbaR* es un activador transcripcional capaz de reconocer y unir 4-HBA como molécula efectora y así inducir la expresión del gen *hbaA*, si bien no parece ser capaz de controlar los genes responsables de la degradación aeróbica de 4-HBA en *R. palustris* (Egland y Harwood, 2000) (Fig. 4). La proteína HbaR pertenece a la superfamilia de reguladores transcripcionales Fnr/Crp, concretamente, al grupo Dnr, como han revelado las comparaciones de secuencia llevadas a cabo con miembros de dicho grupo, en el cual se incluyen proteínas que no poseen los residuos de cisteína imprescindibles en la coordinación de los *clusters* Fe-S para la detección de oxígeno (Korner *et al.*, 2003). Con la excepción de HbaR, todos los miembros del grupo Dnr son reguladores globales que controlan la expresión de genes implicados en procesos de desnitrificación (Egland y Harwood, 2000). En *R. palustris* la expresión del gen *hbaA* no es activada en condiciones aeróbicas de crecimiento, lo que sugiere la participación de un segundo regulador capaz de responder a la anaerobiosis (Egland y Harwood, 2000). Curiosamente, la proteína Fnr de *E. coli* es capaz de afectar a la expresión de la fusión *hbaR:lacZ* en ausencia

de oxígeno, lo cual, unido a la existencia de una posible caja consenso de unión de Fnr situada a -42.5 nt respecto del sitio de inicio de la transcripción del gen *hbaR*, sugería que la expresión de *hbaR* en *R. palustris* era activada en respuesta a la ausencia de oxígeno por un ortólogo de la proteína Fnr (Egland y Harwood, 2000). El principal candidato homólogo de la proteína Fnr en *R. palustris* es posiblemente AadR (Tabla 3), ya que, además de pertenecer a la superfamilia de reguladores transcripcionales Fnr/Crp, es necesaria para la expresión del gen *hbaA* (Dispensa *et al.*, 1992). De esta forma, la expresión del gen *hbaA* tendría lugar mediante una cascada de regulación en la cual la proteína AadR actuaría como sensor de oxígeno, activando la expresión del regulador HbaR responsable de la activación de la expresión del gen *hbaA* en respuesta a 4-HBA (Fig. 4) (Egland y Harwood, 2000). Este sistema jerárquico de dos proteínas sería una efectiva estrategia para prevenir fenómenos de regulación cruzada y lograr una regulación más específica bajo condiciones de ausencia de oxígeno (Egland y Harwood, 2000). Hasta la fecha no se conoce cómo se controla la expresión de los operones *hbaBCD* y *hbaEFGH*.

En la mayoría de las bacterias desnitrificantes degradadoras de tolueno, la inducción de los genes catabólicos *bss* parece estar mediada por los productos de los genes *tdiSR*, los cuales se localizan en posición 5' respecto de los genes *bss* y codifican un posible sistema regulador de dos componentes. Estos dos genes constituyen un operón en *Azoarcus* sp. T y se transcriben divergentemente respecto del operón *bss* en todas las cepas del género *Azoarcus* estudiadas hasta ahora (Achong *et al.*, 2001). Por el contrario, en *T. aromatica* K172, los genes *tdiSR* se transcriben en el mismo sentido que los genes *bss*. En esta cepa, el producto del gen *tdiR* es capaz de unirse *in vitro* a una sonda de DNA que incluye la región 5' del operón *bss* (Leuthner *et al.*, 1998). En la cepa *T. aromatica* T1, una mutación puntual en el gen *tutB1* (*tdiR*) impedía tanto el crecimiento anaeróbico en tolueno como la expresión del gen *tutE* (*bssD*), lo cual estaba de acuerdo con el papel de este regulador como activador de los promotores catabólicos *bss* (Coschigano, 2000; Coschigano y Bishop, 2004).

En el sistema regulador TdiSR, el componente sensor TdiS contiene dos dominios PAS y un dominio C-terminal histidín-quinasa (Leuthner *et al.*, 1998). Los dominios PAS probablemente estén implicados en la detección de la molécula(s) inductora que interactúa con la proteína TdiS. Por otro lado, el componente regulador TdiR se compone de un dominio regulador (*receiver*) en el extremo N-

terminal y un motivo HTH en el extremo C-terminal que permitiría su unión a los promotores correspondientes, y que permite clasificar a esta proteína como un miembro de la familia de reguladores FixJ/NarL (Leuthner *et al.*, 1998). Ambos componentes, el sensor TdiS y el regulador TdiR, muestran una significativa similitud con sus correspondientes homólogos de las rutas aeróbicas del catabolismo del tolueno (proteínas TodS y TodT) (Lau *et al.*, 1997) y del estireno (proteínas StyS y StyR) (Velasco *et al.*, 1998), constituyendo todos ellos una nueva subfamilia de sistemas reguladores de dos componentes implicados en el control de rutas catabólicas para la degradación de solventes orgánicos (Busch *et al.*, 2007).

Al contrario de lo descrito hasta el momento en relación con las bacterias desnitrificantes capaces de catabolizar tolueno, no se han hallado ortólogos de *tdiSR* en organismos reductores de hierro como *G. metallireducens*, donde podría existir un sistema de regulación diferente. De hecho, se ha podido observar que los *clusters bss* y *bbs* de este organismo se encuentran flanqueados por dos genes que codifican proteínas cuya secuencia es similar a la de los reguladores XylR y TetR. Puesto que XylR es una proteína reguladora que detecta tolueno (y determinados análogos) y controla la expresión σ^{54} -dependiente de los genes *xyl* implicados en el catabolismo aeróbico de tolueno en diversas cepas de *Pseudomonas* (Cases *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 1997), cabe suponer que un sistema regulador σ^{54} -dependiente también está controlando la expresión del *cluster* de degradación anaeróbica de tolueno en *G. metallireducens* (Carmona *et al.*, 2009).

3.2 Regulación sobreimpuesta

De todas las posibles señales ambientales existentes capaces de afectar la expresión génica de los microorganismos, cabría destacar dos de ellas que lo hacen de forma especialmente notable: el oxígeno y la disponibilidad de fuentes de carbono. Estas señales son capaces de modificar la expresión de los *clusters* implicados en el catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos por medio de reguladores globales que actúan sobre la expresión de los propios reguladores específicos o directamente sobre los promotores catabólicos regulados (Fig. 7).

3.2.1 Regulación dependiente de oxígeno

El oxígeno es uno de los factores ambientales de mayor importancia en el control de la expresión de los genes implicados en rutas anaeróbicas para el

catabolismo de los compuestos aromáticos. Por ejemplo, en el caso de *R. palustris*, los genes *badDEFG* y *badA*, que codifican las cuatro subunidades de la enzima BCR y la benzoato-CoA ligasa, respectivamente, ven disminuida su expresión en condiciones aeróbicas (Egland *et al.*, 1997; Peres y Harwood, 2006). En el caso de *T. aromatica*, se pudo observar una fuerte disminución de la expresión de la enzima BCR cuando las células crecían en un medio aeróbico (Heider *et al.*, 1998). En *M. magnetotacticum* sp. TS-6, los genes *bss* que codifican la bencilsuccinato sintasa implicada en la etapa inicial de la degradación de tolueno únicamente se transcriben si las células son cultivadas anaeróbicamente en presencia de tolueno (Shinoda *et al.*, 2005). En *Azoarcus* sp. EbN1, se ha podido observar que muy pocas proteínas implicadas en la degradación aeróbica de benzoato se expresan cuando las células son cultivadas anaeróbicamente en presencia de benzoato (Wohlbrand *et al.*, 2007).

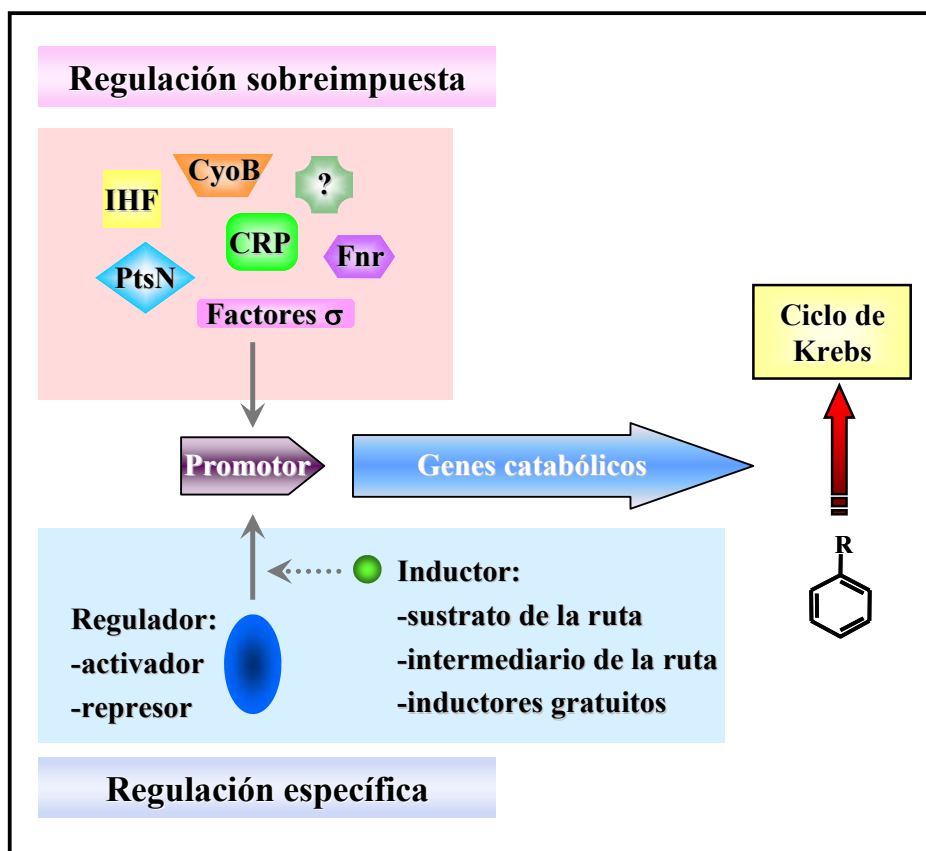


Figura 7: Esquema de los dos niveles de regulación transcripcional del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias. En la degradación de un compuesto aromático, la interacción regulador-promotor es el mecanismo de regulación específico en presencia de la molécula inductora de la ruta (fondo azul). Un segundo nivel de control está constituido por la regulación global o sobreimpuesta, en la que participan reguladores y factores transcripcionales (fondo rosa) como IHF (*Integration Host Factor*), CRP (*cAMP Receptor Protein*), Fnr (*Fumarate nitrate reductase regulator*), factores σ alternativos de la RNAP, CyoB (citocromo ó ubiquinol oxidasa), PtsN (proteína IIA^{Ntr} del sistema fosfoenolpiruvato-azúcar fosfotransferasa), etc. Adaptado de Díaz y Prieto (2000).

Sin embargo, también se han descrito casos en los que los genes de determinadas enzimas sensibles a la presencia de oxígeno se transcriben tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, como la enzima BCR (genes *bcr*) de *M. magnetotacticum* TS-6 (Shinoda *et al.*, 2005) o la bencilsuccinato sintasa (genes *bss*) de *Thauera* sp. DNT-1 (Shinoda *et al.*, 2004). Por ello, todo parece indicar que cada organismo ha desarrollado una estrategia reguladora particular para la expresión dependiente de oxígeno de los genes implicados en el catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos. Cabe la posibilidad de que tanto la expresión de los genes anaeróbicos en condiciones aeróbicas, como la de los genes aeróbicos en condiciones anaeróbicas pudiera ser el resultado del escape sufrido por la regulación específica, pero también podría ser explicado como un mecanismo de los organismos anaerobios facultativos para mantener un nivel basal de enzimas con el fin de facilitar una respuesta inmediata en ambientes sujetos a frecuentes fluctuaciones de los niveles de oxígeno (Fuchs, 2008). Un caso extremo que justifica una regulación independiente de oxígeno es el hecho de que exista una única benzoato-CoA ligasa para iniciar tanto el catabolismo aeróbico como el anaeróbico del benzoato, como sucede en *T. aromatica* y *Magnetospirillum* spp. (Kawaguchi *et al.*, 2006; Schuhle *et al.*, 2003).

Tal y como se indicó anteriormente, en *R. palustris* el promotor del gen *badD* está controlado por los reguladores BadR y BadM en respuesta a la presencia del sustrato de la ruta y, además, por la proteína reguladora AadR (Tabla 3) en respuesta a condiciones de anaerobiosis (Fig. 4) (Egland y Harwood, 1999). La proteína AadR, cuyo gen se localiza fuera de los *clusters ali-bad-hba*, pertenece a la superfamilia de reguladores transcripcionales Fnr/Crp, con lo que conserva aquellas regiones características de esta superfamilia, entre las que cabe destacar cuatro residuos de cisteína altamente conservados que coordinan un grupo 4Fe-4S responsable de la inactivación de la proteína en presencia de oxígeno (Khoroshilova *et al.*, 1997; Mazoch y Kucera, 2002). Este hecho, unido a la localización en la región promotora del operón *badDEFG* de una secuencia consenso de unión a Fnr (TTGAT-N₄-ATCAA) centrada en la posición -39.5 respecto del inicio de la transcripción, apoya la hipótesis de que AadR adopta una conformación activa en respuesta a condiciones anaeróbicas, que le permite unirse al promotor *badD* y así activar la transcripción (Egland y Harwood, 1999). No obstante, no puede descartarse la posibilidad de que el efecto positivo de AadR sobre el promotor *badD*

podiera producirse de forma indirecta por medio de la activación de otra proteína reguladora (Egland y Harwood, 1999), como, de hecho, parece ocurrir en el caso del control de la expresión del gen *hbaA* a través del control de la expresión del gen activador *hbaR* dependiente de AadR (Fig. 4). También se ha podido identificar una posible caja de unión a Fnr en la región promotora del gen *aadR*, lo que sugiere que, probablemente, AadR también sea capaz de unirse a este sitio y así autorregular su expresión (Dispensa *et al.*, 1992).

A pesar de la similitud predicha entre las estructuras de Fnr y AadR, todo parece indicar que ambas proteínas no juegan el mismo papel regulador en sus respectivos organismos, *E. coli* y *R. palustris*, respectivamente. La ausencia de Fnr en *E. coli* tiene un efecto pleiotrópico en la expresión de un cierto número de genes, que da lugar, por ejemplo, a la incapacidad de la cepa mutante de crecer utilizando nitrato o fumarato como aceptor final de electrones (Unden *et al.*, 1995). Por el contrario, la ausencia de AadR en *R. palustris*, no da lugar a ningún efecto aparente cuando la cepa mutante crece en fuentes de carbono no aromáticas. Esto parece indicar que AadR es un regulador dependiente de oxígeno especializado en el control de genes responsables del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos, en lugar de un regulador global que controle la expresión de diferentes circuitos génicos, como es el caso de otros miembros del grupo Fnr (Korner *et al.*, 2003). Este tipo de especialización podría ser una norma general en organismos capaces de degradar compuestos aromáticos como *Azoarcus* y *R. palustris*, en cuyos genomas pueden identificarse un significativo número de reguladores de la superfamilia Fnr/Crp, al contrario de lo que sucede en *E. coli*, en cuyo genoma sólo se ha identificado el gen *fnr* (Korner *et al.*, 2003; Rabus, 2005).

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

El control del catabolismo dependiente de la disponibilidad de fuentes de carbono es uno de los mecanismos de regulación fundamentales en bacterias, confiriendo una ventaja adaptativa al establecer prioridades en el metabolismo del carbono. El término represión catabólica pretende englobar toda una serie de procesos reguladores que aseguren la máxima eficiencia cuando la bacteria crezca en un medio con diversas fuentes de carbono, de forma que, en presencia de una fuente de carbono preferente, no se induzcan rutas de degradación de fuentes de

carbono no preferentes, incluso estando sus correspondientes inductores presentes en el medio (Carmona, 2008; Cases y de Lorenzo, 2005; Díaz y Prieto, 2000; Rojo, 2004). Se han descrito numerosos ejemplos de represión catabólica en el catabolismo aeróbico de los compuestos aromáticos, además de lograrse caracterizar algunos de los reguladores implicados en estos procesos en diversas bacterias (Carmona *et al.*, 2008; Collier *et al.*, 1996; Marqués *et al.*, 2006; Moreno y Rojo, 2008; Ohtsubo *et al.*, 2006; Prieto *et al.*, 2004; Rojo, 2004; Shingler, 2003). No obstante, el control mediado por represión catabólica también parece ser una característica típica de los organismos que crecen en condiciones anaeróbicas, habiéndose descrito un par de ejemplos en rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos en *T. aromatica* (Heider *et al.*, 1998) y *Azoarcus* sp. CIB (López Barragán *et al.*, 2004a). En estos organismos, la represión catabólica de la ruta anaeróbica de degradación de benzoato es causada por determinados ácidos orgánicos no aromáticos, tales como succinato, malato y acetato. Como cabría esperar, aquellos compuestos que no pueden ser utilizados como únicas fuentes de carbono en condiciones anaeróbicas, tales como citrato, glicerol, fructosa o maltosa, no causan represión catabólica de la ruta *bzd* para el catabolismo anaeróbico del benzoato (López Barragán *et al.*, 2004a).

Los mecanismos moleculares responsables del control de la represión catabólica de las rutas aeróbicas de degradación de compuestos aromáticos han sido estudiados en algunos organismos. Así, en *E. coli* el principal responsable del control de la represión catabólica es la proteína receptora de AMPc (CRP) (Guidi-Rontani *et al.*, 1980), la cual actúa como un activador transcripcional global en presencia de AMPc (Prieto *et al.*, 2004). Si bien *E. coli*, y muchos otros microorganismos, utilizan de forma preferente la glucosa como fuente de carbono, las bacterias del género *Pseudomonas* degradan preferentemente ácidos orgánicos o aminoácidos antes que azúcares (Collier *et al.*, 1996). Sin embargo, no todos los ácidos orgánicos causan represión catabólica, ni todos ellos muestran el mismo efecto en distintos microorganismos (Rojo, 2004). Además, la represión catabólica no suele producirse únicamente por la presencia de un determinado compuesto en el medio, sino que suele ser el resultado de la integración de diversas señales ambientales.

Curiosamente, la proteína CRP responsable del control de la represión catabólica en *E. coli*, presenta un ortólogo codificado en el cromosoma de diversas

cepas de *Pseudomonas* que, sin embargo, en estas bacterias no parece mediar en el control de la represión catabólica (Morales *et al.*, 2004; Rojo, 2004; Suh *et al.*, 2002). Por el contrario, se han identificado otra serie de proteínas implicadas en la represión catabólica de diversas rutas de degradación de compuestos aromáticos en bacterias no entéricas, como Crc (*Catabolite repression control*) (Morales *et al.*, 2004; Moreno y Rojo, 2008; Rojo, 2004), PtsN y PtsO (sistema de transporte nitrógeno fosfotransferasa) (Marqués *et al.*, 2006; Pflüger y de Lorenzo, 2008), ciertas oxidasas terminales tipo *o* (CyoB) capaces de sensor el estado rédox de la célula (Morales *et al.*, 2006; Petruschka *et al.*, 2001) y el regulador de respuesta BphQ (Ohtsubo *et al.*, 2006).

A veces, la represión catabólica no se produce directamente sobre el promotor catabólico sino que está mediada por una variación en los niveles de los reguladores específicos correspondientes. Por ejemplo, a medida que aumenta la represión catabólica de la ruta de degradación de alcanos (genes *alk*) codificada en el plásmido OCT de *P. putida* Gpo1, decrece la expresión del activador AlkS (Canosa *et al.*, 2000). De forma similar, la represión catabólica de la degradación de fenol (genes *phl*) en *P. putida* H se produce por interferencia con la función activadora del regulador transcripcional PhlR (Muller *et al.*, 1996).

No obstante, si bien se tiene abundante información acerca de la represión catabólica de las rutas aeróbicas de degradación de compuestos aromáticos, aún no se conocen los mecanismos moleculares responsables de la represión catabólica en rutas anaeróbicas, salvo los estudios preliminares llevados a cabo sobre la represión catabólica de la ruta anaeróbica de degradación de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB. En este microorganismo, el efecto represor de ciertas fuentes de carbono, tales como succinato, malato, piruvato, etc., tiene lugar a nivel de la transcripción desde el promotor P_N (Fig. 5) (López Barragán *et al.*, 2004a), si bien todavía no se conoce el regulador(es) implicado en el proceso.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En base a lo expuesto en la Introducción se deduce que la información existente acerca de la regulación de rutas de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos es bastante escasa, en comparación con la información existente sobre regulación del catabolismo aeróbico. Concretamente, en el caso de la regulación del catabolismo anaeróbico del benzoato en la β -proteobacteria *Azoarcus* sp. CIB, al inicio de esta tesis únicamente se había logrado caracterizar parcialmente al regulador específico BzdR.

Por ello, en esta tesis se propusieron una serie de objetivos dirigidos a profundizar tanto en el conocimiento del mecanismo molecular responsable de la regulación del catabolismo anaeróbico de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB, como en la caracterización estructural y funcional de la proteína BzdR. De esta forma, se propusieron esencialmente 5 objetivos que se enumeran a continuación:

- Objetivo 1: Estudio de la regulación dependiente de oxígeno de la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB.
- Objetivo 2: Estudio del promotor P_R del gen *bzdR* y su implicación en la regulación de la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB.
- Objetivo 3: Estudio funcional y estructural de la proteína BzdR.
- Objetivo 4: Utilización de la proteína BzdR como modelo para la síntesis de nuevos reguladores funcionales.
- Objetivo 5: Estudio de la arquitectura del promotor P_N y su interacción con la proteína BzdR.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Cepas bacterianas y plásmidos

A continuación se muestra una tabla con las diferentes cepas de *E. coli* y *Azoarcus* sp. CIB y otra tabla con los plásmidos utilizados en este trabajo, junto a sus características más relevantes.

Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas.

Cepa	Genotipo/Fenotipo	Referencia
<i>E. coli</i> K12		
AFMC	MC4100 resistente a rifampicina	(Ferrández <i>et al.</i> , 2000)
AFMCP _N	Km ^r ; AFMC portadora en el cromosoma de la fusión traduccional P _N ::lacZ	(Barragán <i>et al.</i> , 2005)
AFMCRP _N	Km ^r ; AFMC portadora en el cromosoma de la fusión traduccional P _{R-bzdR} /P _N ::lacZ	(Barragán <i>et al.</i> , 2005)
CC118	Rf ^r , Sp ^r , Δ(<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA1</i>	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
DH10B	F', <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr</i> , <i>hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>dlac</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> λ, <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Life Technologies
DH5α	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> (Nal ^r), <i>relA1</i> , Δ(<i>argF-lac</i>)U169, <i>depR</i> , (φ80 <i>dlac</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15)	(Sambrook y Rusell, 2001)
JRG1728	Cm ^r , Sm ^r , Δ(<i>tyrR</i> , <i>fnr</i> , <i>rac</i> , <i>trg</i>)17, <i>zdd-30</i> ::Tn9, derivado de M182	(Spiro y Guest, 1988)
M15	Cepa de expresión de vectores pQE	Qiagen
M182	Sm ^r ; (Δ <i>lacIOPZYA</i>)X74, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> . Δ(<i>ara-leu</i>)	(Spiro y Guest, 1988)
MC4100	<i>araD139</i> , Δ(<i>argF-lac</i>)U169, <i>rpsL150</i> , <i>relA1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>deoC1</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i>	(Casadaban, 1976)
MV1190	Δ(<i>lac-pro</i>), <i>thi</i> , <i>supE</i> , Δ(<i>srl-recA</i>)306::Tn10, (F' <i>traD36</i> , <i>lacI^q</i> ΔM15, <i>proAB</i>)	Bio-Rad
PK330	Cm ^r ; <i>P_{trp-rpoD}</i> derivado de RZ7350	(Lonetto <i>et al.</i> , 1998)
RZ7350	<i>lacZΔ145</i> , <i>narG234</i> :: <i>Mud11734</i>	(Kiley y Reznikoff, 1991)
S17-1λ <i>pir</i>	Tp ^r , Sm ^r , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>hsdRM</i> ⁺ , RP4::2-Tc::Mu::Km, Tn7, λ <i>pir</i> lisogénico	(de Lorenzo y Timmis, 1994)
XL1-Blue MRA (P2)	Δ(<i>mcrA</i>)183, Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>lac</i> , P2 lisogénico	Stratagene
<i>Azoarcus</i> sp. CIB		
CIB	Cepa silvestre degradadora de compuestos aromáticos	(López Barragán <i>et al.</i> , 2004a)
CIB <i>dacpR</i>	Cepa CIB con interrupción insercional del gen <i>dacpR</i>	Este trabajo
CIB <i>dbzdN</i>	Cepa CIB con interrupción insercional del gen <i>dbzdN</i>	(Barragán <i>et al.</i> , 2005)
CIB <i>dbzdR</i>	Cepa CIB con interrupción insercional del gen <i>dbzdR</i>	(López Barragán <i>et al.</i> , 2004a)
CIB <i>lacZ</i>	Cepa CIB portadora en cromosoma de la fusión traduccional P _N ::lacZ	(López Barragán <i>et al.</i> , 2004a)
Fago λ	EMBL-4	(Frischauf <i>et al.</i> , 1983)

Tabla 5. Plásmidos utilizados.

Plásmido	Genotipo/Fenotipo	Referencia
pBBR1MCS-5	Gm ^r , <i>ori</i> pBBR1MCS Mob ⁺ <i>lacZ</i> _α , vector de clonación y expresión de amplio espectro de huésped	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS-5 <i>acpR</i>	Gm ^r , derivado de pBBR1MCS-5 que contiene un fragmento <i>KpnI/ApaI</i> de 1.2 kb que incluye el gen <i>acpR</i>	Este trabajo
pBBR5P _N	Gm ^r , derivado de pBBR1MCS-5 que contiene un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 4.2 kb que contiene la fusión traduccional P _N :: <i>lacZ</i> procedente de pSJ3P _N	(Barragán <i>et al.</i> , 2005)
pBBR5P _N I	Gm ^r , derivado de pBBR1MCS-5 que contiene un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 4.2 kb que contiene la fusión traduccional P _N I:: <i>lacZ</i> procedente de pSJ3P _N	Este trabajo
pBBR5P _N I+II	Gm ^r , derivado de pBBR1MCS-5 que contiene un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 4.2 kb que contiene la fusión traduccional P _N I+II:: <i>lacZ</i> procedente de pSJ3P _N	Este trabajo
pBBR5P _R	Gm ^r , derivado de pBBR1MCS-5 que contiene un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 4.2 kb que contiene la fusión traduccional P _R :: <i>lacZ</i> procedente de pSJ3P _R	Este trabajo
p <i>cl</i>	Ap ^r , derivado de p <i>cl</i> -cat que expresa el dominio N-terminal del represor CI del fago λ	Este trabajo
p <i>cl</i> -cat	Ap ^r , derivado de pC132 que expresa la proteína de fusión NTD-CAT (dominio N-terminal del represor CI del fago λ y gen de la cloranfenicol aminotransferasa)	(Di Lallo <i>et al.</i> , 1999)
p <i>cl</i> -LBzdR	Ap ^r , derivado de pCI que expresa la proteína de fusión NTD-LBzdR	Este trabajo
p <i>cl</i> -Qλ	Ap ^r , derivado de pCI que expresa la proteína de fusión Qλ (NTD <i>cl</i> -LBzdR-CBzdR)	Este trabajo
p <i>cl</i> -Qλ2	Ap ^r , derivado de pCI que expresa la proteína de fusión Qλ2 (NTD <i>cl</i> -CBzdR)	Este trabajo
pCK01	Cm ^r , <i>ori</i> pSC101, vector de clonación de bajo número de copias con <i>polylinker</i> flanqueado por dianas <i>NotI</i>	(Fernández <i>et al.</i> , 1995)
pCK01-BzdA	Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/ScaI</i> de 2.2 kb que incluye el gen <i>bzdA</i> bajo el control del promotor <i>Plac</i>	(Barragán <i>et al.</i> , 2005)
pCK01-BzdR	Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> procedente de pQE32-BzdR que incluye el gen <i>bzdR</i> bajo el control del promotor T5	Este trabajo
pCK01-BzdR3	Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> procedente de pQE32-BzdR3 que incluye el gen <i>bzdR3</i> bajo el control del promotor T5	Este trabajo
pCK01-BzdR4	Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> procedente de pQE32-BzdR4 que incluye el gen <i>bzdR4</i> bajo el control del promotor T5	Este trabajo
pCK01-BzdR5	Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> procedente de pQE32-BzdR5 que incluye el gen <i>bzdR5</i> bajo el control del promotor T5	Este trabajo
pCK01-NBzdR	Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> procedente de pQE32-NBzdR que incluye el gen <i>bzdR</i> bajo el control del promotor T5	Este trabajo
pCK01-NBzdRL	Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> procedente de pQE32-NBzdRL que incluye el gen <i>bzdR</i> bajo el control del promotor T5	Este trabajo
pCK01-Q1	Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/PstI</i> procedente de pQE32-Q1 que incluye la fusión <i>nbzdRL-aroK</i> bajo el control del promotor T5	Este trabajo

Plásmido	Genotipo/Fenotipo	Referencia
pCK01-Q2	Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/PstI</i> procedente de pQE32-Q2 que incluye la fusión <i>nbzdRL-aroK_{D36A}</i> bajo el control del promotor T5	Este trabajo
pCK01-Q4	Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/PstI</i> procedente de pQE32-Q4 que incluye la fusión <i>nbzdR-aroK</i> bajo el control del promotor T5	Este trabajo
pCK01-Q5	Cm ^r , derivado de pCK01 que contiene un fragmento <i>EcoRI/PstI</i> procedente de pQE32-Q5 que incluye la fusión <i>nbzdR-aroK_{D36A}</i> bajo el control del promotor T5	Este trabajo
pECOR7	Ap ^r , pUC19 que contiene un fragmento <i>EcoRI</i> de 7.1 kb procedente del fago λ Bzd1	(López Barragán <i>et al.</i> , 2004a)
pET29a(+)	Km ^r , <i>oriColE1</i> , vector de clonación e hiperexpresión	Novagen
pET29-BzdR	Km ^r , derivado de pET29a(+) que expresa la proteína BzdR	Este trabajo
pGEMt Easy	Ap ^r , <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i> ; vector para la clonación de fragmentos de PCR	Promega
pGEMt Easy <i>acpR</i>	Ap ^r , derivado de pGEM-T Easy que contiene un fragmento de PCR de 1.2 kb que incluye el gen <i>acpR</i>	Este trabajo
pGEMt-NBzdRL	Ap ^r , derivado de pGEM-T Easy que contiene el gen <i>nbzdRL</i>	Este trabajo
pGEMt-NBzdR	Ap ^r , derivado de pGEM-T Easy que contiene el gen <i>nbzdR</i>	Este trabajo
pGEMt-Q1	Ap ^r , derivado de pGEM-T Easy que contiene el gen de la quimera Q1	Este trabajo
pGEMt-Q4	Ap ^r , derivado de pGEM-T Easy que contiene el gen de la quimera Q4	Este trabajo
pGEX-2T	Ap ^r , plásmido para la construcción de proteínas fusionadas a GST	(Smith y Johnson, 1988)
pGEX-2T σ^{70}	Ap ^r , derivado de pGEX-2T que contiene el gen <i>rpoD</i>	(Lonetto <i>et al.</i> , 1998)
pGEX-2T σ^{70} (EA591)	Ap ^r , derivado de pGEX-2T que contiene el gen <i>rpoD</i> -EA591	(Lonetto <i>et al.</i> , 1998)
pGEX-2T σ^{70} (KA593)	Ap ^r , derivado de pGEX-2T que contiene el gen <i>rpoD</i> -KA593	(Lonetto <i>et al.</i> , 1998)
pGEX-2T σ^{70} (KA597)	Ap ^r , derivado de pGEX-2T que contiene el gen <i>rpoD</i> -KA597	(Lonetto <i>et al.</i> , 1998)
pHW1	Km ^r , gen <i>fir</i> clonado en el plásmido pLG339	(Bell <i>et al.</i> , 1990)
pIZ1016	Gm ^r , derivado del vector de clonación y expresión de amplio espectro de huésped pBBR1MCS-5 con el promotor <i>tac</i> y el gen <i>lacI^f</i> de pMM40	(Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003)
pIZ-FNR*	Gm ^r , derivado de pIZ1016 que contiene el gen <i>fir</i> * bajo el control del promotor <i>P_{tac}</i>	Este trabajo
pJCD01	Ap ^r <i>oriColE1</i> ; <i>polylinker</i> de pUC19 flanqueado por los terminadores <i>rpoC</i> y <i>rrnBT1T2</i>	(Marschall <i>et al.</i> , 1998)
pJCDP _N	Ap ^r , derivado de pJCD01 que contiene un fragmento <i>EcoRI</i> de 585 pb que incluye el promotor <i>P_N</i>	Este trabajo
pJCDP _R	Ap ^r , derivado de pJCD01 que contiene un fragmento <i>SmaI/EcoRI</i> de 298 pb que incluye el promotor <i>P_R</i>	Este trabajo
pK18 <i>mob</i>	Km ^r , <i>oriColE1</i> , <i>Mob⁺</i> , <i>lacZα</i> , vector suicida utilizado para las interrupciones insercionales mediante recombinación homóloga	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK18 <i>mobacpR</i>	Km ^r , derivado de pK18 <i>mob</i> que incluye un fragmento <i>BamHI/HindIII</i> de 410 pb del gen <i>acpR</i>	Este trabajo
pQE32	Ap ^r , <i>oriColE1</i> , promotor T5, operador <i>lac</i> , terminadores λ <i>t_e/E. coli</i> <i>rrnB T1</i> , N-terminal His ₆	Qiagen
pQE32-BzdR	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>bzdR</i>	(Barragán <i>et al.</i> , 2005)

Plásmido	Genotipo/Fenotipo	Referencia
pQE32-BzdR3	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>bzdR3</i>	Este trabajo
pQE32-BzdR4	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>bzdR4</i>	Este trabajo
pQE32-BzdR5	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>bzdR5</i>	Este trabajo
pQE32-CBzdR	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>cbzdR</i>	Este trabajo
pQE32-NBzdR	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>nbzdR</i>	Este trabajo
pQE32-NBzdRL	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>nbzdRL</i>	Este trabajo
pQE32-Q1	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>Q1</i> (fusión <i>nbzdRL-aroK</i>)	Este trabajo
pQE32-Q2	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>Q2</i> (fusión <i>nbzdRL-aroK_{D36A}</i>)	Este trabajo
pQE32-Q4	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>Q4</i> (fusión <i>nbzdR-aroK</i>)	Este trabajo
pQE32-Q5	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>Q5</i> (fusión <i>nbzdR-aroK_{D36A}</i>)	Este trabajo
pQE32-SKI	Ap ^r , derivado de pQE32 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>aroK</i>	Este trabajo
pQE60-Fnr*	Ap ^r , derivado de pQE60 que incluye la fusión génica His ₆ - <i>fnr*</i>	Este trabajo
pREP4	Km ^r , <i>ori</i> p15A; plásmido que expresa el represor <i>lacI</i>	Qiagen
pSJ3	Ap ^r , <i>ori</i> ColE1, ' <i>lacZ</i> ', vector para búsqueda de promotores con el gen reportero <i>lacZ</i> flanqueado con dianas de restricción <i>NotI</i>	(Ferrández <i>et al.</i> , 1998)
pSJ3P _N	Ap ^r , derivado de pSJ3 que contiene la fusión traduccional P _N :: <i>lacZ</i>	(López Barragán <i>et al.</i> , 2004a)
pSJ3P _N I	Ap ^r , derivado de pSJ3 que contiene la fusión traduccional P _N I:: <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSJ3P _N I+II	Ap ^r , derivado de pSJ3 que contiene la fusión traduccional P _N I+II:: <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSJ3P _R	Ap ^r , derivado de pSJ3 que contiene la fusión traduccional P _R :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSJ3RP _N	Ap ^r , derivado de pSJ3 que contiene la fusión traduccional <i>bzdR</i> /P _N :: <i>lacZ</i>	(Barragán <i>et al.</i> , 2005)
pSJ6	Km ^r , vector de clonación y expresión de amplio espectro de huésped que incluye la fusión Pr:: <i>mp'</i> ::' <i>lacZ</i> ' en una casete <i>NotI</i> de 4.0 kb	(Jaenecke <i>et al.</i> , 1996)

2 Medios y condiciones de cultivo

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

2.1 Medios de cultivo empleados para *E. coli*

El medio rico empleado fue Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Rusell, 2001). Los cultivos de *E. coli* en medio sólido se realizaron con medio LB suplementado con agar al 1.5% (p/v). Cuando fue necesario, se añadió 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) a una concentración de 0.08 mM, así como isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.2 mM.

El medio mínimo empleado para *E. coli* fue M63 (Miller, 1972), al que se añadió agar al 1.5% (p/v) para los crecimientos en medio sólido. El medio mínimo se suplementó con glicerol (20 mM) como fuente de carbono, así como con las vitaminas y aminoácidos necesarios para cada cepa a las concentraciones recomendadas por Gerhardt *et al.* (1994). Cuando fue necesaria la anaerobiosis, se añadió KNO₃ 10 mM como aceptor final de electrones. Cuando fueron requeridos, los antibióticos se utilizaron a las concentraciones que se indican en el apartado 2.3.

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

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

➤ KH ₂ PO ₄	0.33 g
➤ Na ₂ HPO ₄	1.2 g
➤ NH ₄ Cl	0.11 g
➤ MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
➤ CaCl ₂	0.04 g
➤ H ₂ O destilada	hasta 1 l

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

➤ Ácido nitrilotriacético (NTA)	1.5 g	➤ ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.18 g
➤ MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0 g	➤ CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01 g
➤ MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.5 g	➤ KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0.02 g
➤ NaCl	1.0 g	➤ H ₃ BO ₃	0.01 g

➤ FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g	➤ Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.01 g
➤ CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.18 g	➤ NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.025 g
➤ NaSeO ₃ ·5H ₂ O	0.3 g	➤ H ₂ O destilada	hasta 1 l

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

➤ Biotina	20 mg	➤ Ácido fólico	20 mg
➤ Piridoxina-HCl	10 mg	➤ Tiamina-HCl·2H ₂ O	50 mg
➤ Riboflavina	50 mg	➤ Ácido nicotínico	50 mg
➤ D-pantotenato cálcico	50 mg	➤ Vitamina B12	50 mg
➤ Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	50 mg	➤ H ₂ O destilada	hasta 1 l

Para el crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB se añadió, como aceptor final de electrones, KNO₃ 10 mM al medio MC (medio basal suplementado con vitaminas y elementos traza). Además, para asegurar el ambiente reductor, también se añadió al medio MC una solución de sulfuro ferroso a una concentración final de 0.044 mg/ml.

2.3 Antibióticos

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

➤ Ampicilina (Ap)	100 µg/ml
➤ Cloranfenicol (Cm)	34 µg/ml
➤ Kanamicina (Km)	50 µg/ml
➤ Rifampicina (Rf)	50 µg/ml
➤ Gentamicina (Gm)	7.5 µg/ml

2.4 Obtención de condiciones anaeróbicas en los medios de cultivo

Para obtener condiciones de anaerobiosis, tanto el medio de cultivo como las soluciones de elementos traza, el nitrato potásico, el sulfuro ferroso, las fuentes de carbono y el resto de compuestos utilizados, se dispensaron en frascos de vidrio, los

cuales se sellaron con tapones de goma y arandelas de aluminio. A través del tapón de goma se introdujo una aguja conectada a un depósito de nitrógeno (Alpha Gas), permitiendo pasar un flujo de este gas al medio líquido durante varios minutos con el objeto de eliminar el oxígeno. Finalmente, todos los frascos fueron autoclavados.

Para obtener una solución anaeróbica y estéril de vitaminas (las cuales son sensibles al calor) se realizó la misma operación descrita anteriormente pero con frascos de vidrio vacíos en los que, después de ser esterilizados por autoclave, se inyectó la solución de vitaminas mediante una jeringa conectada a un filtro estéril Millipore (de 0.2 micras de diámetro). Una vez preparadas estas soluciones, fueron añadidas al medio basal MA para obtener así el medio MC suplementado con las correspondientes fuentes de carbono. Tanto la filtración de las soluciones de vitaminas como la inoculación de los medios de cultivo con las distintas cepas bacterianas, se realizaron en una cámara de anaerobiosis (Forma Scientific).

2.5 Condiciones de cultivo

Para los crecimientos aeróbicos, las cepas de *E. coli* fueron cultivadas a 37°C y en agitación a 250 rpm, mientras que *Azoarcus* sp. CIB fue incubado a 30°C y en agitación brusca. En el caso de los crecimientos anaeróbicos, ambas estirpes bacterianas fueron incubadas a 30°C sin agitación. Cuando se utilizaron compuestos aromáticos como fuente de carbono, éstos fueron añadidos al medio MC a una concentración de 3 mM. El crecimiento de los cultivos fue monitorizado midiendo la densidad óptica a 600 nm (A_{600}) empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-260. La morfología celular se analizó con un microscopio de contraste de fase Nikon OPTIPHOT-2. La desnitrificación en cultivos anaeróbicos fue monitorizada midiendo los niveles de NO_3^- y NO_2^- con el Test Nitrates (Merck). El consumo de benzoato en el medio de cultivo fue monitorizado espectrofotométricamente a 273 nm tras la acidificación del medio con HCl.

2.6 Conservación de las cepas bacterianas

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

3 Técnicas de manipulación de DNA y RNA

La manipulación del DNA así como la mayor parte de las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo fueron aplicadas esencialmente tal y como describen Sambrook y Rusell (2001). Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por Amersham Biosciences, New England Biolabs y Takara. La DNA ligasa T4 y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* se adquirieron de Amersham Biosciences, y la DNA polimerasa T4 de Applied Biosystems. La RNA polimerasa utilizada en los ensayos de transcripción *in vitro* fue suministrada por USB (*E. coli* RNA Polymerase Holoenzyme 1 U/ μ l). Todas las enzimas se utilizaron siguiendo las indicaciones de las respectivas casas comerciales.

3.1 Purificación de DNA

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

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

Para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de DNA se empleó un termociclador *Gene ATAQ Controller* (Farmacia-LKB) y las enzimas AmpliTaq® DNA polimerasa (Applied Biosystem) o la DNA polimerasa PFU (Biotools) de acuerdo con las instrucciones de los proveedores. Los productos amplificados se purificaron utilizando el *Gene-Clean Turbo kit* (Q-BIOgene) o el *High Pure™ PCR Product Purification Kit* (Roche). Los distintos oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se indican en la Tabla 6. Los oligonucleótidos fueron sintetizados empleando un equipo Oligo-1000M (Beckman Instruments, Inc.) en el servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas, o bien fueron proporcionados por Sigma-Genosys. En la Tabla 6 se detalla la secuencia y ubicación de cada uno de ellos, así como la presencia de las dianas de restricción correspondientes en cada caso.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados. Las regiones subrayadas pertenecen a la diana de restricción que se indica al final de la secuencia.

Nombre	Secuencia (5'-3')/Diana de restricción	Localización relativa y utilización
3AcpRcib	CAAGCTTCCGCCTCGACGAACTCGTC/ <i>HindIII</i>	Región interna del gen <i>acpR</i>
3' Arg114Glu	CTGGAGCAGCCGTTCCGCCCATTCATG	Región intergénica de <i>bzdR</i> para la obtención del mutante <i>bzdR4</i>
3' aroKquim *	GGGGTACCATGGCAGAGAAACGCAATATCTTT/ <i>KpnI</i>	Extremo 5' del gen <i>aroK</i> (plásmido pQE32-Q1)
3' C1-CI	GAAGGCCTCCAGCGCATCGCCTTCATCGG/ <i>StuI</i>	Extremo 5' del dominio CBzdR (plásmido pCI-Qλ)
3' D36A	AATCTCTTGAGCGGAATCGTAAAATTC	Región intergénica de la quimera Q1 para la obtención del mutante Q2
3' Glu111Arg	CCGGCGCGCCCATCTATGCGTCTTG	Región intergénica de <i>bzdR</i> para la obtención del mutante <i>bzdR3</i>
3' Glu111Arg/ Arg114Glu	CTGGAGCAGCCGTTCCGCCCATCTATGCGTCTT	Región intergénica de <i>bzdR</i> para la obtención del mutante <i>bzdR5</i>
3HISReg	GGGAAGCTTTCAGCGTGCCAGGACTTCGAGG/ <i>HindIII</i>	Extremo 3' de <i>bzdR</i> (plásmido pQE32-BzdR)
3IVTPN	CGGAATTCATCGAACTATCTCCTCTGATG/ <i>EcoRI</i>	Fragmento que incluye el promotor P_N (sonda FP)
3'-newlynk	GAAGGCCTGCGCGAGGAGGCGGAGCAGTC/ <i>StuI</i>	Extremo 5' de la región LBzdR (plásmido pCI-LBzdR)
3'-NiuBzdR	GGAATTCATATGTCCAACGATGAGAACTCATCA/ <i>NdeI</i>	Extremo 5' del gen <i>bzdR</i> (plásmido pET29-BzdR)
3'PR-ScaI	AAAAGTACTCGCGGTTTCATGACGTTTCATCTG/ <i>ScaI</i>	Extremo 5' del fragmento que incluye el promotor P_R (plásmido pJCD- P_R)
3REG	GGGGTACCCGTCATCAATGATCCGGCAAG/ <i>KpnI</i>	Región intergénica <i>bzdR/bzdN</i> (490 pb) (RT-PCR). Fragmento de 598 pb <i>bzdR/bzdN</i> (P_N) clonado en pSJ3 P_N
3RTpN2	GTGTAGGTACACATCGTTGC	Extremo 3' del promotor P_N
3RTpR2	GAGGATGTCCAGGAAGGATTG	Extremo 3' del promotor P_R
5AcpRcib	GGGATCCGTTGAGCAGGAAGGCCG/ <i>BamHI</i>	Región interna del gen <i>acpR</i>
5' Arg114Glu	CATGAATGGGCGGAACGGCTGCTCCAG	Región intergénica de <i>bzdR</i> para la obtención del mutante <i>bzdR4</i>
5' aroKquim	AACTGCAGTTAGTTGCTTTCCAGCATGTGAATA/ <i>PstI</i>	Extremo 3' del gen <i>aroK</i> (plásmido pQE32-Q1)
5BZN	GCTCTAGACCCATCGAACTATCTCCTCTGATG/ <i>XbaI</i>	Extremo 3' del fragmento de 598 pb <i>bzdR/bzdN</i> (P_N) clonado en pSJ3 P_N
5' C2	CGGGATCCTCAGCGTGCCAGGACTTCGAGG/ <i>BamHI</i>	Extremo 3' del dominio CBzdR (plásmido pCI-Qλ)
5' D36A	GAATTTTACGATTCCGCTCAAGAGATT	Región intergénica de la quimera Q1 para la obtención del mutante Q2

Nombre	Secuencia (5'-3')/Diana de restricción	Localización relativa y utilización
5'Glu111Arg	CAAGACGCATAGATGGGCGCGCCGG	Región intergénica de <i>bzdR</i> para la obtención del mutante <i>bzdR3</i>
5'Glu111Arg/ Arg114Glu	AAGACGCATAGATGGGCGGAACGGCTGCTCCAG	Región intergénica de <i>bzdR</i> para la obtención del mutante <i>bzdR5</i>
5' HIS-aroK	CGGGATCCTTGCAGAGAAACGCAATATCTTTC/ <i>Bam</i> HI	Extremo 5' del gen <i>aroK</i> (plásmido pQE32-SKI)
5HISReg	CGGGATCCTTTCCAACGATGAGAACTCATCAC/ <i>Bam</i> HI	Extremo 5' de <i>bzdR</i> (plásmido pQE32-BzdR)
5IVTPN	CGGAATTCCGTGCATCAATGATCCGGCAAG/ <i>Eco</i> RI	Fragmento que incluye el promotor P_N (sonda FP)
5'-lynk	CGGGATCCTCACTGCCTGCGCGCTTC/ <i>Bam</i> HI	Extremo 3' de la región LBzdR (plásmido pCI-LBzdR)
5'N2quim	GGGGTACCCCTGCGCGCTTCG/ <i>Kpn</i> I	Extremo 3' del dominio NBzdRL (plásmido pQE32-Q1)
5'-NiuBzdR	CGGAATTCTCAGCGTGCCAGGACTTCGA/ <i>Eco</i> RI	Extremo 3' del gen <i>bzdR</i> (plásmido pET29-BzdR)
5'PR- <i>Eco</i> RI	CGGAATTCCGCCAACATCAGCAGGTAGTTG/ <i>Eco</i> RI	Extremo 3' del fragmento que incluye el promotor P_R (plásmido pJCD- P_R)
5RTpN1	GCAACACATCAGAGGAGATAG	Extremo 5' del promotor P_N
5RTpR1	GCTGTCATCGTGCTTCACG	Extremo 5' del promotor P_R
BKIN	GGGGTACCCGTGCCTGACATTTGACTTAGATC/ <i>Kpn</i> I	Extremo 5' del fragmento que incluye la región I del promotor P_N
BLINE	CGTGCCTGACATTTGACTTAGATC	Extremo 5' del fragmento que incluye la región I del promotor P_N
C1BzdR	CGGGATCCTTACAGCGCATCGCCTTCATCGGC/ <i>Bam</i> HI	Extremo 5' del dominio CBzdR (plásmido pQE32-CBzdR)
Lac57	CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	Inicio del gen <i>lacZ</i>
N0BzdR	GGGAAGCTTTCAGAGCCCCTGCGGATCTG/ <i>Hind</i> III	Extremo 3' del dominio N0BzdR (plásmido pQE32-N0BzdR)
N1BzdR	GGGAAGCTTTCACCTCCGCCTCCTCGGCACG/ <i>Hind</i> III	Extremo 3' del dominio NBzdR (plásmido pQE32-NBzdR)
N2BzdR	GGGAAGCTTTCACCTGCGCGCTTCGCCCC/ <i>Hind</i> III	Extremo 3' del dominio NBzdRL (plásmido pQE32-NBzdRL)
N3'	TTCAGCATCTCGTTGTGCTC	Región interna del gen <i>bzdN</i> utilizado para sintetizar la sonda de DNA utilizada en AFM
new-N1kim	GGGGTACCCCTCCGCCTCCTCGGCACG/ <i>Kpn</i> I	Extremo 3' del dominio NBzdR (plásmido pQE32-Q4)
NIK	CGGAATTCGATCTAAGTCAAATGTCAGGCACG/ <i>Eco</i> RI	Extremo 3' del fragmento que incluye la región II del promotor P_N

Nombre	Secuencia (5'-3')/Diana de restricción	Localización relativa y utilización
NIU PN-II	GGGGTACCCAAGAAAGATTGCAGTTTTCCATG/ <i>KpnI</i>	Extremo 5' del fragmento que incluye la región II del promotor P_N
NIU PN-III	CGGAATTCCAATCTTTCTTGCCGCAACGC/ <i>EcoRI</i>	Extremo 3' del fragmento que incluye la región III del promotor P_N
PN-II	CAAGAAAGATTGCAGTTTTCCATG	Extremo 5' del fragmento que incluye la región II del promotor P_N
REG	GTGCCAGGACTTCGAGGATGTC	Región interna de <i>bzdR</i> (313 pb) RT-PCR
RET1	CCGAGCCTCGCGTTTTACTGC	Extremo 5' del fragmento que incluye la región III del promotor P_N
RetI	CCGAGCCTCGCGTTTTACTGC	Extremo 3' del gen <i>bzdR</i>

3.3 Secuenciación de DNA

La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo *ABI Prism 377™ automated DNA sequencer* (Applied Biosystems Inc), en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA dirigido por la empresa Sequgen en el Centro de Investigaciones Biológicas. Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems), y la DNA polimerasa *AmpliTaq FS*, siguiendo las recomendaciones de los proveedores. Las reacciones se llevaron a cabo con un termociclador *Gene Amp PCR System 2400* (Perkin-Elmer) en el servicio de Secuenciación Automática de DNA del Centro de Investigaciones Biológicas.

En el caso concreto de los experimentos de extensión por cebador (*primer extension*), la secuenciación del DNA patrón se llevó a cabo según el método de terminación de la polimerización por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) utilizando el *T7 Sequencing™ Kit* (Amersham Pharmacia Biotech), y [α - 32 P]dCTP (14.8×10^{12} Bq/mmol, 3.7×10^5 Bq/ μ l) (Amersham Biosciences) como deoxinucleósido trifosfato marcado radiactivamente, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

3.4 Determinación del sitio de inicio de la transcripción

3.4.1 Extracción de RNA

Se procedió al análisis del sitio de inicio de la transcripción (+1) del promotor P_R mediante la técnica de extensión por cebador o *primer-extension*. La extensión se realiza mediante un cebador que hibrida con el RNAm en una posición cercana al

supuesto sitio de iniciación de la transcripción. Para ello, se utilizó una cepa de *Azoarcus* sp. CIB que incorporaba el plásmido pBBR5P_R (*P_R::lacZ*) (Tabla 5), que fue crecida anaeróbicamente en medio MC y con benzoato 3 mM como fuente de carbono, hasta que la *A*₆₀₀ alcanzó un valor de 0.3. Las células fueron lavadas, resuspendidas en tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) con lisozima (50 mg/ml; Sigma) y posteriormente lisadas mediante varios ciclos de congelación-descongelación. A continuación se aisló el RNA total del cultivo mediante el *RNeasy Mini kit* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del proveedor.

3.4.2 Extensión por cebador (*primer-extension*)

Las reacciones de extensión fueron llevadas a cabo con la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (Promega) y 10 µg de RNA total, tal y como se ha descrito previamente (Martín *et al.*, 1995), usando el oligonucleótido Lac57 (Tabla 6) marcado previamente en su extremo 5' con la polinucleótido quinasa del fago T4 en presencia de [γ -³²P]ATP (3000 Ci, 111 TBq mmol⁻¹; Amersham Biosciences). Con el fin de determinar el tamaño de los productos obtenidos en la reacción de extensión, se llevaron a cabo en paralelo reacciones de secuenciación del plásmido pBBR5P_R con el oligonucleótido Lac57 utilizando el *T7 sequencing kit* en presencia de [γ -³²P]dCTP (Amersham Biosciences), siguiendo las indicaciones del proveedor. Los productos obtenidos en las reacciones fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida 6%-urea 8M. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en películas Hyperfilm™ MP (Amersham Pharmacia Biotech) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

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

Azoarcus sp. CIB fue cultivado anaeróbicamente en medio MC con benzoato, succinato o benzoato más succinato hasta alcanzar una *A*₆₀₀ de 0.2 (fase exponencial). Las células fueron obtenidas por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos y resuspendidas en tampón de lisis TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM). La lisis celular se produjo por ciclos de congelación-descongelación y el RNA total de *Azoarcus* sp. CIB fue posteriormente extraído con el *High Pure RNA isolation kit* (Roche). La contaminación de DNA en las preparaciones de RNA se eliminó mediante un tratamiento con el *DNase treatment and removal kit* (Ambion). La concentración y

pureza de las muestras de RNA fue medida con un espectrofotómetro ND1000 (Nanodrop Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. El análisis de los niveles de transcripción de los promotores P_N o P_R fue llevado a cabo en 20 μ l de reacción que contenía 2 μ g de RNA, 0.5 mM de cada uno de los desoxinucleótidos (dNTPs), 200 U de la transcriptasa reversa *SuperScript II* (Invitrogen) y 0.5 μ M del oligonucleótido 3RTpN2 ó 3RTpR2 (Tabla 6), respectivamente, en el tampón recomendado por el proveedor. Las reacciones fueron incubadas a 42°C durante 2 horas, seguido de una incubación a 70°C durante 15 minutos, para eliminar finalmente el RNA molde mediante una incubación a 37°C en presencia de 20 U de RNasa H (Amersham Biosciences) durante 20 minutos. El DNAc obtenido fue almacenado a -20°C.

A continuación, se llevó a cabo la PCR en tiempo real en un termociclador IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Las mezclas de reacción contenían 10 μ l de DNAc diluido, oligonucleótido 3RTpR2 0.2 μ M, oligonucleótido 5RTpR1 0.2 μ M (Tabla 6), para el promotor P_R , u oligonucleótido 3RTpN2 0.2 μ M, oligonucleótido 5RTpN1 0.2 μ M (Tabla 6), para el promotor P_N , y 12.5 μ l de la mezcla SYBR Green (Applied Biosystems). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo de la siguiente forma: 1 ciclo inicial de desnaturalización (95°C, 3 minutos), seguido de 44 ciclos de amplificación (95°C, 30 segundos; hibridación, 57°C, 30 segundos; elongación y medida de la señal, 72°C, 30 segundos). Para la cuantificación relativa de los valores de fluorescencia obtenidos, se realizó una curva de calibrado con diluciones seriadas de DNA genómico.

3.6 Mutagénesis dirigida del gen *bzdR*

La construcción de los genes *bzdR* mutantes (*bzdR3*, *bzdR4* y *bzdR5*) se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida en dos etapas sucesivas de PCR. En una primera etapa, se amplificó el gen dividido en dos fragmentos utilizando como molde el plásmido pCOR7 (Tabla 5). El primero de ellos comprende desde la secuencia que hibrida con el oligonucleótido 5HISReg (Tabla 6) hasta la secuencia que contiene el codón donde se inserta la mutación, y es reconocida por los oligonucleótidos 3'Glu111Arg (*bzdR3*), 3'Arg114Glu (*bzdR4*) y 3'Glu111Arg/Arg114Glu (*bzdR5*) (Tabla 6). El segundo fragmento comprende el resto del gen, desde la mutación, donde hibridan los oligonucleótidos 5'Glu111Arg (*bzdR3*), 5'Arg114Glu (*bzdR4*) y 5'Glu111Arg/Arg114Glu (*bzdR5*) (Tabla 6), hasta el codón *stop*, que hibrida con el

oligonucleótido 3HISReg (Tabla 6). En la segunda etapa de PCR se emplearon como molde los dos fragmentos obtenidos anteriormente, que solapan en la región de la mutación, para ser amplificados con los oligonucleótidos 5HISReg y 3HISReg, que hibridan al inicio y al final del gen *bzdR*, regenerando así un gen completo que incluye la mutación deseada. Los productos de PCR así obtenidos fueron purificados y se clonaron en el vector pQE32 (Tabla 5) empleando las dianas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, para su posterior sobreproducción y purificación. Los plásmidos obtenidos se denominaron pQE32-BzdR3, pQE32-BzdR4 y pQE32-BzdR5 (Tabla 5). La incorporación de la mutación en cada uno de los genes resultantes fue comprobada mediante secuenciación.

3.7 Construcción de las quimeras Q1 y Q4

La construcción de la proteína de fusión NBzdRL-SKI (Q1) se llevó a cabo mediante amplificación por PCR de ambas secuencias, NBzdRL y SKI, con los oligonucleótidos 5HisReg / 5'N2quim y 3'aroKquim* / 5'aroKquim (Tabla 6), respectivamente, y usando como molde el plásmido pCOR7 (Tabla 5) y DNA genómico de *E. coli* CC118 (Tabla 4), respectivamente. A continuación, el gen *nbzdRL* fue clonado en el plásmido pGEMt por los extremos de timina. Por otro lado, el gen *aroK* fue digerido con las enzimas de restricción *Kpn*I y *Pst*I, y subclonado en el plásmido pGEMt que incluye el gen *nbzdRL*, de modo que las proteínas resultantes quedarán fusionadas con el dominio NBzdRL en el extremo N-terminal y la SKI en el extremo C-terminal, dejando en medio 6 nucleótidos correspondientes a la diana de la enzima de restricción *Kpn*I (Fig. 8). Posteriormente, esta construcción fue digerida con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I y subclonada en el plásmido pQE32 dando lugar a la quimera denominada Q1.

La construcción de la proteína de fusión NBzdR-SKI (Q4) se llevó a cabo de igual modo, amplificando la secuencia de NBzdR con los oligonucleótidos 5HisReg / new-N1 kim usando como molde el plásmido pCOR7 (Tabla 5).

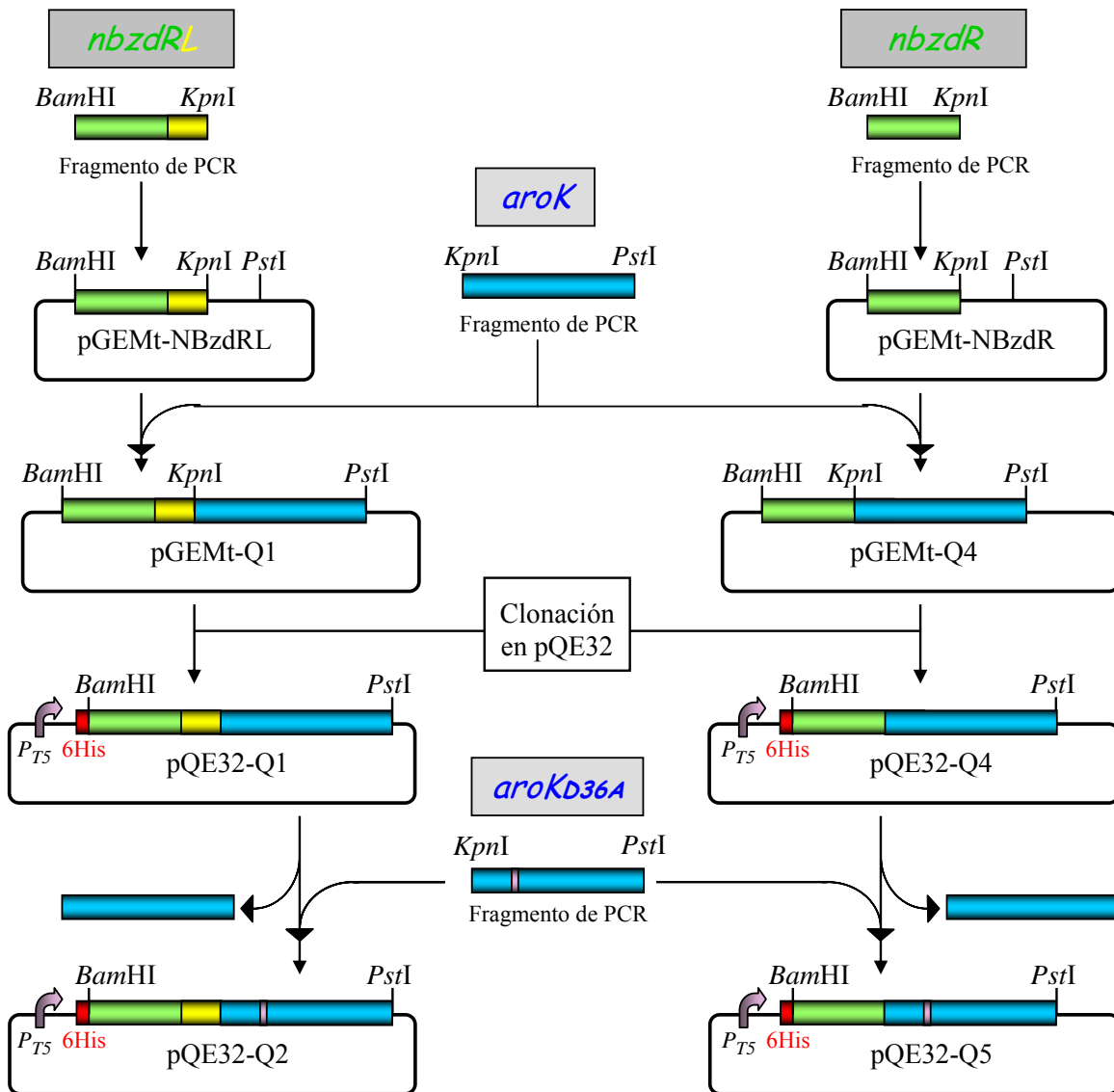


Figura 8: Esquema de la construcción de las quimeras Q1, Q2, Q4 y Q5. El gen *nbzdRL* se representa mediante un rectángulo verde con el extremo amarillo (*linker*), el gen *nbzdR* mediante un rectángulo únicamente verde, el gen *aroK* mediante un rectángulo azul y el gen *aroK_{D36A}* mutante mediante un rectángulo azul con una línea rosa.

3.8 Construcción de las quimeras Q2 y Q5 mediante mutagénesis dirigida del gen *aroK*

La construcción de la quimera Q1 mutante (fusión NBzdRL-SKI_{D36A}), denominada Q2, se llevó a cabo, como en el caso explicado en el apartado 3.6, mediante mutagénesis dirigida en dos etapas sucesivas de PCR. En una primera etapa, se amplificó el gen dividido en dos fragmentos utilizando como molde el plásmido pQE32-Q1 (Tabla 5). El primero de ellos comprende desde la secuencia que hibrida con el oligonucleótido 5HISReg (Tabla 6) hasta la secuencia que contiene el codón donde se inserta la mutación, y es reconocida por el oligonucleótido 3'D36A (Tabla 6). El segundo

fragmento comprende el resto del gen, desde la mutación, donde hibrida el oligonucleótido 5'D36A (Tabla 6), hasta el codón *stop*, que hibrida con el oligonucleótido 5'aroKquim (Tabla 6). En la segunda etapa de PCR se emplearon como molde los dos fragmentos obtenidos anteriormente, que solapan en la región de la mutación, para ser amplificados con los oligonucleótidos 3'aroKquim* / 5'aroKquim, que hibridan al inicio y al final del gen *aroK*, regenerando así un gen completo que incluye la mutación deseada. El producto de PCR así obtenido fue purificado y se clonó en el vector pQE32-Q1 (Tabla 5), habiendo eliminado previamente el gen *aroK* por digestión con *KpnI* y *PstI*, empleando las enzimas de restricción *KpnI* y *PstI* (Fig. 8). De este modo, se obtuvo la fusión NBzdRL-SKI_{D36A}, denominada Q2. La incorporación de la mutación en el gen resultante fue comprobada mediante secuenciación.

De igual modo, el plásmido pQE32-Q4 fue digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *PstI*, eliminando así el gen *aroK* que fue sustituido por la secuencia del gen *aroK*_{D36A} mutante. Así, se obtuvo la fusión NBzdR-SKI_{D36A}, denominada Q5.

3.9 Construcción de las fusiones traduccionales $P_{NI}::lacZ$ y $P_{NI+II}::lacZ$

Las fusiones traduccionales $P_{NI}::lacZ$ y $P_{NI+II}::lacZ$ se obtuvieron mediante la amplificación por PCR de las sondas P_{NI} y P_{NI+II} con los oligonucleótidos 5BZN-BKIN y 5BZN-NIU PNII, respectivamente (Tabla 6), y usando como molde el plásmido pCOR7 (Tabla 5). A continuación, ambas sondas fueron digeridas con las enzimas de restricción *XbaI* y *KpnI*, y posteriormente clonadas en el plásmido pSJ3, en posición 5' y en fase respecto del gen *lacZ*, generándose así las fusiones traduccionales correspondientes en los plásmidos denominados pSJ3P_{NI} y pSJ3P_{NI+II} (Tabla 5).

Estas fusiones traduccionales fueron posteriormente subclonadas en el plásmido pBBR1MCS-5 llevando a cabo una digestión de los plásmidos pSJ3P_{NI} y pSJ3P_{NI+II} con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, dando lugar a los plásmidos pBBR5P_{NI} y pBBR5P_{NI+II}, respectivamente (Tabla 5). La correcta inserción de ambas sondas fue comprobada mediante secuenciación.

4 Procedimientos de transferencia genética

4.1 Transformación de células de *E. coli*

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

4.2 Transferencia de plásmidos por conjugación

Los plásmidos se movilizaron a *Azoarcus* sp. CIB y sus derivados por conjugación biparental utilizando la cepa *E. coli* S17-1 λ pir como donador, según el protocolo establecido por de Lorenzo y Timmis (1994) con algunas modificaciones. Se utilizó una cantidad de células de la cepa donadora *E. coli* S17-1 λ pir correspondiente a una A_{600} de 5, y de la cepa receptora (*Azoarcus* sp. CIB) cultivada en medio mínimo MC con succinato 0.2 % se utilizó una cantidad de células correspondiente a una A_{600} de 35. Los exconjugantes fueron seleccionados aeróbicamente en placas de medio mínimo MC conteniendo citrato 0.2% (contraselección de la cepa donadora) y el correspondiente antibiótico del plásmido y, en su caso, el de la cepa receptora (cuando se utilizaron derivados de *Azoarcus* sp. CIB).

4.3 Construcción del mutante *Azoarcus* sp. CIBdacpR

Para la construcción del mutante *Azoarcus* sp. CIBdacpR se procedió a la interrupción insercional del gen *acpR* por recombinación homóloga. Para ello, se amplificó un fragmento interno del gen *acpR* de 410 pb utilizando los oligonucleótidos 5AcpRcib y 3AcpRcib (Tabla 6), y se clonó entre las dianas *Bam*HI/*Hind*III del *polylinker* de pK18mob (plásmido movilizable que no replica en *Azoarcus*). La construcción resultante, pK18mobacpR (Tabla 5), fue transferida de la cepa donadora *E. coli* S17-1 λ pir a la cepa receptora *Azoarcus* sp. CIB, mediante conjugación biparental. Los transconjugantes presentaban una interrupción génica por inserción, mediante recombinación homóloga, derivados del plásmido suicida pK18mob, y fueron seleccionados aeróbicamente en medio MC sin nitrato y suplementado con kanamicina (50 μ g/ml) y con citrato 0.4% (p/v) como fuente de carbono para la contra-selección de

la cepa donadora. El mutante *Azoarcus* sp. CIBdacrR fue analizado por PCR para confirmar la interrupción del gen truncado.

5 Técnicas de manipulación de proteínas

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

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

5.2 Obtención de anticuerpos anti-BzdR

Los anticuerpos frente a BzdR de *Azoarcus* sp. CIB se obtuvieron mediante inmunización de un conejo con la proteína BzdR. La inmunización del animal se realizó en tres pasos, en cada uno de los cuales se inyectaron 0.1 g de proteína en tampón PBS por vía intramuscular. La primera dosis se preparó en adyuvante de Freund completo, y la segunda y tercera en adyuvante de Freund incompleto, dejando transcurrir 15 días entre cada una de dichas dosis. Pasado este tiempo se extrajo el antisuero, se limpiaron los restos celulares y se eliminó el coágulo sanguíneo por centrifugación del suero a 5000 rpm, 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se inactivaron las proteínas del complemento incubando el extracto a 56°C durante 15 minutos. Tras este tratamiento se alicuotaron las muestras y se congelaron a -20°C. La especificidad del antisuero obtenido se ensayó mediante *Western Blot*.

5.3 Técnica de Western Blot

Después de llevar a cabo una electroforesis SDS-PAGE (12.5%) con 2.25 µg de proteína total de extractos celulares, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Sambrook y Rusell, 2001). La membrana se saturó con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en tampón PBS (fosfato sódico 10 mM, pH 7.4 conteniendo NaCl 140 mM) mediante incubación a 4°C durante 12 horas. Tras 3 lavados de 10 minutos con PBS que contenía Tween-20 al 0.1% (v/v), se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 hora en presencia de suero anti-BzdR en dilución 1/1000. Posteriormente, se repitieron los tres lavados con PBS-Tween y la membrana se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y agitación suave en presencia de una dilución 1/10000 de anticuerpos ECLTM Anti-rabbit IgG (GE Healthcare). Finalmente, tras cuatro lavados con PBS-Tween, las bandas se revelaron con el sistema ECLTM Western Blotting Detection (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech) durante 1 minuto. La cuantificación de la proteína BzdR se realizó utilizando el programa Quantity-One (Bio-Rad).

5.4 Sobreproducción y purificación de las proteínas expresadas desde el vector de expresión pQE32 ó pQE60

A continuación se explicará el proceso empleado para la sobreproducción y purificación de la proteína BzdR, cuyo protocolo, basado en el que describe el proveedor Qiagen, será ampliable a todas las demás proteínas sobreproducidas y purificadas mediante este método: His₆-BzdR, His₆-Fnr*, His₆-NBzdR, His₆-NBzdRL, His₆-CBzdR, His₆-SKI, His₆-BzdR3, His₆-BzdR4, His₆-BzdR5, His₆-Q1, His₆-Q2, His₆-Q4 e His₆-Q5.

El plásmido recombinante pQE32-BzdR (Tabla 5) contiene el gen *bzdR* desprovisto de su codón de inicio de la traducción, que fue sustituido por una secuencia de 6 histidinas más otros 6 aminoácidos en su extremo 5'. La sobreproducción de esta proteína His₆-BzdR se realizó en una cepa de *E. coli* M15 portadora del plásmido pREP4, que expresa el gen *lacI* (Tabla 5) para el estricto control de la expresión del gen His₆-*bzdR* clonado bajo el control del promotor *PT5* (que incorpora operadores *lac*) en el plásmido pQE32-BzdR. Las células de *E. coli* M15 (pREP4, pQE32-BzdR) fueron incubadas a 37°C en 100 ml de LB en presencia de ampicilina y kanamicina hasta que el cultivo alcanzó una A_{600} de 0.5 (aproximadamente 2 horas), momento en el cual se

indujo la hiperexpresión de la fusión His₆-BzdR mediante la adición de IPTG a una concentración de 0.5 mM. Las células fueron incubadas a 37°C durante 5 horas más y posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 minutos. El sedimento celular fue resuspendido en 10 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, KCl 300 mM, imidazol 100 mM, pH 8) y se procedió a la rotura de las células mediante tratamiento en la prensa de French (Aminco Corp.) a una presión de 20000 psi. El lisado celular fue centrifugado a 26000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue cuidadosamente decantado y se hizo pasar a través de columnas de agarosa-níquel-ácido nitrilotriacético, Ni-NTA, (QIAGEN). Las columnas se lavaron con 50 volúmenes de tampón de lisis y finalmente la proteína His₆-BzdR fue eluida con un tampón de elución de composición idéntica al tampón de lisis, pero con imidazol a una concentración de 1 M. Dependiendo de la utilización que se le fuera a dar a la proteína, ésta podía ser dializada. En dicho caso, la muestra eluida era dializada a 4°C en tampón FP (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 2 mM y KCl 50 mM), repartida en alícuotas y almacenada a -20°C. Si la muestra no era dializada, se almacenaba a 4°C.

5.5 Ensayos de crosslinking

Las proteínas purificadas His₆-BzdR, His₆-NBzdR, His₆-NBzdRL e His₆-CBzdR (todas ellas a concentraciones entre 2 y 10 μM) fueron incubadas con diferentes concentraciones de glutaraldehído (5-50 mM) a temperatura ambiente durante 20 minutos en el mismo tampón de lisis utilizado en el proceso de purificación de las proteínas (NaH₂PO₄ 50 mM, KCl 300 mM, imidazol 100 mM, pH 8). Las reacciones se pararon mediante la adición de tampón de ruptura Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8; SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.005%). Las muestras fueron hervidas durante 10 minutos a 100°C y analizadas mediante SDS-PAGE. En paralelo, fue llevado un ensayo control con lisozima, una proteína cuyo estado natural es monomérico, que fue tratada a las mismas concentraciones de glutaraldehído, pero en ningún caso se observaron bandas de posibles oligómeros (dato no mostrado) (Russell y Hopwood, 1976).

5.6 Ensayos de tripsinización

Las proteínas purificadas His₆-BzdR e His₆-CBzdR (ambas a una concentración de 5 μM) fueron incubadas con tripsina en 20 μl del tampón de reacción Tris-HCl 25 mM pH 7.5, CaCl₂ 10 mM, en ausencia y presencia de 2 mM del ligando benzoil-CoA

durante diversos tiempos entre 2 y 60 minutos a 37°C (Schujman *et al.*, 2006). Las reacciones se pararon mediante la adición de tampón de ruptura Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8; SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.005%). Las muestras fueron hervidas durante 10 minutos a 100°C y analizadas mediante SDS-PAGE.

5.7 Ensayos de fluorescencia

La intensidad de fluorescencia de His₆-BzdR e His₆-CBzdR fue determinada a 25°C utilizando un espectrofluorímetro SML-Aminco 8000 empleando una cubeta de cuarzo de 0.2 cm de paso óptico de excitación y 1 cm de paso óptico de emisión. La longitud de onda de excitación fue 275 nm, a la que absorben tanto los residuos de triptófano como los de tirosina. El espectro de emisión de fluorescencia se llevó a cabo en el intervalo de longitudes de onda entre los 300 a 400 nm utilizando una anchura de rendija de excitación y de emisión de 1 nm y 5 nm, respectivamente. La concentración final de proteína fue 1 μM en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, KCl 100 mM. Los ligandos benzoil-CoA, fenilacetil-CoA, CoA, ATP, benzoato y succinato (preparados en el mismo tampón) se añadieron a la muestra de proteína (volumen total de 400 μl) de 1 en 1 μl, hasta una concentración final de 50 μM. La absorbancia de la muestra a la longitud de onda de excitación siempre fue menor de 0.01, evitándose por ello efectos de filtro interno. Todos los espectros fueron corregidos con su correspondiente línea base así como por efecto de la dilución de la muestra. La desactivación de la emisión de fluorescencia de la proteína causada por la unión del ligando fue analizada con un modelo de unión a un único sitio, empleando la siguiente función:

$$F = 1 - (1 - F_{min}) (K_b[L]_f) / (1 + K_b[L]_f)$$

En esta expresión, F_{min} representa el valor de fluorescencia mínima, K_b representa la constante de asociación y $[L]_f$ representa la concentración de ligando libre. Los datos experimentales se ajustaron a esta función utilizando el programa Sigma Plot, lo que permitió la determinación de los valores de las constantes de asociación y desactivación máxima para los diferentes ligandos.

5.8 Ensayos de dicroísmo circular (CD)

Las medidas de dicroísmo circular en la región del UV-lejano se realizaron en un espectropolarímetro *Jasco J-715*. En los ensayos se utilizó una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico en la que se introdujo 0.3 ml de muestra. La concentración de

proteína His₆-CBzdR utilizada en los ensayos fue 10 μM, siendo diluida en un tampón Tris-HCl 20 mM pH 8.0, KCl 100 mM. Los espectros fueron obtenidos a 25°C en el intervalo de longitudes de onda entre los 200 y 250 nm utilizando una anchura de rendija de 1 nm y una velocidad de barrido de 20 nm/min. El espectro final de cada muestra es el promedio de una acumulación de cinco espectros individuales. El espectro inicialmente obtenido se corrige por la línea base y se normaliza por la concentración de residuos, para calcular así la señal de CD en unidades de elipticidad molar por residuo. Todos los cálculos se realizaron empleando el software del fabricante. Los espectros se analizaron mediante el paquete CDPro que contiene las siguientes aplicaciones: CONTIN (Provencher y Glockner, 1981), SELCON (Sreerama y Woody, 2000) y CDNN (Bohm *et al.*, 1992).

6 Ensayos de expresión

6.1 Ensayos de actividad enzimática

6.1.1 Ensayo de actividad β-galactosidasa

Para el ensayo de actividad β-galactosidasa se emplearon células de *E. coli* portadoras de la fusión $P_N::lacZ$ o $P_R::lacZ$, crecidas en medio rico LB o cultivadas anaeróbicamente en medio mínimo M63 con glicerol (20 mM) como fuente de carbono y en presencia de distintos compuestos aromáticos, según se detalla en cada caso, o bien células de *Azoarcus* sp. CIB*lacZ* cultivadas anaeróbicamente en medio MC con kanamicina y en presencia de benzoato 3 mM y/u otra fuente de carbono no aromática (0.4% p/v). Los cultivos se incubaron a 30°C, tanto en el caso de *E. coli* como de *Azoarcus* sp. CIB, hasta alcanzar la densidad óptica deseada en cada caso. La actividad β-galactosidasa se analizó permeabilizando las células, y las unidades de actividad enzimática (Unidades Miller) se determinaron según el método descrito por Miller (1972).

6.1.2 Ensayo de actividad siquimato quinasa

Para el ensayo de actividad siquimato quinasa se emplearon diversas proteínas purificadas como His₆-SKI, His₆-BzdR, His₆-CBzdR, His₆-Q1, His₆-Q2, His₆-Q4 e His₆-Q5. El tampón de reacción utilizado se componía de Tris-HCl 100 mM pH 7.5,

KCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM, tal y como se describe en (Oliveira *et al.*, 2001). La actividad siquimato quinasa fue determinada de forma indirecta, midiendo la formación de ADP mediante su acoplamiento al sistema enzimático formado por la piruvato quinasa y la lactato deshidrogenasa, y la consecuente monitorización espectrofotométrica de la desaparición de NADH a 340 nm (Ziegler, 1989) (Fig. 9). La mezcla de reacción (800 µl) contenía tampón de reacción, ATP 2 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, NADH 0.5 mM, 2 µl de una mezcla de piruvato quinasa (1 U) y lactato deshidrogenasa (1 U) de músculo de ratón (Roche) y 10 µl (a diversas concentraciones) de la proteína a ensayar. A dicha mezcla se añadieron concentraciones crecientes de siquimato de 0.02 a 10 mM. Los valores de K_m fueron calculados mediante la ecuación obtenida al realizar la representación de Lineweaver-Burke.

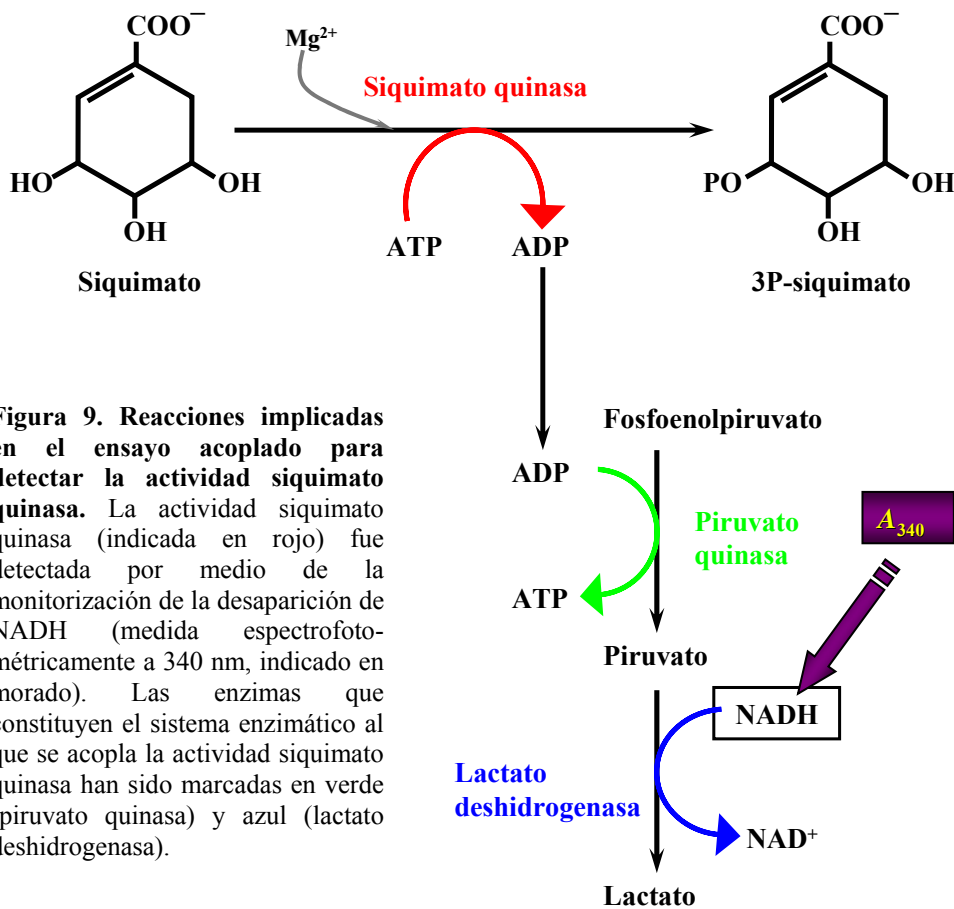


Figura 9. Reacciones implicadas en el ensayo acoplado para detectar la actividad siquimato quinasa. La actividad siquimato quinasa (indicada en rojo) fue detectada por medio de la monitorización de la desaparición de NADH (medida espectrofotométricamente a 340 nm, indicado en morado). Las enzimas que constituyen el sistema enzimático al que se acopla la actividad siquimato quinasa han sido marcadas en verde (piruvato quinasa) y azul (lactato deshidrogenasa).

6.2 Ensayos de transcripción *in vitro*

Todas las soluciones se prepararon con agua destilada que contenía el inhibidor de RNasa dietilpircarbonato (DEPC) (Sigma) y fueron filtradas antes de su uso. El tampón utilizado para la reacción contenía Tris-HCl 40 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM y KCl 100 mM. El DNA molde utilizado correspondía al plásmido pJCD-P_N o pJCD-P_R en cada caso (Tabla 5). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 µl, que contenían DNA plasmídico 5 nM y BSA a 500 µg/ml. Se añadieron 3 µl de *E. coli RNA Polymerase Holoenzyme* 50 nM (1 U/µl; USB), incubándose esta mezcla a 37°C durante 10 minutos. A continuación, se añadieron las proteínas de interés en cada caso (His₆-BzdR, His₆-Fnr*, His₆-NBzdRL, His₆-Q1, His₆-Q2, His₆-Q4, His₆-Q5), diluidas previamente en el tampón anteriormente mencionado que contenía además ditiotreititol 2 mM y BSA a 500 µg/ml, a diversas concentraciones finales. Además, se añadieron en diversas ocasiones diferentes ligandos (benzoil-CoA, siquimato, ATP, benzoato) a concentraciones de 0.5-5 mM. Esta mezcla fue incubada a 37°C durante 10 minutos para permitir la formación de los complejos abiertos. La elongación de la cadena de RNA naciente comenzó al añadir 5 µl de una mezcla que contenía ATP, CTP y GTP 1 mM, y 1 µCi de [α-³²P] UTP (Amersham Biosciences). Se paró la reacción al cabo de 15 minutos con 50 µl de una solución STOP que contenía NaCl 350 mM, EDTA 50 mM y RNA de transferencia 100 µg/ml. El RNA fue precipitado en 3 volúmenes de etanol absoluto y mantenido durante a 1 hora a -80°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm a -4°C y se llevó a cabo un segundo lavado con etanol al 70%. Las muestras se secaron y se resuspendieron en 25 µl de tampón de carga que contenía formamida al 80% (v/v), EDTA 20 mM, azul de bromofenol y azul de xilencianol, antes de ser calentadas a 90°C y cargadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 4% (v/v)-urea 8 M. La electroforesis se desarrolló a 300 V. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en películas HyperfilmTM MP (Amersham Pharmacia Biotech) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

6.3 Ensayos de mono-híbrido

Este método permitió ensayar la dimerización de diversas proteínas midiendo actividad β-galactosidasa, tal y como se describe en Di Lallo *et al.* (1999). Para ello, se creció la cepa *E. coli* MV1190 (pSJ6) y sus variantes que incorporan también el

plásmido pCI-cat, pCI-NcI, pCI-Q λ , pCI-Q λ 2 (Tabla 5), en medio rico LB hasta una A_{600} de 0.6. El plásmido pSJ6 incluye la fusión $\lambda P_R::lacZ$ que expresará β -galactosidasa si el promotor P_R no se encuentra reprimido por ninguna proteína. Los demás plásmidos expresarán la proteína correspondiente, que reprimirá al promotor P_R si presentan la capacidad de dimerizar. Finalmente, se midió la actividad β -galactosidasa tal y como es descrito por Miller (1972).

6.4 Ensayo de inmunidad frente a la inducción del ciclo lítico del fago λ

En este caso, las mismas células utilizadas en el ensayo de mono-híbrido fueron crecidas a 37°C y en agitación, en medio rico LB al cual se añadió MgSO₄ 10 mM y maltosa 0.2%, con el fin de favorecer la posterior infección con el fago λ EMBL-4 (Tabla 4), hasta una densidad óptica de 2 (A_{600}). Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en MgSO₄ 10 mM. A continuación, se separaron 200 μ l de células, a las cuales se añadieron 50 μ l del fago λ a diferentes concentraciones y se incubó la mezcla 30 minutos a 37°C. Las diferentes diluciones eran mezcladas con 4 ml de agar blando y posteriormente vertidas en placas de LB, algunas de las cuales incorporaban benzoato 5 mM, según el ensayo en cuestión. Dichas placas eran incubadas a 37°C durante 16 horas. La eficiencia de lisis fue determinada contando el número de calvas de lisis obtenidas en cada uno de los ensayos y comparando con los niveles obtenidos en la cepa control *E. coli* MV1190 (pSJ6), que no expresaba ningún represor del fago λ .

7 Ensayos de unión de proteína a DNA

7.1 Marcaje de sondas radiactivas

La obtención de las sondas radiactivas utilizadas en los experimentos que se explicarán a continuación se llevó a cabo mediante amplificación por PCR a partir del plásmido pECOR7 (Tabla 5), tal y como se describe en Barragán *et al.* (2005). Para la obtención de la sonda P_N se utilizaron los oligonucleótidos 5IVTPN y 3IVTPN (Tabla 6), cuyo producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *PvuII* y *EcoRI* obteniendo un fragmento resultante de 376 pb. Para la obtención de las sondas miniI (145 pb), miniII (80 pb) y miniIII (79 pb), se utilizaron los oligonucleótidos BLINE y 3IVTPN; PN-II y NIK; y RET1 y NIU PN-III (Tabla 6), respectivamente. En todos los

casos, los productos obtenidos fueron marcados en el extremo 3' cohesivo generado por la enzima *EcoRI*, mediante la acción del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* en presencia de [α - ^{32}P]dATP, como se ha descrito en el anterior apartado. Los fragmentos marcados radiactivamente fueron purificados con el kit Gene-Clean Turbo (Q-BIOgene).

7.2 Ensayos de retardo en gel

Para los ensayos de retardo en gel se utilizaron las sondas radiactivas obtenidas tal y como se detalla en el apartado anterior. Las mezclas de reacción contenían la proteína purificada correspondiente (His₆-BzdR, His₆-Fnr*, His₆-NBzdR, His₆-NBzdRL, His₆-BzdR3, His₆-BzdR4, His₆-BzdR5, His₆-Q1, His₆-Q2, His₆-Q4, His₆-Q5) a diversas concentraciones, así como la sonda correspondiente (P_N , mI, mII o mIII) marcada radiactivamente a una concentración de 0.5 nM en un volumen final de reacción de 9 μl . El tampón de retardo utilizado contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 2 mM, KCl 50 mM, seroalbúmina bovina (BSA) 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y, en determinados casos, DNA inespecífico de esperma de salmón a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El resultado de la reacción se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5-7% con tampón TBE 0.5x (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM). El gel se secó sobre papel Whatman 3MM y los productos de la reacción se detectaron por autorradiografía con películas Hyperfilm MP (Amersham Biosciences) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

7.3 Ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I

Las mezclas de reacción para el ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I se realizaron en tampón FP (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 2 mM y KCl 50 mM), al que se añadió BSA (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en presencia de la sonda correspondiente (P_N , mI, mII o mIII) a una concentración de 2 nM y 10 μl de la proteína purificada correspondiente (His₆-BzdR, His₆-Fnr*, His₆-NBzdR, His₆-NBzdRL, His₆-Q1, His₆-Q2) a diversas concentraciones. Las muestras (en un volumen final de reacción de 15 μl) se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos, transcurridos los cuales se añadieron 3 μl (0.05 U) de DNasa I (Amersham Biosciences) diluida en un tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM y KCl 125 mM. La digestión con DNasa I se realizó a 37°C durante 25 segundos y la reacción fue detenida por la adición de 180 μl de solución DNasa STOP (acetato sódico 0.4 M,

EDTA 2.5 mM, 50 µg/ml de DNA de esperm a de salmón y 0.3 µl/ml de glicógeno). Las muestras fueron sometidas a una extracción con fenol y el DNA fue precipitado en 3 volúmenes de etanol absoluto tras una centrifugación a 14000 rpm a 4°C y posteriormente lavado con etanol al 70%. Las muestras se secaron y se resuspendieron en tampón de carga [Tris-HCl 10 mM pH 8.0, formamida 80%, EDTA 20%, azul de bromofenol 0.05% (p/v) y azul de xilencianol 0.05% (p/v)] y fueron desnaturalizadas por incubación a 95°C durante tres minutos. En paralelo, las correspondientes sondas fueron secuenciadas por el método A+G de Maxam y Gilbert (1980), siendo analizadas junto a las reacciones de protección frente a la digestión con DNasa I en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% (v/v)-urea 8 M, los cuales se secaron al vacío sobre papel Whatman 3 MM y, por último, se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham Biosciences) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

7.4 Ensayo de protección frente a la acción del permanganato potásico (KMnO₄)

Mediante estos ensayos se puede observar el complejo abierto formado por la RNA polimerasa en estadios muy tempranos del inicio de la transcripción (Sasse-Dwight y Gralla, 1989). Se trata de un ensayo en el cual el permanganato potásico reacciona con residuos de timina en regiones de DNA monocatenario, es decir, aquellas regiones en las que se está produciendo el complejo abierto debido al inicio de la transcripción. Para realizar este ensayo se obtuvieron los complejos DNA-proteína de la misma forma que en el apartado anterior, utilizando la sonda P_N a una concentración de 2 nM. En este caso se utilizaron las proteínas His₆-Fnr* (25-250 nM) y *E. coli RNA Polymerase Holoenzyme* (1 U/µl; USB) (50-200 nM). La reacción se inició al añadir 2.5 µl de KMnO₄ 40 mM a los 15 µl de complejo DNA-proteína, incubándose durante 30 segundos a 37°C. A continuación, se paró la reacción añadiendo 2 µl de β-mercaptoetanol 2 M. El tratamiento posterior de la muestra fue idéntico al protocolo utilizado para el ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I, detallado en el apartado anterior. Una vez precipitadas las muestras con etanol se resuspendieron en 150 µl de piperidina 10% (v/v) y se incubaron durante 30 minutos a 90°C. La piperidina fue evaporada en una Speed Vac (Pacisa) y se lavó la muestra dos veces con 20 µl de agua destilada. Finalmente, las muestras fueron analizadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% (v/v)-urea 8 M, los cuales se secaron al vacío sobre papel Whatman 3 MM y, por último, se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham Biosciences) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

7.5 Ensayos de ultracentrifugación analítica

Los experimentos de velocidad de sedimentación y de equilibrio de sedimentación se llevaron a cabo en una ultracentrífuga analítica modelo Optima XL-A (*Beckman*) equipada con un espectrofotómetro UV-visible y con un rotor An50Ti con celdas de doble sector de cuarzo. Para la detección del gradiente de concentración de proteína, las medidas fueron llevadas a cabo utilizando una longitud de onda de absorción de 280 nm, cuando se midió proteínas, y 260 nm, cuando se midió DNA. En los diversos ensayos se utilizaron diferentes concentraciones de proteína (His₆-BzdR, His₆-NBzdR, His₆-NBzdRL, His₆-CBzdR, His₆-BzdR3, His₆-BzdR4, His₆-BzdR5, His₆-Q1) que variaban entre 1 y 30 μM. En todos los casos, las proteínas se encontraban disueltas en un tampón NaH₂PO₄ 50 mM, KCl 300 mM, imidazol 300 mM pH 8.0. La velocidad a la que se sometieron las muestras fue de 50000 rpm y el volumen de muestra fue de 400 μl. La distribución de coeficientes de sedimentación se calculó mediante el programa SEDFIT (Schuck y Rossmannith, 2000; Schuck *et al.*, 2002). Los coeficientes de sedimentación fueron corregidos por la composición del tampón utilizando el programa SEDNTERP (Laue, 1992) para obtener los valores estándares correspondientes (en agua y a 20°C).

Para la realización de los experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación de las proteínas His₆-BzdR, His₆-NBzdR e His₆-NBzdRL unidas al DNA, se incubaron diferentes concentraciones de dichas proteínas (0.5 - 10 μM) junto con el fragmento de DNA (0.05 - 0.2 μM). Las dos sondas de DNA utilizadas en el ensayo se correspondían con el promotor P_N completo (261 pb) y con la región I del promotor P_N (145 pb), respectivamente, y fueron obtenidas mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos RET1 y 3IVTPN (Tabla 6) para la obtención de la sonda P_N , y los oligonucleótidos BLINE y 3IVTPN (Tabla 6) para la obtención de la región I. Estos experimentos se llevaron a cabo en el mismo tampón descrito anteriormente (NaH₂PO₄ 50 mM, KCl 300 mM, imidazol 100 mM, pH 8). En este caso, se detectó la presencia de DNA midiendo la absorbancia a 260 nm. Las masas moleculares de las diferentes especies obtenidas en los experimentos de velocidad de sedimentación fueron determinadas utilizando el programa SEDPHAT.

Por último, en los ensayos de velocidad de sedimentación llevados a cabo con la proteína His₆-BzdR (10 μM) en ausencia y presencia de benzoil-CoA (0.5, 1 y 2 mM) se midió el patrón de interferencia, por lo que se utilizó una ultracentrífuga analítica modelo Optima XL-I (*Beckman*) equipada con un detector óptico de interferencia,

además del detector de absorbancia. En este caso, se utilizaron celdas de doble sector con cristales de zafiro en vez de cuarzo.

7.6 Ensayos de cristalización de la proteína BzdR y sus dominios NBzdRL y CBzdR

Los experimentos de cristalización llevados a cabo con la proteína BzdR y con sus dominios NBzdRL y CBzdR se realizaron en colaboración con el Dr. José Miguel Mancheño del Grupo de Cristalografía Macromolecular y Biología Estructural del Instituto “Rocasolano” de Química-Física (CSIC) de Madrid.

La determinación de la estructura tridimensional de proteínas mediante difracción de rayos X requiere el empleo de monocristales de tamaño adecuado (McPherson, 1982). Así, con objeto de determinar la estructura tridimensional de BzdR o de sus dominios a alta resolución, se procedió a la producción de monocristales de estas proteínas mediante la técnica de difusión de vapor en gota colgante. Sobre un cubre-objetos siliconizado se añadió una alícuota de una disolución de la proteína correspondiente a diversas concentraciones: en el caso de BzdR a concentraciones entre 5-11 mg/ml, y en el caso de CBzdR a concentraciones entre 10 y 30 mg/ml. Esta alícuota, de 1-2 μ l, era mezclada con un volumen idéntico de diferentes disoluciones de cristalización. Estas disoluciones de cristalización contenían un agente precipitante (sales, polietilenglicol de distinta masa molecular promedio, compuestos orgánicos no volátiles, etc.), un tampón y diferentes aditivos. Como una primera aproximación, la búsqueda de condiciones de cristalización de BzdR y CBzdR se llevó a cabo mediante el empleo de disoluciones de las siguientes casas comerciales: Crystal Screens I y II (Hampton Research), Structure Screens I y II (Molecular Dimensions), y los sistemas de Jena Bioscience (<http://www.jenabioscience.com/>). El cubre-objetos se dispuso sobre un pocillo de la caja empleada (Linbro) que contenía 500 μ l de la misma disolución de cristalización. Todos los experimentos de cristalización se llevaron a cabo a una temperatura constante de 19°C.

7.7 Análisis de la estructura de la proteína BzdR mediante microscopía electrónica y reconstrucción de partículas individuales

Los ensayos de microscopía electrónica fueron realizados mediante la técnica de tinción negativa. Para ello, se dispuso proteína His₆-BzdR purificada sobre rejillas cubiertas de carbón previamente sometidas a 1 minuto de descarga iónica. Las rejillas

fueron lavadas con agua y teñidas con acetato de uranilo al 2% durante 40 segundos. A continuación, las muestras se analizaron en un microscopio electrónico JEOL 1230, operando a 100 kV. Las micrografías se tomaron a una magnificación nominal de 50000 aumentos en condiciones de mínima dosis.

Las imágenes fueron digitalizadas usando un escáner Minolta Dimage Scan Multi Pro. La función de transferencia de contraste de cada micrografía fue estimada con el programa CTFFIND3 (Mindell y Grigorieff, 2003) y corregida con el programa Bsoft (Heymann y Belnap, 2007). Se seleccionaron 5741 partículas individuales mediante el programa 'boxer' del paquete de análisis de imagen EMAN (Ludtke *et al.*, 1999) y promediadas a una resolución final de 4.1 Å/píxel. Todas las imágenes de BzdR seleccionadas fueron normalizadas, centradas y sometidas a un refinamiento 3D, tal y como está implementado en el programa EMAN (Ludtke *et al.*, 1999). Se generaron varios modelos iniciales que, refinados de manera independiente y sin asumir ningún tipo de simetría, convergieron en la misma estructura. Ésta poseía una clara simetría C2 por lo que los últimos ciclos de refinamiento se realizaron imponiendo dicha simetría. El umbral de visualización engloba una masa correspondiente a una proteína asumiendo que la densidad media de las proteínas es de 1.35 g/ml. Los volúmenes fueron visualizados con el programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

7.8 Análisis de la interacción proteína-DNA mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

Para la realización de estos experimentos se utilizó una sonda de DNA obtenida mediante PCR usando como molde el plásmido pCOR7 (Tabla 5) denominada P_NL , que poseía 1.225 pb e incluía toda la región intergénica entre los genes *bzdR* y *bzdN*, y por tanto todo el promotor P_N , así como parte del gen *bzdN* (desde la posición -505 hasta la +720, respecto del sitio de inicio de la transcripción). Para su amplificación mediante PCR se utilizaron los oligonucleótidos 3REG y N3' (Tabla 6). Por otro lado, se utilizó proteína His₆-BzdR purificada tal y como se detalla en el apartado 5.4.

7.8.1 Formación de los complejos proteína-DNA

Las reacciones de unión fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente, durante 15 minutos, en tampón de transcripción *in vitro* (Tris-HCl 40 mM pH 7.5, KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM) o en tampón de retardo (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 2 mM, KCl 50 mM). Las concentraciones de

proteína y DNA utilizadas fueron las adecuadas para que los complejos de unión pudieran ser caracterizados con el AFM, es decir, a una concentración final de proteína controlada para que el exceso no unido al DNA y sí adsorbido a la superficie no perturbara la toma de imagen. De esta forma, la incubación de los complejos se realizó a una concentración final de sonda P_NL 2 nM, y a una relación $[P_NL]:[BzdR]$ variable entre 1:28 y 1:70 (partiendo de proteína purificada His₆-BzdR 100 nM).

7.8.2 Preparación y visualización de la muestra de AFM

Cada mezcla de reacción fue depositada en una superficie de mica recién exfoliada (lo que proporciona un sustrato limpio y atómicamente plano), en presencia de Mg²⁺ ó Ni²⁺, cuyo objetivo es dirigir la adsorción de los complejos sobre la mica. Para ello, las muestras de complejos se diluyeron 10 veces en el tampón de adsorción correspondiente, tampón de transcripción *in vitro* o de retardo, en presencia de MgCl₂ ó NiCl₂ a una concentración variable entre 3 y 10 mM. Después de 1 minuto de incubación sobre la mica se eliminó el material no adsorbido mediante sucesivos lavados con el mismo tampón de adsorción. Finalmente, las muestras pudieron ser visualizadas con un microscopio de fuerzas atómicas de Nanotec Electrónica S.L y las imágenes fueron procesadas con el programa WSxM (Horcas *et al.*, 2007).

8 Análisis de secuencias

8.1 Análisis de los datos de secuencia

El análisis de las secuencias nucleotídicas fue realizado con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor v7.0.3 (Hall, 1999) y con las aplicaciones del servidor de Biosupport (<http://bioinfo.hku.hk/>). Las secuencias de nucleótidos y las secuencias deducidas de aminoácidos fueron comparadas con las existentes en las bases de datos mediante el uso de los algoritmos BLASTN y TBLASTN, respectivamente (Altschul *et al.*, 1990) a través del servidor del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/BLAST.cgi>). La comparación de parejas de secuencias proteicas se realizó con el programa ALIGN (Wilbur y Lipman, 1983) y

los alineamientos múltiples de secuencias, con el programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), por medio del servidor de EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Para los análisis filogenéticos de las proteínas semejantes a Fnr se empleó el método “*del vecino más próximo*” y fueron llevados a cabo con el programa PHYLIP (Brodsky, 1995; Felsenstein, 1993) a través del servidor de TreeTop-GeneBee (<http://www.genebee.msu.su/genebee.html>).

8.2 Modelos de proteínas

Los modelos tridimensionales de AcpR, NBzdR y CBzdR fueron generados con el programa LOOPP (Teodorescu *et al.*, 2004), utilizando las proteínas CRP (Nº de acceso PDB 1I5Z), AroK de *E. coli* (Nº de acceso PDB 1KAG) y SinR de *B. subtilis* (Nº de acceso PDB 1b0n), respectivamente, como modelos, siendo visualizadas posteriormente con el programa PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

8.3 Número de acceso de la secuencia de nucleótidos del gen *acpR*

La secuencia de nucleótidos del gen *acpR* de *Azoarcus* sp. CIB fue enviada a la base de datos de GeneBank, donde le fue asignado el número de acceso AY996130.

RESULTADOS

Objetivo 1. Estudio de la regulación dependiente de oxígeno de la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Dado que los genes *bzd* están implicados en la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB, parecía lógico pensar que su expresión estuviera controlada por los niveles de oxígeno en la célula. Con el fin de determinar si el oxígeno controlaba la expresión de los genes involucrados en la ruta central del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB, se realizaron distintos abordajes experimentales.

1.1 Papel del oxígeno en la expresión de los genes del cluster *bzd*

En primer lugar, se estudió la actividad del promotor P_N , que controla la expresión del cluster *bzd*, cultivando células de *Azoarcus* sp. CIB en presencia o ausencia de oxígeno. Para ello, se determinó la actividad β -galactosidasa de la cepa *Azoarcus* sp. CIB*lacZ*, que incluye una fusión traduccional ($P_N::lacZ$) insertada en su cromosoma, cultivada en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, utilizando benzoato como fuente de carbono. Como se puede apreciar en la Figura 10A, los niveles de actividad β -galactosidasa fueron de cerca de dos órdenes de magnitud más elevados en ausencia de oxígeno que cuando éste estaba presente en el medio de cultivo. Se obtuvieron resultados similares a lo largo de toda la curva de crecimiento (datos no mostrados). Estos resultados sugerían que el oxígeno jugaba un papel crucial en la expresión de los genes *bzd*, inhibiendo la actividad del promotor P_N .

El efecto del oxígeno en la actividad del promotor P_N fue también analizado en un huésped heterólogo como es *E. coli*. Para ello, se transformó la cepa *E. coli* M182 con el plásmido pSJ3P_N ($P_N::lacZ$) y fue cultivada tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Se determinó la actividad β -galactosidasa en ambos cultivos obteniéndose niveles significativamente inferiores en el caso del crecimiento aeróbico (Fig. 10B). Estos niveles de actividad β -galactosidasa fueron similares a los obtenidos con la cepa *E. coli* M182 transformada con el plásmido pSJ3RP_N (*bzdR*/ $P_N::lacZ$), el cual expresa la proteína BzdR que reprime la actividad del promotor P_N (Barragán *et al.*, 2005) (Fig. 10B). Así, estos datos confirman el efecto negativo del oxígeno en la transcripción de los genes catabólicos del cluster *bzd*.

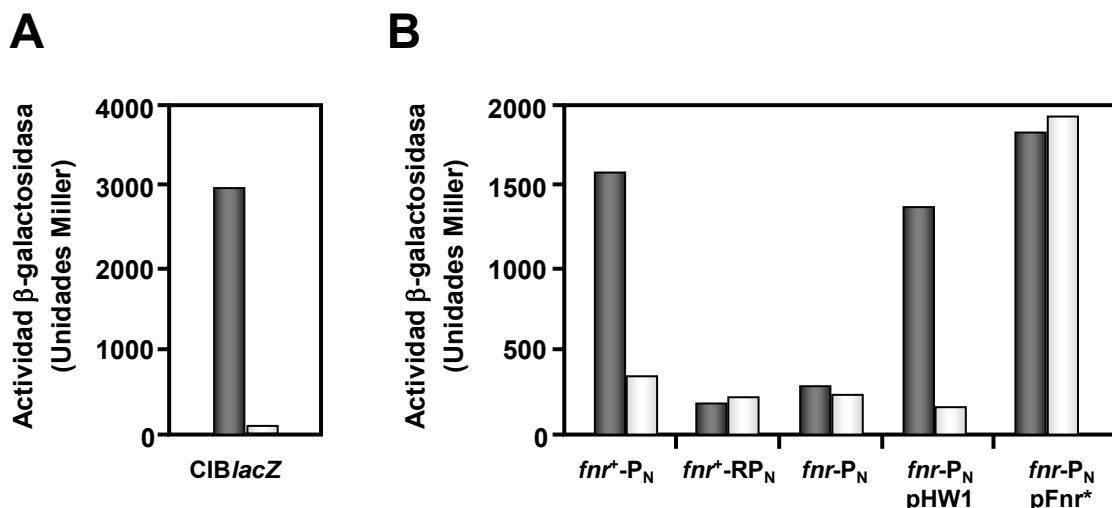


Figura 10. Actividad β -galactosidasa de *E. coli* y *Azoarcus* sp. CIB conteniendo la fusión traduccional $P_N::lacZ$. (A) La cepa *Azoarcus* sp. CIBlacZ ($P_N::lacZ$) (CIBlacZ) fue cultivada durante 48 h en medio MC suplementado con benzoato 3 mM como fuente de carbono y en condiciones aeróbicas (barra blanca) o en condiciones anaeróbicas en presencia de nitrato 10 mM (barra gris). (B) La cepa *E. coli* M182 (fnr^+) conteniendo el plásmido pSJ3P_N ($P_N::lacZ$) (fnr^+ -P_N) o el plásmido pSJ3RP_N ($bzdR$ - $P_N::lacZ$) (fnr^+ -RP_N) y la cepa *E. coli* JRG1728 (fnr^-) conteniendo los plásmidos pSJ3P_N (fnr^- -P_N), pHW1 (fnr^- -P_N pHW1) o pQE60-His₆-Fnr* (fnr^- -P_N pFnr*), fueron cultivadas en medio LB anaeróbicamente (barras grises) o aeróbicamente (barras blancas) hasta que alcanzaron la fase estacionaria. La actividad β -galactosidasa fue medida como se describe en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

1.2 Papel de la proteína Fnr en la actividad del promotor P_N

Un análisis detallado de la secuencia de nucleótidos del promotor P_N reveló la presencia de la secuencia 5'-TTGACTTAGATCAA-3', la cual se extendía desde la posición -36 a la posición -49, centrada en la posición -42.5 con respecto del punto de inicio de la transcripción (+1) (Fig. 11). Esta secuencia es prácticamente idéntica a la secuencia consenso 5'-TTGAT-N₄-ATCAA-3' (donde N corresponde a cualquiera de las cuatro bases nitrogenadas) que reconoce la proteína Fnr de *E. coli* (Spiro y Guest, 1990). Esta observación sugería la implicación de una proteína de la superfamilia Fnr/Crp en la regulación del promotor P_N , mediante su unión a esta secuencia consenso únicamente en ausencia de oxígeno. Con el fin de confirmar el papel de la proteína Fnr de *E. coli* en la actividad del promotor P_N , se midió la actividad β -galactosidasa de la cepa *E. coli* JRG1728 (cepa fnr^- derivada de la cepa M182) transformada con el plásmido pSJ3P_N ($P_N::lacZ$).

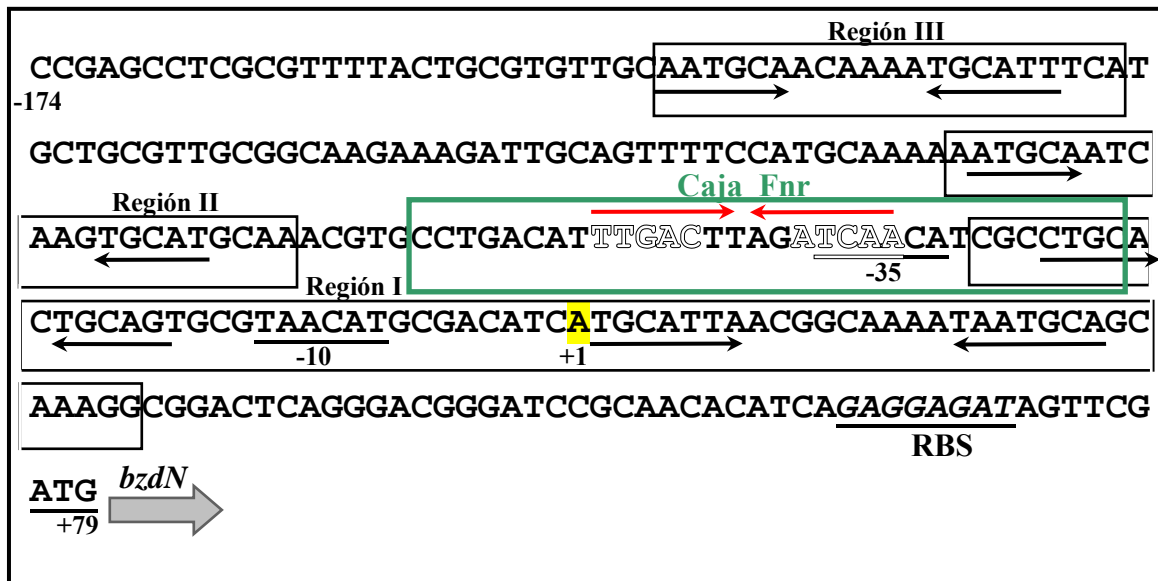


Figura 11. Secuencia de nucleótidos del promotor P_N . Secuencia del promotor P_N desde la posición -174 a la +79. La posición +1 ha sido marcada en amarillo, las cajas -10 y -35 de reconocimiento de la RNA polimerasa han sido subrayadas, la región de unión del ribosoma (RBS) figura en cursiva y subrayada, y el codón de iniciación (ATG) del gen *bzdN* también ha sido subrayado. Por otro lado, han sido recuadradas las 3 regiones de unión de la proteína BzdR (Barragán *et al.*, 2005) y han sido marcadas con flechas negras las secuencias palindrómicas de cada una de ellas. Por último, se ha recuadrado en un trazo más grueso y de color verde la región probablemente reconocida por una proteína de la familia Fnr (caja Fnr) y se han marcado con flechas rojas y letras blancas las secuencias palindrómicas de la misma y las correspondientes a la secuencia consenso, respectivamente.

Como se puede observar en la Figura 10B, la cepa *fnr*⁻ cultivada tanto en presencia como en ausencia de oxígeno apenas muestra actividad del promotor P_N . Sin embargo, cuando esta misma cepa *E. coli* JRG1728 (pSJ3P_N) se transforma con el plásmido pHW1 (Tabla 5), que expresa constitutivamente el gen *fnr* de *E. coli*, se recuperan unos niveles de actividad β-galactosidasa muy similares a los obtenidos con la cepa *E. coli* M182 *fnr*⁺ (pSJ3P_N) cultivada en ausencia de oxígeno. Estos datos parecen indicar que una proteína de la familia Fnr es necesaria para la inducción anaeróbica del promotor P_N en *E. coli*. Con el fin de confirmar esta aseveración, se estudió la expresión de la fusión $P_N::lacZ$ en presencia de Fnr*, un mutante de la proteína Fnr debido a la sustitución D154A que le permite dimerizar en presencia de oxígeno y que, por tanto, es activo de forma constitutiva (Kiley y Reznikoff, 1991; Lazazzera *et al.*, 1993; Ziegelhoffer y Kiley, 1995). Como se observa en la Figura 10B, cuando la cepa *E. coli* JRG1728 (pSJ3P_N) era transformada con el plásmido pQE60-Fnr* (Wing *et al.*, 2000) se obtenían elevados niveles de actividad β-galactosidasa al cultivar las células tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Todos estos datos tomados en conjunto señalan de forma inequívoca a Fnr como un factor transcripcional imprescindible para la actividad del promotor P_N en *E. coli*. Además, se ha demostrado que la represión dependiente de oxígeno del *cluster bzd* puede ser evitada mediante la expresión de la proteína Fnr*, que posee capacidad activadora del promotor P_N tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

1.3 Estudio de la unión de la proteína Fnr* al promotor P_N

Con el fin de estudiar la interacción de la proteína Fnr con el promotor P_N , y poder realizar todos los experimentos *in vitro* en condiciones aeróbicas, se hiperprodujo la proteína Fnr* de *E. coli* clonada en el plásmido pQE60-Fnr* (Tabla 5), la cual es capaz de mantener la actividad en presencia de oxígeno (Kiley y Reznikoff, 1991; Ziegelhoffer y Kiley, 1995). La purificación de la proteína His₆-Fnr* se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad con columnas de níquel, tal y como se describe en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos.

Tras la purificación de la proteína Fnr*, se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel utilizando como sonda de DNA un fragmento del promotor P_N de 376 pb que se extiende desde la posición -293 a la +83 (sonda P_N). La proteína Fnr* mostró la capacidad de unirse a la sonda P_N , retardando su migración de forma progresiva al ir aumentando la concentración de proteína (Fig. 12A). Esta unión era específica, como quedó patente al ser inhibida mediante la adición de sonda P_N no marcada al ensayo de retardo y, sin embargo, no verse afectada dicha unión cuando se añadía una sonda heteróloga no marcada (Fig. 12B).

Una vez demostrada la unión de Fnr* a la sonda P_N se procedió a identificar la región del promotor P_N a la que se unía mediante ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I (véase apartado 7.3 de Materiales y Métodos). Como se puede observar en la Figura 12C, la protección de la proteína Fnr* sobre la sonda P_N se extiende desde la posición -26 a la -57, con respecto a la posición +1 del inicio de la transcripción del promotor P_N , y comprende la secuencia palindrómica 5'-TTGACTTAGATCAA-3' anteriormente mencionada y predicha como región de unión de Fnr. La región donde se une la proteína Fnr queda centrada en la posición -42.5 desde el inicio de la transcripción y solapa con la caja -35 de reconocimiento de la RNAP, lo que define al promotor P_N como un promotor dependiente de activador de clase II (Rhodius y Busby, 1998).

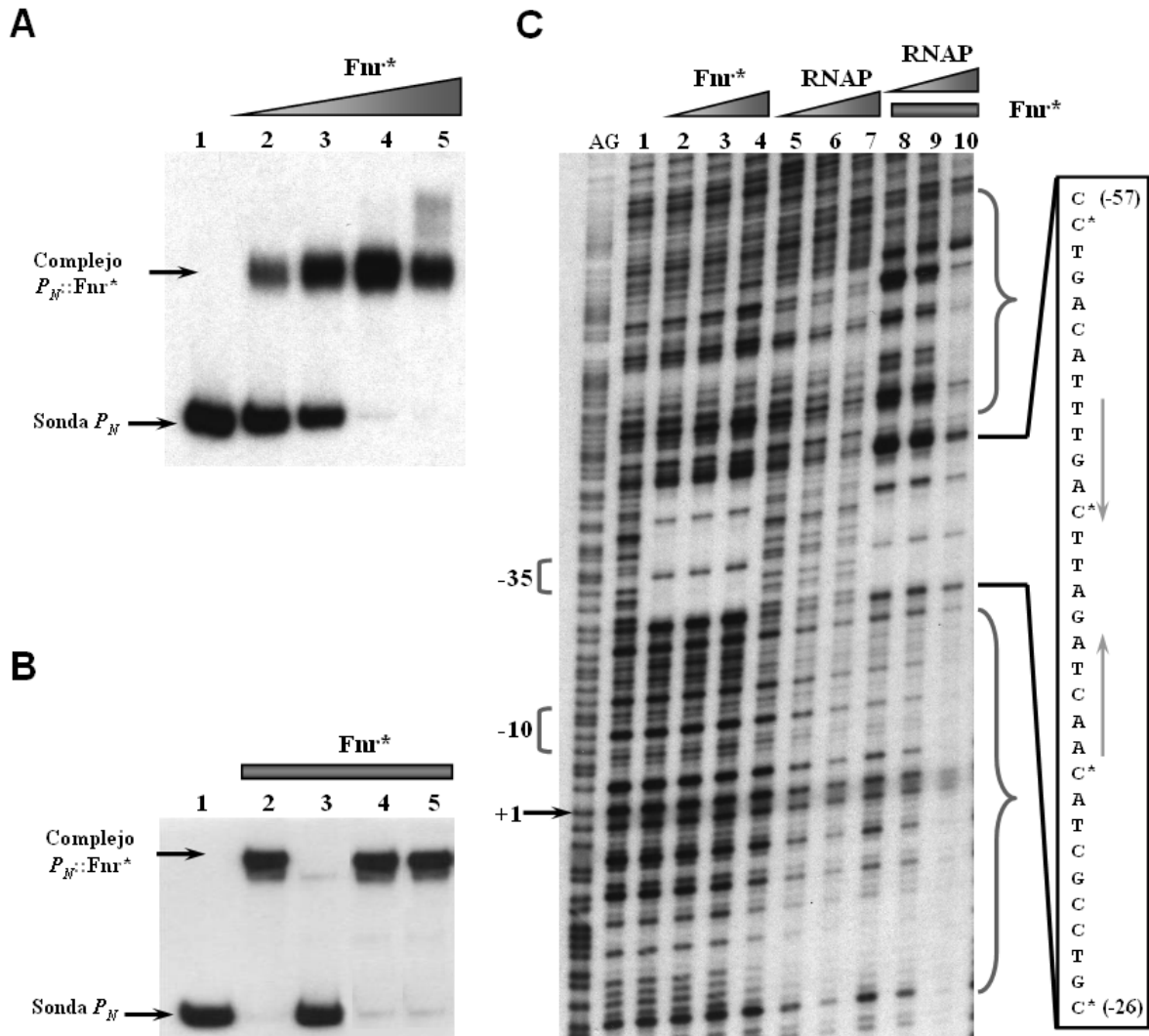


Figura 12. Ensayos *in vitro* de la unión de la proteína Fnr* al promotor P_N . (A) **Ensayo de retardo en gel.** En la calle 1 se cargó sonda P_N en ausencia de proteína. En las calles 2-5 se añadieron concentraciones crecientes, 1, 2.5, 5 y 10 nM, respectivamente, de la proteína purificada His₆-Fnr*. (B) **Ensayo de especificidad.** En la calle 1 se cargó sonda P_N en ausencia de proteína. En las calles 2-5 se añadió una concentración de 5 nM de la proteína purificada His₆-Fnr*. En la calle 3 se añadió sonda P_N no marcada radiactivamente a una concentración de 100 nM, y en la calle 5 se añadió DNA inespecífico de esperma de salmón a una concentración de 100 µg/ml. (C) **Ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I de la interacción de la proteína Fnr* y la RNAP con el promotor P_N .** En la calle 1 se cargó sonda P_N en ausencia de proteína. Las calles 2-4 incorporaban 50, 100 y 150 nM de proteína purificada His₆-Fnr*, respectivamente. Las calles 5-7 incorporaban 50, 100 y 150 nM de RNAP purificada de *E. coli*, respectivamente. Las calles 8-10 incorporaban todas 50 nM de His₆-Fnr*, y 50, 100 y 150 nM de RNAP, respectivamente. En la calle señalada como AG fue cargada la reacción de secuenciación A+G de Maxam y Gilbert de la sonda P_N . A la derecha, se puede apreciar una vista expandida de la región protegida por la proteína His₆-Fnr*, así como los nucleótidos cuyos enlaces fosfodiéster resultaron ser hipersensibles a la digestión por DNasa I, los cuales han sido señalados con asteriscos. Las flechas grises indican la secuencia consenso reconocida por Fnr*. También han sido marcadas con llaves las dos regiones que flanquean el operador Fnr y son protegidas por la RNAP. Igualmente, se indican las regiones -35, -10 y +1 del promotor P_N . Los ensayos de retardo en gel y de protección frente a la digestión por DNasa I se realizaron como se indica en los apartados 7.2 y 7.3 de Materiales y Métodos, respectivamente.

1.4 Activación transcripcional del promotor P_N mediada por la proteína Fnr

La activación de la transcripción en los promotores de clase II suele implicar interacciones proteína-proteína entre el activador y la RNAP (Busby y Ebright, 1999; Rhodius y Busby, 1998). Con el fin de estudiar si este tipo de interacción entre Fnr y la RNAP tenía lugar en el promotor P_N se llevaron a cabo ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I sobre la sonda P_N en presencia de ambas proteínas. Los resultados, mostrados en la Figura 12C, pusieron de manifiesto que la unión de la RNAP al promotor P_N se ve incrementada en presencia de la proteína Fnr*, lo que sugiere un posible reclutamiento de la RNAP por parte de la proteína Fnr. Además, en la huella generada por la RNAP en presencia de Fnr se puede apreciar un aumento de la protección en las regiones que flanquean el sitio de unión de Fnr. La protección de la región *upstream* podría atribuirse al dominio α -CTD de la RNAP, tal y como ya se ha descrito en otros casos (Attey *et al.*, 1994; Busby y Ebright, 1999; Kolb *et al.*, 1993; Wing *et al.*, 2000). La protección de la región *downstream* del sitio Fnr podría ser debida a la subunidad σ^{70} de la RNAP, como también ha sido demostrado en otros casos en los que se ha identificado una pequeña región en el dominio C-terminal de la subunidad σ^{70} (aminoácidos 590-603) que es indispensable en la activación de algunos promotores dependientes de Fnr (Lonetto *et al.*, 1998). Esta región contiene en su secuencia un residuo ácido (Glu591) y seis residuos básicos (Lys593, Arg596, Lys597, Arg599, His600 y Arg603), los cuales, al ser sustituidos, dan lugar a una disminución de la activación de la transcripción dependiente de Fnr (Bell y Busby, 1994; West *et al.*, 1993). En base a estos antecedentes y con el fin de determinar la posible interacción entre el dominio C-terminal de la subunidad σ^{70} y la proteína Fnr en la activación del promotor P_N , se midió la expresión de la fusión $P_N::lacZ$ en cultivos anaeróbicos de *E. coli* PK330, una cepa que contiene el gen *rpoD*, que codifica la subunidad σ^{70} de la RNAP, bajo el control del promotor *P_{trp}*, responsable de la regulación del operón *trp* implicado en la ruta de síntesis del triptófano, y que impide que la bacteria pueda crecer en presencia de triptófano (Lonetto *et al.*, 1998), salvo si el gen *rpoD* (o alguna de sus variantes) es suministrado desde un plásmido como pGEX-2T σ^{70} o sus variantes [σ^{70} (EA591)], [σ^{70} (KA593)] y [σ^{70} (KA597)] (Tabla 5) (Lonetto *et al.*, 1998), que expresan las subunidades σ^{70} con las correspondientes mutaciones indicadas en sus dominios C-terminales.

Las tres cepas mutantes y portadoras de la fusión $P_N::lacZ$ presentaron una tasa de crecimiento en medio líquido semejante a la de la cepa que contenía el plásmido que expresa la subunidad σ^{70} parental. Sin embargo, al medir la actividad del promotor P_N se pudo observar que los mutantes de la subunidad σ^{70} que habían sufrido la sustitución de una alanina por una lisina, KA593 y KA597, mostraban una actividad significativamente menor que la mostrada por la cepa que expresaba la subunidad σ^{70} silvestre. El otro mutante, [σ^{70} (EA591)], no mostró diferencias significativas respecto de los niveles obtenidos con la cepa silvestre (Fig. 13). Estos resultados sugerían que, efectivamente, la interacción entre la proteína Fnr y la subunidad σ^{70} de la RNAP juega un papel crucial en la activación del promotor P_N .

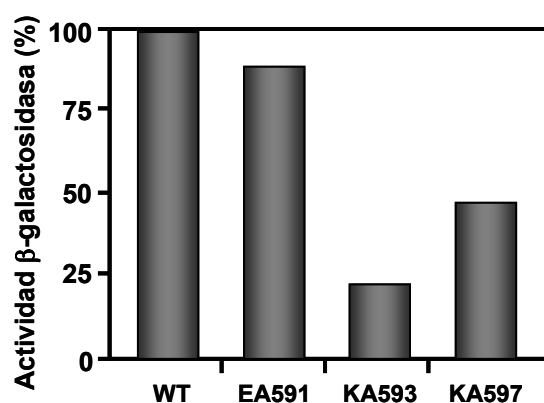


Figura 13. Efecto de las mutaciones en la subunidad σ^{70} de la RNAP en la expresión de la fusión $P_N::lacZ$ en *E. coli* mediada por Fnr. La cepa *E. coli* PK330 conteniendo el plásmido pBBR5 P_N ($P_N::lacZ$) fue transformada con diversos plásmidos: pGEX-2T σ^{70} (WT), pGEX-2T σ^{70} [EA591] (EA591), pGEX-2T σ^{70} [KA593] (KA593) ó pGEX-2T σ^{70} [KA597] (KA597). Posteriormente, todas ellas fueron cultivadas anaeróbicamente durante 10 horas, en medio mínimo M63 con glicerol 20 mM y 20 μ g/ml de triptófano, hasta alcanzar una A_{600} de 0.4. La actividad β -galactosidasa se representa en porcentaje con respecto a la actividad medida en la cepa silvestre (WT = 370 U. Miller). Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

Con el fin de demostrar *in vitro* el efecto de la proteína Fnr en la activación del promotor P_N se llevaron a cabo ensayos de transcripción *in vitro*, utilizando para ello proteína purificada Fnr*, RNAP de *E. coli* y el plásmido pJCD- P_N (Tabla 5), en el cual se ha clonado el promotor P_N que transcribe un RNAm de 184 nt. Como se puede apreciar en la Figura 14, la presencia de la proteína Fnr* en la mezcla de reacción es imprescindible para que tenga lugar la transcripción desde el promotor P_N , aumentando los niveles del transcrito esperado de 184 nt a medida que se incrementa la concentración de proteína en el ensayo.

Por el contrario, en ausencia de la proteína Fnr* únicamente se puede apreciar el transcrito control de 105 nt, incluso a concentraciones de RNAP que mostraban unión

de ésta a la sonda P_N en los ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I (Fig. 12C).

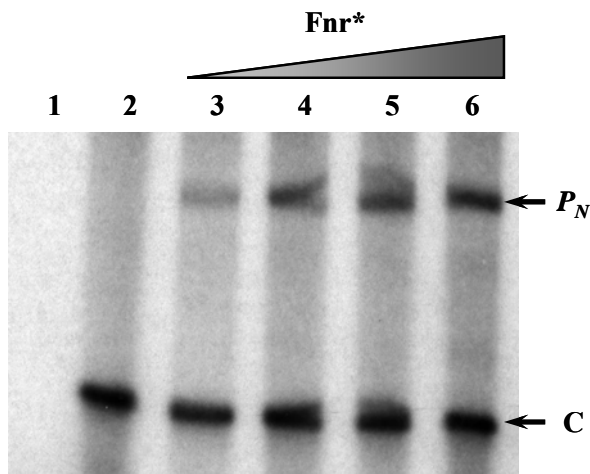


Figura 14. Efecto de la proteína Fnr* en la transcripción *in vitro* desde el promotor P_N . Se llevaron a cabo reacciones de transcripción *in vitro* de múltiples rondas utilizando como molde el plásmido pJCD- P_N , que incorpora, en sentidos divergentes, un promotor control, que expresa un RNAm de 105 nucleótidos (C), y el promotor P_N , que expresa un RNAm de 184 nt (P_N). En la calle 1 se cargó mezcla de reacción sin RNAP. En las calles 2-6, se cargaron reacciones conteniendo RNAP de *E. coli* (50 nM) y proteína purificada His₆-Fnr* a una concentración creciente de 0, 1, 2.5, 5 y 10 nM, respectivamente. Los ensayos fueron realizados tal y como se detalla en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos.

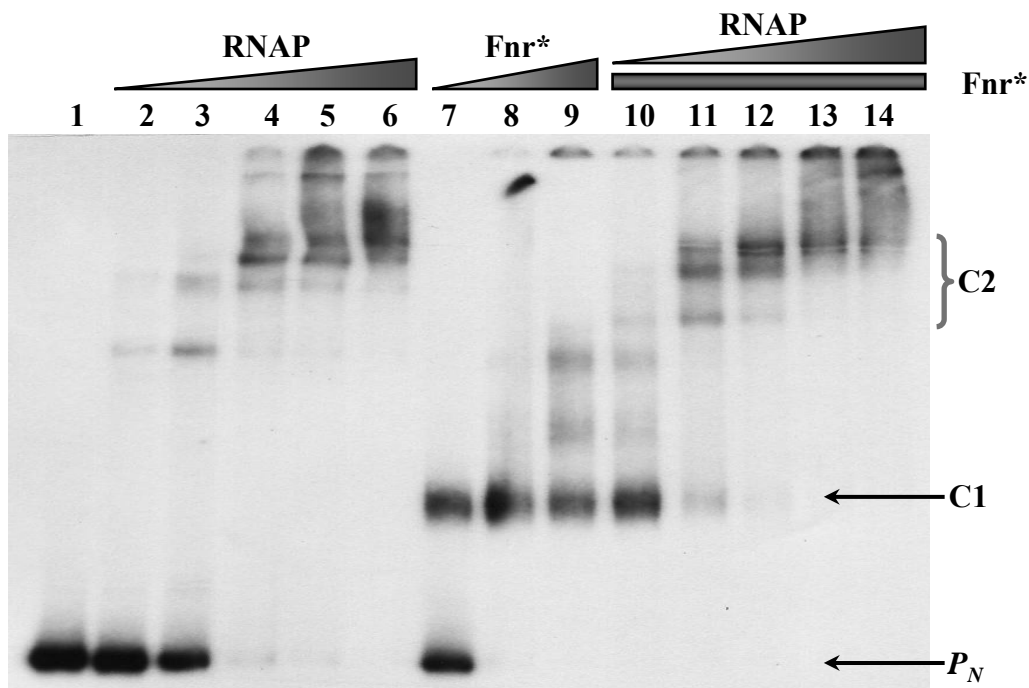


Figura 15. Ensayos de la unión de las proteínas Fnr* y RNAP al promotor P_N . Se llevó a cabo un ensayo de retardo en gel, tal y como se detalla en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. En la calle 1 se cargó sonda P_N libre. En las calles 2-6 se cargaron concentraciones crecientes 2, 4, 10, 20 y 40 nM, respectivamente, de RNAP. En las calles 7-9 se cargaron concentraciones crecientes 5, 10 y 25 nM, respectivamente, de proteína purificada His₆-Fnr*. Por último, en las calles 10-14 se cargaron muestras que contenían proteína purificada His₆-Fnr* 10 nM, así como concentraciones crecientes 2, 4, 10, 20 y 40 nM, respectivamente, de RNAP. A la derecha han sido señaladas las bandas correspondientes a la sonda libre (P_N), así como las formadas por los complejos de unión con la proteína His₆-Fnr* (C1), o bien con la RNAP ó RNAP + His₆-Fnr* (C2).

Para confirmar los resultados obtenidos mediante ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I y que sugerían que Fnr favorecía la interacción de la RNAP con el promotor P_N (Fig. 12C) se realizaron ensayos de retardo en gel del promotor P_N con RNAP y Fnr.

En la Figura 15 se puede apreciar la notable diferencia existente entre la calle 3, que incorpora RNAP 4 nM, y la calle 11, con idéntica concentración de RNAP y proteína Fnr* 10 nM, ya que sólo en esta última se puede observar una significativa formación del complejo $P_N::RNAP$ (C2), desapareciendo tanto la banda de sonda libre (P_N), como la banda del complejo $P_N::Fnr^*$ (C1). Estos resultados confirman que Fnr favorece el reclutamiento de la RNAP en el promotor P_N .

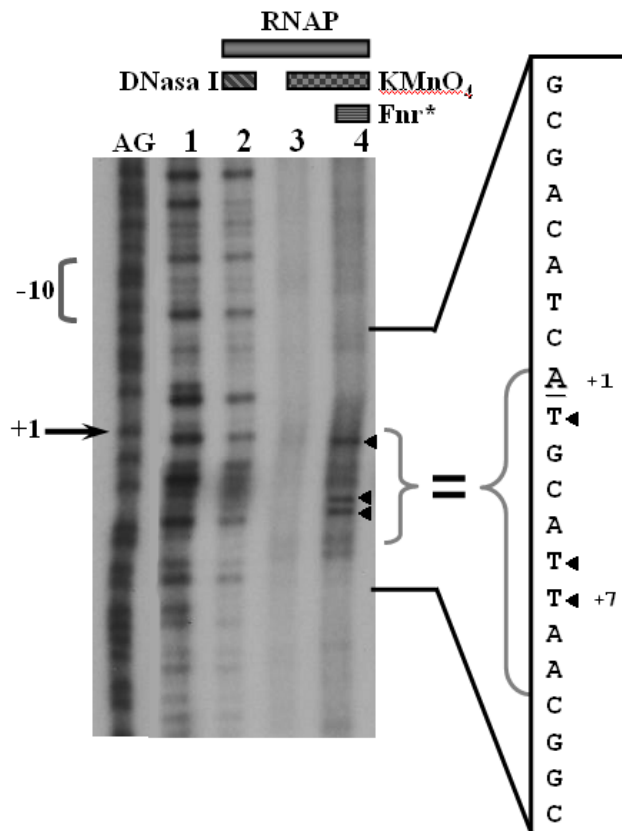


Figura 16. Ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I y a la acción del KMnO₄ de la interacción de la proteína Fnr* y la RNAP con el promotor P_N . En la calle 1 se cargó sonda P_N (S) en ausencia de proteínas. Las calles 2-4 incorporaban RNAP 100 nM. En la calle 2 se llevó a cabo un ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I de la sonda P_N . En las calles 3 y 4 se añadió KMnO₄ a la mezcla de reacción. En la calle 4 se añadió proteína purificada His₆-Fnr* 100 nM. En la calle AG fue cargada la reacción de secuenciación A+G de Maxam y Gilbert de la sonda P_N . A la derecha, se puede apreciar una vista expandida de la región donde tiene lugar la formación del complejo abierto, subrayándose la posición +1. Tanto en el interior de la imagen como en la secuencia de la derecha han sido señaladas con cabezas de flecha aquellas bases del complejo abierto que han sido modificadas por el KMnO₄. Las regiones -10 y +1 del promotor P_N se indican a la izquierda de la figura.

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de protección frente a la acción del KMnO₄ para establecer la influencia de la proteína Fnr en la formación del complejo abierto. Para ello, se realizaron mezclas de reacción con RNAP y KMnO₄, el cual es capaz de romper fragmentos de DNA de una sola hebra que se forman durante la apertura de la horquilla de transcripción, tanto en presencia como en ausencia de la proteína purificada Fnr*. Como se aprecia en la Figura 16, únicamente en presencia de la proteína Fnr* se logra formar el complejo abierto, que se pone de manifiesto por el bandeo observado

de un fragmento de 6 pb que se extiende desde la posición +2 hasta la posición +7, e implica a las bases subrayadas en la secuencia: 5'-ATGCATTAA-3'. Estos resultados revelan que la proteína Fnr es necesaria para la formación del complejo abierto en la iniciación de la transcripción del promotor P_N .

En conclusión, los distintos ensayos *in vitro* demostraron que aunque la RNAP es capaz de unirse al promotor P_N en ausencia de Fnr, la proteína Fnr favorece esta interacción y es esencial para el inicio de la transcripción tras la formación del complejo cerrado RNAP/ P_N .

1.5 La proteína AcpR está involucrada en la activación del promotor P_N en *Azoarcus* sp. CIB

Tras haber demostrado de forma inequívoca el papel de la proteína Fnr de *E. coli* como activador transcripcional del promotor P_N , se procedió a la identificación del ortólogo de Fnr que controla realmente la expresión de los genes del *cluster bzd* en *Azoarcus* sp. CIB. Para ello, se llevó cabo una comparación de la secuencia del *fnr* de *E. coli* contra el genoma de *Azoarcus* sp. EbN1, identificándose un ortólogo (ebA5149) situado entre el gen *hemN* (ebA5151), que codifica la enzima coproporfirinógeno III oxidasa independiente de oxígeno y regulada por Fnr en *Pseudomonas* (Rabus *et al.*, 2005), y el gen ebA5146, que codifica una proteína de función desconocida (Fig. 17) (Rabus *et al.*, 2005).

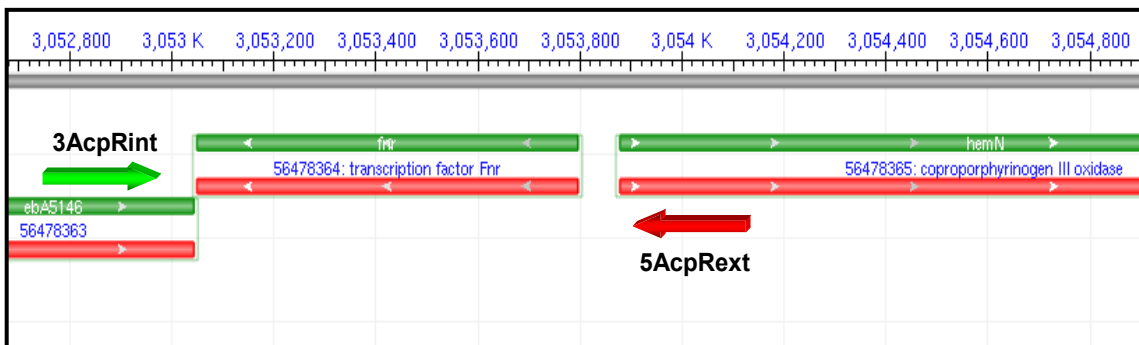


Figura 17. Región del genoma de *Azoarcus* sp. EbN1 que contiene un ortólogo del gen *fnr* de *E. coli*. El gen ebA5149 de *Azoarcus* sp. EbN1 es un ortólogo del gen *fnr* de *E. coli* y se extiende a lo largo de 747 pb, concretamente, desde la posición 3 053 049 hasta la posición 3 053 795 del genoma, estando flanqueado por dos genes: *hemN*, que codifica una coproporfirinógeno III oxidasa, y ebA5146, un gen de función desconocida. Los oligonucleótidos 5AcpRcib y 3AcpRcib (Tabla 6) fueron utilizados para amplificar una secuencia de 1220 pb del genoma de *Azoarcus* sp. CIB, que incluía el gen ortólogo a *fnr* de *E. coli*.

Basándose en la información proporcionada por el genoma de *Azoarcus* sp. EbN1, se diseñaron dos oligonucleótidos, uno de ellos en el extremo 5' del gen *hemN* y otro en el extremo 3' del gen *ebA5146*, para amplificar mediante PCR una secuencia de 1220 pb utilizando como molde el genoma de *Azoarcus* sp. CIB. Dicha secuencia contenía los extremos predichos, es decir, los ortólogos de los genes *hemN* y *ebA5146* flanqueando al correspondiente ortólogo de *fnr* de *Azoarcus* sp. CIB, el cual fue nombrado como *acpR* (**a**romatic **c**entral **p**athway **R**egulator). El gen *acpR* codifica una proteína de 248 aminoácidos, cuya secuencia presenta una significativa similitud ($\geq 40\%$ identidad) con la de algunos miembros de la superfamilia de reguladores transcripcionales Fnr/Crp (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de identidad entre la proteína AcpR de *Azoarcus* sp. CIB y proteínas de la superfamilia Fnr/Crp de diversos organismos.

Nombre	Organismo	Porcentaje de identidad	Nº de acceso
AcpR	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	94%	YP_159953
Proteína de unión a AMPc	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	75%	ZP_00150505
Regulador transcripcional global	<i>Rubrivirax gelatinosus</i> PM1	68%	AAW66138
Proteína de unión a AMPc	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	58%	ZP_00364405
Fnr	<i>Ralstonia solanacearum</i>	54%	CAD14985
Fnr	<i>Escherichia coli</i>	43%	YP_001730333

Una vez identificado el gen *acpR* se procedió al estudio de su papel en la expresión del *cluster bzd* en *Azoarcus* sp. CIB. Para ello, se construyó la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dacpR*, cuyo gen *acpR* fue inactivado mediante interrupción insercional, tal y como se detalla en el apartado 4.3 de Materiales y Métodos. Si bien esta cepa mutante fue incapaz de crecer en condiciones anaeróbicas utilizando como fuente de carbono diversos compuestos aromáticos, tales como benzoato, fenilacetato o 4-hidroxibenzoato, todos ellos metabolizados a través de la ruta central codificada en el *cluster bzd*, no presentó ningún defecto en el crecimiento cuando éste se llevó a cabo en condiciones aeróbicas en los mismos compuestos. Cuando la cepa mutante fue complementada con el plásmido pBBR1MCS-5*acpR*, que expresa el gen *acpR* bajo el control del promotor

Plac (Tabla 5), se pudo restablecer el crecimiento en condiciones anaeróbicas utilizando compuestos aromáticos como fuente de carbono, lo que sugiere que la proteína AcpR es imprescindible para que tenga lugar la expresión del *cluster bzd* (Fig. 18A).

Sin embargo, aún quedaba por confirmar que el producto del gen *acpR* estuviera directamente implicado en la actividad del promotor P_N . Para ello, tanto la cepa *Azoarcus* sp. CIB como el mutante *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* fueron transformados con el plásmido pBBR5P_N, el cual incluye la fusión traduccional $P_N::lacZ$. Cuando la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pBBR5P_N) fue cultivada en condiciones anaeróbicas con benzoato y piruvato se obtuvo una significativa actividad β -galactosidasa (Fig. 18B). Por el contrario, cuando el mutante *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* (pBBR5P_N) fue cultivado en estas mismas condiciones, la actividad β -galactosidasa no superó el nivel basal que alcanza la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pBBR5P_N) cuando crece usando como única fuente de carbono compuestos no aromáticos como el piruvato. Por otro lado, cuando ambas cepas fueron cultivadas en condiciones aeróbicas con piruvato o con piruvato y benzoato no se obtuvo actividad β -galactosidasa en ningún caso (datos no mostrados).

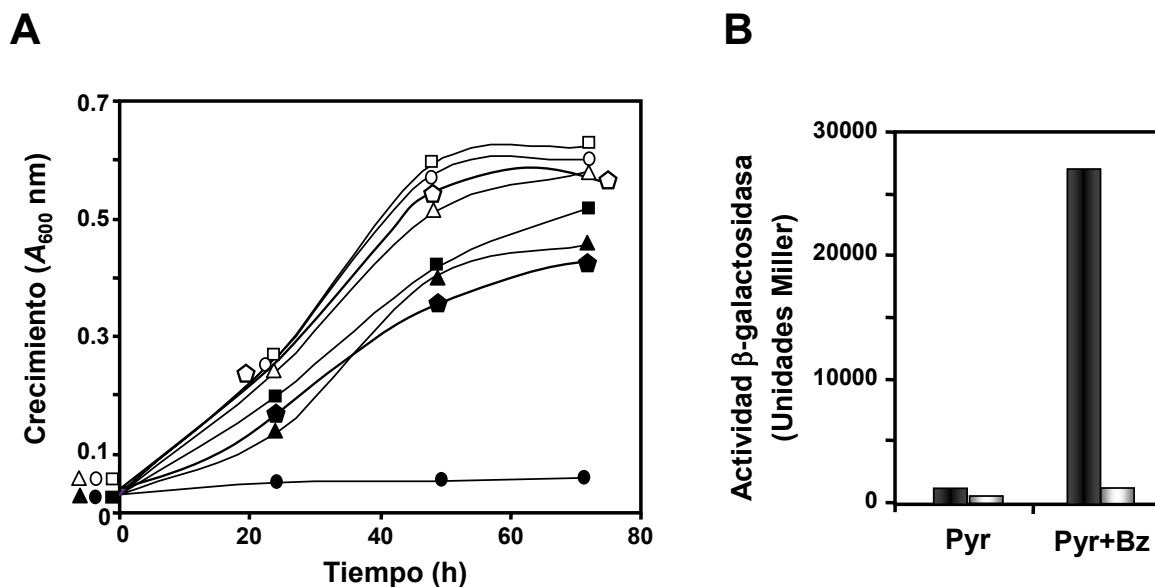


Figura 18. Efecto de las proteínas AcpR y Fnr* sobre la expresión del *cluster bzd* en *Azoarcus* sp. CIB. **(A)** Curvas de crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB (cuadrados), *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* (círculos), *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* conteniendo el plásmido pBBR1MCS-5*acpR* (triángulos), y *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* conteniendo el plásmido pIZ-Fnr* (pentágonos), cultivados todos ellos en condiciones anaeróbicas, en medio MC y utilizando como fuente de carbono succinato (símbolos blancos) o benzoato (símbolos negros). **(B)** Las cepas *Azoarcus* sp. CIB (barras negras) y *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* (barras blancas), ambas conteniendo el plásmido pBBR5P_N ($P_N::lacZ$), fueron cultivadas anaeróbicamente durante 48 horas en medio MC utilizando como fuente de carbono piruvato 0.4% (Pyr) o piruvato 0.4% más benzoato 3 mM (Pyr+Bz). La actividad β -galactosidasa fue medida como se describe en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

Estos datos señalan al gen *acpR* como el responsable de la regulación sobreimpuesta (activación) dependiente de oxígeno del promotor P_N , siendo AcpR, por tanto, un activador esencial para la expresión de la ruta central del benzoil-CoA implicada en la degradación de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB.

1.6 La proteína Fnr de *E. coli* se comporta como un regulador de la ruta central de degradación de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB

Debido a la notable similitud entre la proteína Fnr de *E. coli* y la proteína AcpR de *Azoarcus* sp. CIB y tras haber demostrado que la proteína Fnr* es capaz de actuar como un activador transcripcional del promotor P_N cuando es expresada en *E. coli*, se llevó a cabo otro estudio con el fin de comprobar si Fnr* podría ejercer el papel de AcpR en *Azoarcus* sp. CIB. Para ello, se expresó el gen *fnr**, clonado bajo el control del promotor *Ptac* en el plásmido pIZ-Fnr* (Tabla 5), en la cepa *Azoarcus* sp. CIB*dacpR*. Mientras que la cepa *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* no fue capaz de crecer en condiciones anaeróbicas utilizando benzoato como fuente de carbono, la cepa *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* (pIZ-Fnr*) mostró una curva de crecimiento similar a la obtenida con la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 18A). Con el fin de confirmar el resultado y demostrar la acción directa de Fnr* sobre el promotor P_N , se expresó el gen *fnr** desde el plásmido pIZ-Fnr* en la cepa *Azoarcus* sp. CIB *lacZ* y se midieron los niveles de actividad β -galactosidasa en cultivos anaeróbicos en presencia de piruvato, donde no se obtuvieron valores significativos de actividad, o en presencia de piruvato más benzoato, donde se alcanzaron valores significativos de actividad (2700 U. Miller). Se obtuvieron resultados similares cuando se cultivaron las mismas cepas aeróbicamente.

Estos resultados indicaban que la proteína Fnr* era capaz de complementar eficazmente la ausencia de la proteína AcpR, funcionando así como un regulador transcripcional esencial para la expresión de los genes *bzd* en *Azoarcus* sp. CIB. Además, el activador heterólogo Fnr*, a diferencia del regulador nativo AcpR, permitía también la expresión de los genes *bzd* cuando *Azoarcus* sp. CIB se cultivaba aeróbicamente en presencia de benzoato.

Objetivo 2. Estudio del promotor P_R del gen $bzdR$ y su implicación en la regulación de la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Con el fin de ampliar el conocimiento acerca de la regulación del *cluster bzd*, se decidió estudiar la regulación del gen $bzdR$, controlado por el promotor P_R .

2.1 BzdR autorregula su expresión

Con el fin de completar la caracterización de la regulación de la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB, se llevó a cabo un estudio sobre la posible regulación de P_R , el promotor del gen $bzdR$, por la proteína BzdR. Para ello, se estudió la actividad del promotor P_R en un fondo genético en el que BzdR estuviera ausente. Esto se realizó mediante la fusión del promotor P_R al gen $lacZ$ en el plásmido pBBR5 P_R ($P_R::lacZ$) (Tabla 5), con el que fueron transformadas las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIB $dbzdR$, una cepa mutante cuyo gen $bzdR$ se encuentra interrumpido. Valorando la actividad β -galactosidasa de ambas cepas cultivadas en benzoato, succinato o benzoato más succinato, se observó que en todas las fuentes de carbono ensayadas los niveles de expresión de la fusión $P_R::lacZ$ en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB $dbzdR$ eran similares a los obtenidos con la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB cultivada en benzoato (condiciones de inducción), y superiores a los obtenidos con esta misma cepa cultivada en presencia de succinato (Fig. 19), lo que sugería que la proteína BzdR estaba implicada en la represión de su propio promotor P_R .

Por otro lado, puesto que el benzoil-CoA es la molécula inductora de la expresión del promotor P_N mediante su unión a la proteína BzdR (Barragán *et al.*, 2005), se estudió su posible papel como inductor en la regulación del promotor P_R . Para ello, se midió la expresión de la fusión $P_R::lacZ$ en la cepa *Azoarcus* sp. CIB $dbzdN$, un mutante incapaz de sintetizar benzoil-CoA y, por tanto, de crecer anaeróbicamente en benzoato, ya que posee un *cluster bzd* interrumpido por una mutación polar en el primer gen $bzdN$ (López Barragán *et al.*, 2004). Como se observa en la Figura 19, la cepa *Azoarcus* sp. CIB $dbzdN$ (pBBR5 P_R) cultivada en succinato o en succinato más benzoato, muestra los mismos niveles de actividad del promotor P_R que los niveles mostrados por la cepa silvestre *Azoarcus* sp. CIB (pBBR5 P_R) cultivada en presencia de succinato. Sin embargo, dichos niveles fueron unas dos veces más bajos que los niveles de actividad de P_R obtenidos en la cepa silvestre cultivada en benzoato o en benzoato más succinato,

lo que indica que el regulador BzdR deja de ejercer su papel represor sobre el promotor P_R cuando las células crecen en presencia de benzoato y se sintetiza benzoil-CoA.

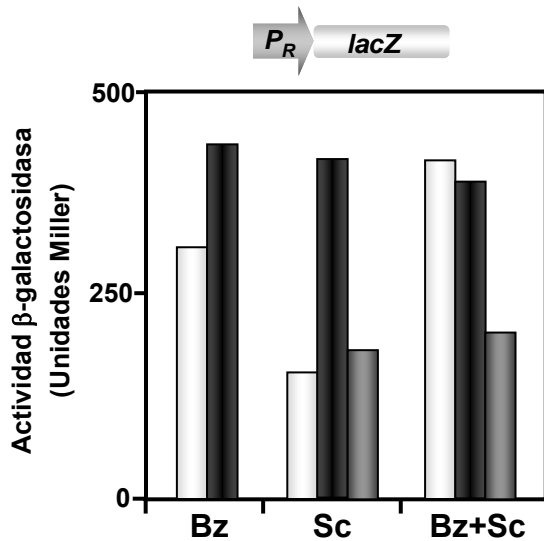


Figura 19. Actividad del promotor P_R en presencia de diferentes fuentes de carbono.

Actividad β -galactosidasa de las cepas *Azoarcus* sp. CIB (barras blancas), *Azoarcus* sp. CIBdbzdR (barras negras) y *Azoarcus* sp. CIBdbzdN (barras grises) conteniendo el plásmido pBBR5P_R ($P_R::lacZ$). Las células fueron cultivadas anaerómicamente hasta la mitad de la fase exponencial en medio MC y utilizando como fuente de carbono benzoato 3 mM (Bz), succinato 7.5 mM (Sc) o benzoato 3 mM más succinato 7.5 mM (Bz+Sc). La actividad β -galactosidasa fue medida como se describe en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos *in vivo* se llevaron a cabo una serie de ensayos *in vitro*. En primer lugar, se estableció el sitio de inicio de la transcripción del promotor P_R mediante la técnica de extensión del cebador, a partir de RNA mensajero aislado de células de la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pBBR5P_R) cultivadas en benzoato. El inicio de la transcripción fue localizado 39 nucleótidos en posición 5' *upstream* del codón ATG de iniciación de la traducción del gen *bzdR* (Figs. 20 y 21). Se establecieron como posibles cajas de interacción con la subunidad σ^{70} de la RNAP la secuencia -10 (CACTAT) y -35 (TTGCAA), separadas por 17 pb (Fig. 21).

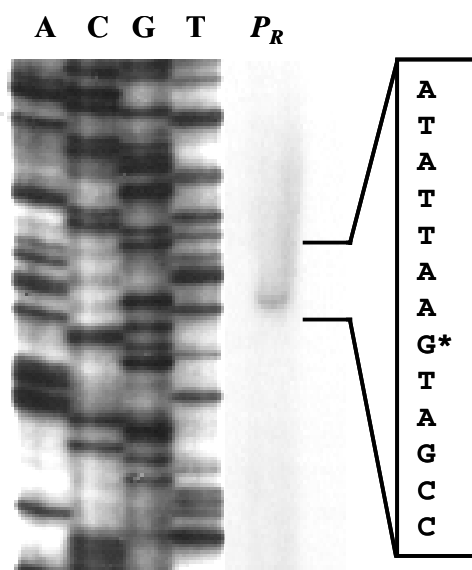


Figura 20. Identificación del sitio de inicio de la transcripción (+1) en el promotor P_R .

El RNA total fue aislado de la cepa *Azoarcus* sp. CIB portadora del plásmido pBBR5P_R ($P_R::lacZ$), cultivada anaerómicamente en benzoato, tal y como se detalla en el apartado 3.4.1 de Materiales y Métodos. El tamaño del fragmento obtenido (calle P_R) fue determinado mediante su comparación con la reacción de secuenciación del promotor P_R (calles A, C, G y T). La reacción de extensión del cebador y las reacciones de secuenciación del promotor P_R fueron realizadas con el oligonucleótido Lac57 (Tabla 6), como se describe en el apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos. A la derecha del gel se muestra la secuencia de nucleótidos que flanquea la posición +1 (asterisco), en la hebra no codificante del promotor P_R .

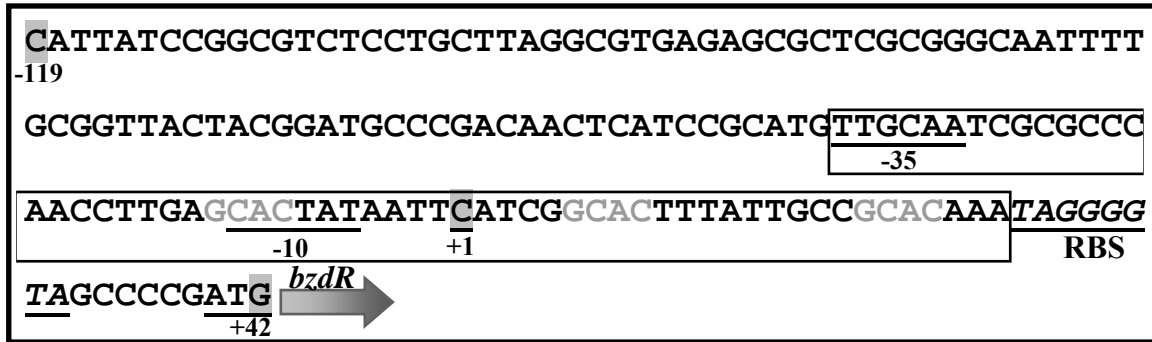


Figura 21. Secuencia de nucleótidos del promotor P_R . Secuencia del promotor P_R desde la posición -119 a la +42. Ha sido subrayada la posición +1, las cajas -10 y -35 de reconocimiento de la RNAP, la región de unión del ribosoma (RBS) y el codón de iniciación (ATG) del gen *bzdR*. Por otro lado, ha sido recuadrada la región del promotor protegida por la proteína BzdR, que se extiende desde la posición -33 a la posición +25, resaltando en gris claro las tres repeticiones GCAC.

Con el fin de determinar la capacidad represora de BzdR sobre el promotor P_R , se llevaron a cabo ensayos de transcripción *in vitro* con la proteína BzdR purificada y la RNAP de *E. coli*, usando como molde de transcripción el plásmido pJCD- P_R (Tabla 5), que contiene al promotor P_R transcribiendo un RNAm de 242 nt. Como se observa en la Figura 22, la actividad del promotor P_R , medida en base a la formación del transcrito esperado de 242 nt, fue inhibida cuando se añadían concentraciones crecientes de proteína BzdR. Sin embargo, al añadir cantidades crecientes de benzoil-CoA a la mezcla de reacción, la actividad del promotor P_R se recuperaba, indicando así su acción inductora sobre este promotor.

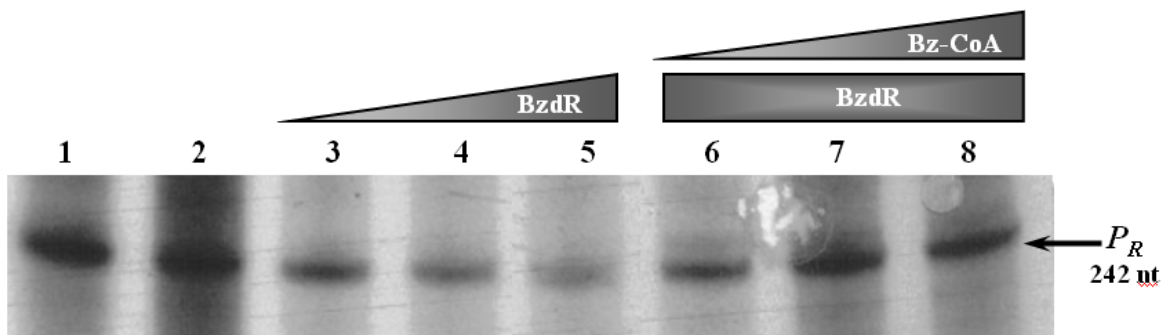


Figura 22. Efecto de la proteína BzdR y el benzoil-CoA sobre la actividad *in vitro* del promotor P_R . Se llevaron a cabo reacciones de transcripción *in vitro* utilizando como molde el plásmido pJCD- P_R (Tabla 5), que incorpora el promotor P_R , el cual expresa un RNAm de 242 nucleótidos (P_R). Las reacciones se llevaron a cabo, tal y como se indica en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos, con RNAP 50 nM de *E. coli* en ausencia de la proteína His₆-BzdR (calle 2) o en presencia de concentraciones crecientes de ésta, 50 nM (calle 3), 100 nM (calle 4) ó 200 nM (calle 5). En las calles 6-8 se mantuvo la proteína His₆-BzdR a una concentración de 200 nM y además se añadió benzoil-CoA (Bz-CoA) a concentraciones crecientes, 0.5, 1 y 2 mM, respectivamente. En la calle 1 se añadió, a modo de control, proteína His₆-BzdR 200 nM inactivada por calor.

En conclusión, los resultados obtenidos mediante ensayos *in vitro* confirmaban los resultados *in vivo*, y revelaban que BzdR autorregula su propia expresión.

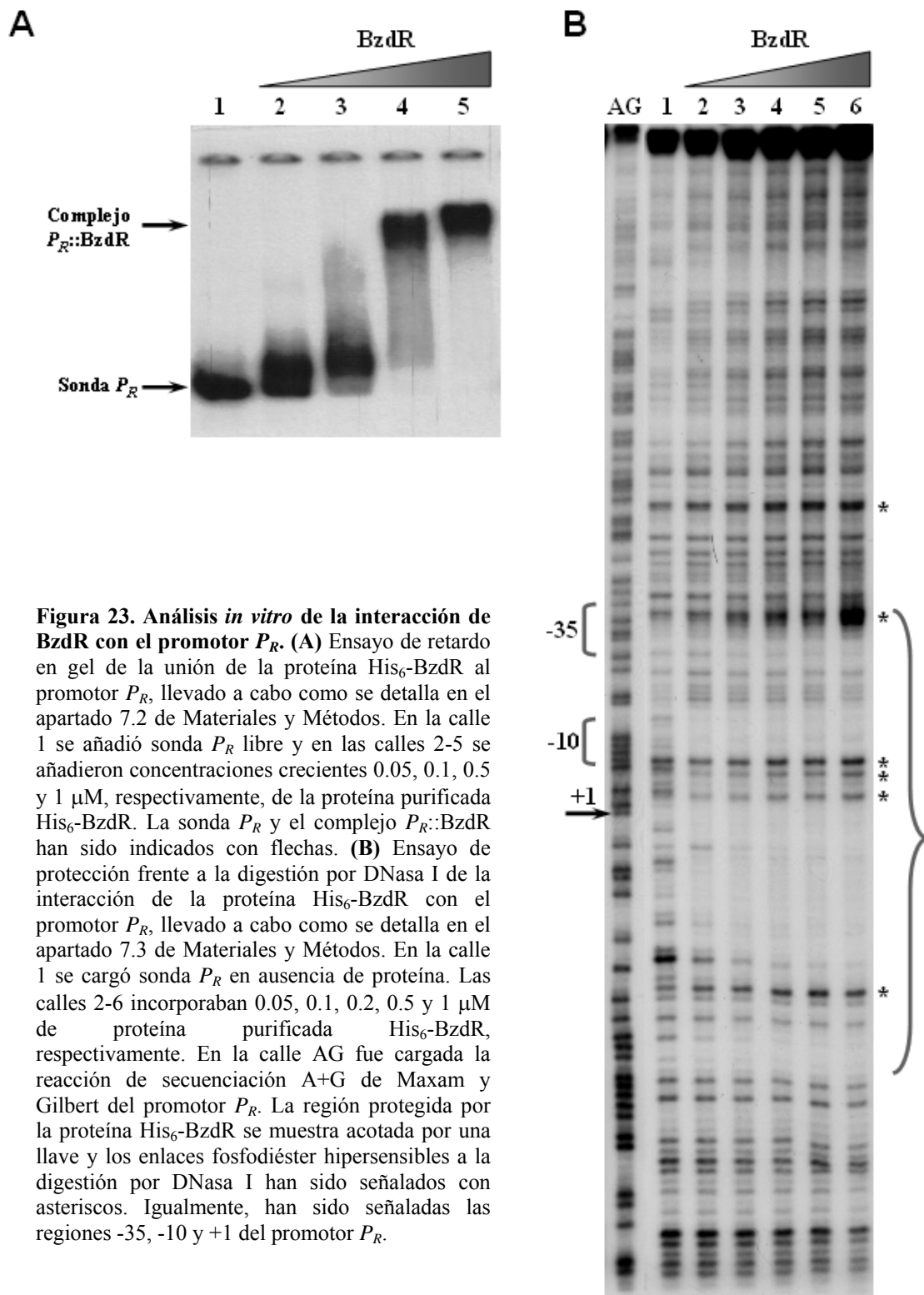


Figura 23. Análisis *in vitro* de la interacción de BzdR con el promotor P_R . (A) Ensayo de retardo en gel de la unión de la proteína His₆-BzdR al promotor P_R , llevado a cabo como se detalla en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. En la calle 1 se añadió sonda P_R libre y en las calles 2-5 se añadieron concentraciones crecientes 0.05, 0.1, 0.5 y 1 μ M, respectivamente, de la proteína purificada His₆-BzdR. La sonda P_R y el complejo $P_R::BzdR$ han sido indicados con flechas. (B) Ensayo de protección frente a la digestión por DNasa I de la interacción de la proteína His₆-BzdR con el promotor P_R , llevado a cabo como se detalla en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos. En la calle 1 se cargó sonda P_R en ausencia de proteína. Las calles 2-6 incorporaban 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 y 1 μ M de proteína purificada His₆-BzdR, respectivamente. En la calle AG fue cargada la reacción de secuenciación A+G de Maxam y Gilbert del promotor P_R . La región protegida por la proteína His₆-BzdR se muestra acotada por una llave y los enlaces fosfodiéster hipersensibles a la digestión por DNasa I han sido señalados con asteriscos. Igualmente, han sido señaladas las regiones -35, -10 y +1 del promotor P_R .

2.2 Caracterización de la interacción BzdR- P_R

Con el fin de caracterizar la interacción entre BzdR y el promotor P_R se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel y de protección frente a la digestión con DNasa I. Como se aprecia en el ensayo de retardo en gel, la proteína BzdR es capaz de unirse al promotor P_R y esta interacción es dependiente de la concentración de proteína (Fig. 23A). Además, esta interacción es específica ya que se veía inhibida al añadir sonda específica no marcada a la mezcla de reacción, pero no cuando se añadía una sonda inespecífica no marcada (datos no mostrados).

Posteriormente, se identificó la región operadora reconocida por BzdR en el promotor P_R mediante ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I. En la Figura 23B se puede apreciar la región protegida por la proteína BzdR, que se extiende desde la posición -33 hasta la +25 del promotor P_R , incluyendo tres repeticiones GCAC, lo que apoya el hecho de que BzdR actúa como represor del promotor P_R ocupando las cajas -10 y -35, y la posición +1 de interacción con la RNAP (Fig.21). Los cambios originados en la estructura del promotor P_R debidos a la interacción con la proteína BzdR, se ponen también de manifiesto con la aparición de regiones de hipersensibilidad a la digestión con DNasa I (Fig. 23B).

2.3 Papel del oxígeno en la expresión del gen *bzdR*

Tras haber establecido previamente el papel del oxígeno en la regulación del promotor P_N (Objetivo 1 de Resultados), se planteó qué papel jugaba el oxígeno en la expresión del gen *bzdR*. En primer lugar, se midió la actividad del promotor P_R en la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pBBR5 P_R) cultivada en condiciones aeróbicas o anaeróbicas en medio mínimo con benzoato. Tal y como se puede observar en la Figura 24, el oxígeno no parece jugar un papel especialmente relevante en la actividad del promotor P_R . Para confirmar este resultado, se midió la expresión del promotor P_R en la cepa *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* (pBBR5 P_R), cuyo gen *acpR* se encuentra interrumpido impidiendo así que pueda crecer anaeróticamente en benzoato. Cuando dicha cepa fue cultivada anaeróticamente utilizando succinato como fuente de carbono, los valores de actividad β -galactosidasa asociados a la fusión $P_R::lacZ$ fueron muy similares a los obtenidos con la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pBBR5 P_R) cultivadas en las mismas condiciones (Fig. 24). Atendiendo a estos resultados, todo parece indicar que el promotor P_R no se encuentra sujeto a ningún tipo de regulación mediada por oxígeno ni por la proteína AcpR.

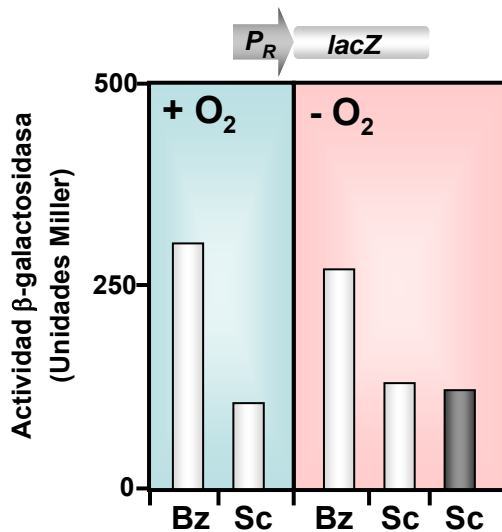


Figura 24. Expresión del promotor P_R en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Actividad β -galactosidasa de las cepas *Azoarcus* sp. CIB (barras blancas) o *Azoarcus* sp. CIB $dacpR$ (barra gris) conteniendo el plásmido pBBR5 P_R ($P_R::lacZ$) cultivadas aeróbicamente (fondo azul) o anaeróbicamente (fondo rosa) hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento en medio MC y utilizando como fuente de carbono benzoato 3 mM (Bz) o succinato 7.5 mM (Sc). La actividad β -galactosidasa fue medida como se describe en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

2.4 Papel de fuentes de carbono adicionales en la expresión del gen *bzdR*

Con el fin de estudiar la posible regulación del promotor P_R mediada por otras fuentes de carbono (represión catabólica), se midió su actividad en la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pBBR5 P_R) cultivada en diversas condiciones. La actividad del promotor P_R observada cuando la cepa fue cultivada en benzoato o en benzoato más succinato fue muy similar, y casi dos veces superior a la actividad obtenida cuando la cepa fue cultivada en succinato como única fuente de carbono (Fig. 19), lo que sugería que el gen *bzdR* no estaba sometido a represión catabólica por succinato.

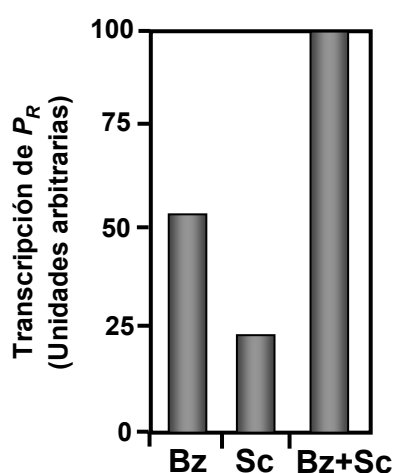


Figura 25. Actividad del promotor P_R en *Azoarcus* sp. CIB medida por RT-PCR en tiempo real. Las células de *Azoarcus* sp. CIB se cultivaron anaeróbicamente en medio MC conteniendo benzoato 3 mM (Bz), succinato 7.5 mM (Sc) o benzoato 3 mM más succinato 7.5 mM (Bz+Sc). La actividad del promotor P_R se valoró mediante un ensayo de RT-PCR en tiempo real, tal y como se detalla en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. Los niveles de transcrito de P_R se indican como un porcentaje del valor obtenido en las células cultivadas en benzoato más succinato (Bz+Sc). Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

Con el fin de confirmar este resultado y descartar algún tipo de regulación post-transcripcional del gen *lacZ*, se valoraron los niveles del transcrito *bzdR* en *Azoarcus* sp. CIB. Para ello, se aisló RNA de la cepa *Azoarcus* sp. CIB cultivada en succinato,

benzoato o succinato más benzoato, y se realizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real con el gen *bzdR*. Como se observa en la Figura 25, los datos obtenidos mediante RT-PCR confirmaron los resultados obtenidos previamente mediante ensayos β -galactosidasa, lo que indica claramente que la expresión del gen *bzdR* no está sujeta a represión catabólica mediada por un ácido orgánico como el succinato y se produce a nivel transcripcional.

La producción de la proteína BzdR en el citoplasma de *Azoarcus* sp. CIB cultivado anaeróbicamente en distintas fuentes de carbono se monitorizó mediante ensayos de *Western Blot* con extractos celulares utilizando anticuerpos anti-BzdR (Fig. 26). Estos experimentos mostraron la existencia de unos niveles basales de proteína BzdR en condiciones de no inducción (crecimiento en piruvato o succinato) que se incrementaban aproximadamente al doble en células cultivadas en benzoato (condiciones de inducción) y no se veían disminuidos cuando las células crecían en presencia simultánea de benzoato y succinato o benzoato y piruvato (Fig. 26).

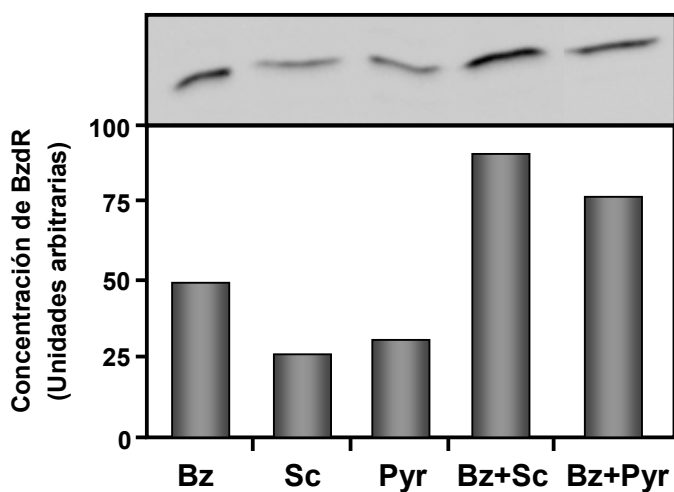


Figura 26. Niveles de proteína BzdR en *Azoarcus* sp. CIB cultivado en diferentes fuentes de carbono. La cepa *Azoarcus* sp. CIB fue cultivada anaeróbicamente en las fuentes de carbono indicadas en la figura: benzoato (**Bz**), succinato (**Sc**), piruvato (**Pyr**), benzoato más succinato (**Bz+Sc**) y benzoato más piruvato (**Bz+Pyr**). Se recogieron las células a una densidad óptica de 0.2, se obtuvieron extractos celulares y se llevaron a cabo ensayos de *Western Blot* con anticuerpos anti-BzdR, tal y como se indica en el apartado 5.3 de Materiales y Métodos. El diagrama de barras indica la intensidad de cada una de las bandas obtenidas en el *Western Blot*.

De nuevo, estos resultados confirmaban que los niveles del regulador BzdR en la célula no están sometidos a fenómenos de represión catabólica por fuentes de carbono preferentes para *Azoarcus* sp. CIB.

Por último, cabe destacar que, a diferencia del promotor P_R , el promotor catabólico P_N sí se encuentra sometido a una clara represión catabólica por ácidos orgánicos, tales como el succinato (Fig. 27).

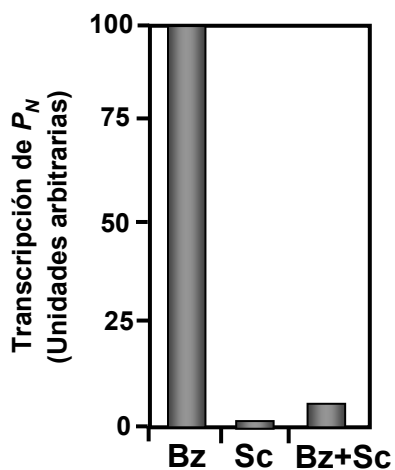


Figura 27. Represión catabólica del promotor P_N por succinato en *Azoarcus* sp. CIB. Las células de *Azoarcus* sp. CIB se cultivaron anaeróbicamente en medio MC conteniendo benzoato 3 mM (**Bz**), succinato 7.5 mM (**Sc**) o benzoato 3 mM más succinato 7.5 mM (**Bz+Sc**), hasta que los cultivos alcanzaron la mitad de la fase exponencial. La actividad del promotor P_N se valoró mediante un ensayo de RT-PCR en tiempo real, tal y como se detalla en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. Los niveles de transcrito de P_N se indican como un porcentaje del valor obtenido en las células cultivadas en benzoato (**Bz**). Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

En conclusión, el promotor P_R no está sometido a una regulación sobreimpuesta mediada por oxígeno ni a represión catabólica, como sucede con el promotor P_N , estando sometido únicamente a la regulación mediada por el regulador BzdR, el cual, si bien se une con una afinidad 10 veces menor a este promotor respecto del promotor P_N , controla de este modo los niveles de su propia expresión mediante un sistema de *feedback* negativo.

Objetivo 3. Estudio funcional y estructural de la proteína BzdR

La proteína BzdR constituye el primer represor transcripcional descrito entre los reguladores transcripcionales de rutas de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos, cuyo inductor es un derivado CoA aromático, el benzoil-CoA, y representa el prototipo de una nueva subfamilia de reguladores transcripcionales en procariotas que no se ha estudiado hasta la fecha (Barragán *et al.*, 2005). Con el fin de profundizar en el estudio de las relaciones estructura/función del regulador BzdR, se llevaron a cabo una serie de abordajes experimentales que se exponen a continuación.

3.1 Estudios sobre la estructura nativa de la proteína BzdR

Como se ha indicado en el apartado 3.1.2 de Introducción, la proteína BzdR posee una arquitectura modular consistente en un dominio N-terminal (NBzdR), probablemente implicado en la unión a DNA, y un dominio C-terminal (CBzdR) que podría mediar la interacción con la molécula efectora, benzoil-CoA.

La significativa similitud de secuencia entre el dominio NBzdR y la proteína reguladora SinR de *Bacillus subtilis* (34%), y entre el dominio CBzdR y la siquimato quinasa I de *E. coli* (23%), respectivamente, permitió proponer un modelo de la estructura tridimensional de ambos dominios de la proteína BzdR (Barragán *et al.*, 2005). Con el fin de confirmar experimentalmente el modelo propuesto, se iniciaron distintos estudios estructurales de la proteína BzdR.

3.1.1 Hiperproducción de la proteína BzdR e intentos de cristalización

Para intentar determinar la estructura tridimensional de la proteína BzdR mediante cristalización y difracción de rayos X, se procedió inicialmente a la hiperproducción de la proteína His₆-BzdR en la cepa *E. coli* M15 pREP4 (Tabla 4) y a su purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni-NTA, tal y como se detalla en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos. De esta manera, se logró obtener proteína His₆-BzdR purificada a concentraciones de 5-11 mg/ml. Sin embargo, estas muestras de proteína eran obtenidas tras la elución de la columna cromatográfica con imidazol 1 M, por lo cual fue necesario dializar las muestras para eliminar el exceso de imidazol y reducir la concentración salina, condición indispensable para llevar a cabo el posterior proceso de cristalización. Aunque se probaron hasta 20 tampones de diálisis diferentes y variaciones en el protocolo de

diálisis, retirando el imidazol de forma progresiva en 10 pases sucesivos desde 1 M hasta 10 mM, en todos los casos, cuando la concentración de imidazol descendía de 300 mM, se producía la precipitación de la proteína His₆-BzdR.

Con el fin de descartar que la tendencia a precipitar de la proteína His₆-BzdR fuera debida a los 6 residuos de histidina fusionados en su extremo N-terminal, se clonó el gen *bzdR* en el plásmido pET29-BzdR (Tabla 5), bajo el control del promotor T7 y se hiperexpresó en la cepa *E. coli* BL21(DE3). Si bien la producción de la proteína BzdR nativa fue notable en los extractos celulares, la proteína mostró ser aún más insoluble que la variante His₆-BzdR, ya que prácticamente toda la proteína se encontraba localizada en la fracción insoluble (datos no mostrados). La imposibilidad de obtener proteína BzdR soluble a elevada concentración impidió la realización de los experimentos de cristalización, y no permitió abordar el análisis de la estructura tridimensional del regulador mediante difracción de rayos X.

3.1.2 Determinación de la estructura nativa de BzdR mediante microscopía electrónica

Con objeto de obtener información acerca de la estructura nativa de BzdR, se procedió a su observación en el microscopio electrónico (ME). Como se puede apreciar en la Figura 28, la proteína BzdR pudo ser claramente detectada, llegando a obtenerse 5741 imágenes de moléculas individuales de las micrografías, que fueron analizadas tal y como se detalla en el apartado 7.7 de Materiales y Métodos.

Un primer análisis bidimensional de las imágenes mostró una posible simetría bilateral. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis tridimensional mediante métodos de refinamiento angular sin asumir previamente ninguna simetría. La estructura así obtenida reveló que la proteína BzdR estaba compuesta por dos dominios, uno mayor que otro, y presentaba una aparente simetría bilateral, a pesar de no haber asumido esta condición durante el método de refinamiento. En base a estos datos, se llevó a cabo un nuevo refinamiento de la estructura, pero en este caso imponiendo la condición de simetría bilateral, obteniendo así una estructura con una resolución de 25 Å. Además, el cálculo de la masa molecular realizado durante el proceso, asumiendo como densidad el valor medio de las proteínas (1.35 g/ml), indicó que la estructura de BzdR era compatible con un oligómero, muy probablemente con un dímero. De esta forma, se pudo reconstruir una estructura dimérica para BzdR, donde cada monómero está constituido por un dominio grande

y un dominio pequeño (Fig. 28F). Mientras que el dominio grande es probable que se corresponda con el dominio C-terminal de BzdR, debido a su mayor volumen, el dominio pequeño es probable que se corresponda con el dominio N-terminal de BzdR.

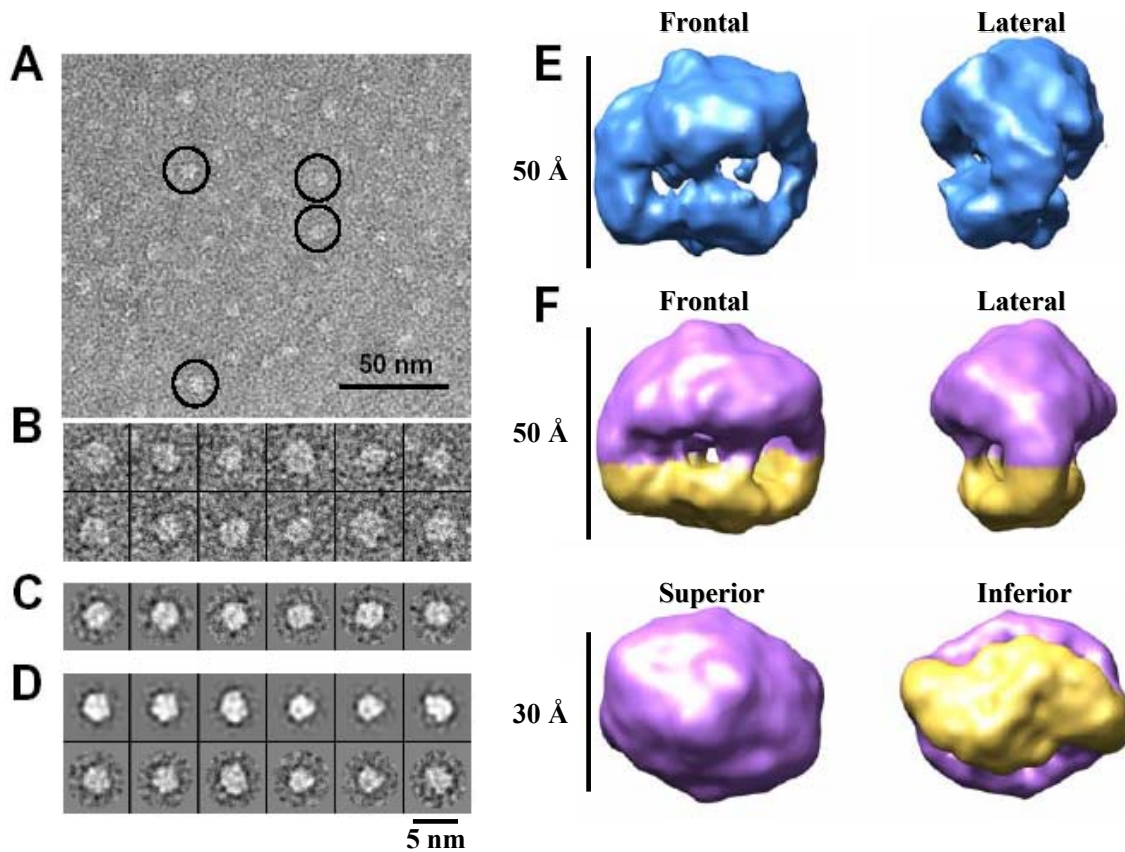


Figura 28. Estructura tridimensional de la proteína BzdR obtenida por microscopía electrónica. (A) Micrografía donde se pueden apreciar dímeros de la proteína BzdR. (B) Galería de micrografías con 12 de las 5741 imágenes recogidas de la proteína BzdR. (C) Imágenes obtenidas tras realizar una media libre de patrón entre aquellas imágenes con formas semejantes, sin asumir ningún tipo de simetría en la molécula. (D) Imágenes obtenidas tras realizar una media utilizando un método de refinamiento angular, sin asumir ningún tipo de simetría. En la fila superior se muestran diversas proyecciones de la proteína y en la fila inferior se muestran las medias obtenidas para cada una de las proyecciones superiores (E) Estructura tridimensional frontal y lateral de un dímero de BzdR obtenida sin asumir previamente ningún tipo de simetría en la reconstrucción. (F) Estructura tridimensional de un dímero de BzdR obtenida tras imponer simetría bilateral en el proceso de reconstrucción. La resolución obtenida fue de 25 Å. Se pueden observar 4 imágenes: frontal, lateral, superior e inferior (de izquierda a derecha y de arriba a abajo). El dominio de mayor tamaño (presunto CBzdR) se muestra en color morado, mientras que el de menor tamaño (presunto NBzdR) aparece en color amarillo.

3.2 La proteína BzdR está constituida por dos dominios funcionales

Con el fin de confirmar experimentalmente la estructura modular propuesta para la proteína BzdR, se procedió a la clonación, hiperexpresión y purificación independiente de los dominios NBzdR, CBzdR y del dominio NBzdR con la región *linker*, denominado NBzdRL. Para ello, dichos dominios se expresaron como proteínas de

fusión con un *tag* de 6 histidinas en su extremo N-terminal, utilizando el vector de hiperexpresión pQE32 (Tabla 5), de forma similar al método utilizado con la proteína BzdR (Fig. 29). Las proteínas His₆-NBzdR (residuos 1-90), His₆-NBzdRL (residuos 1-130) e His₆-CBzdR (residuos 131-298) fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni-NTA, tal y como se describe en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos (Fig. 29).

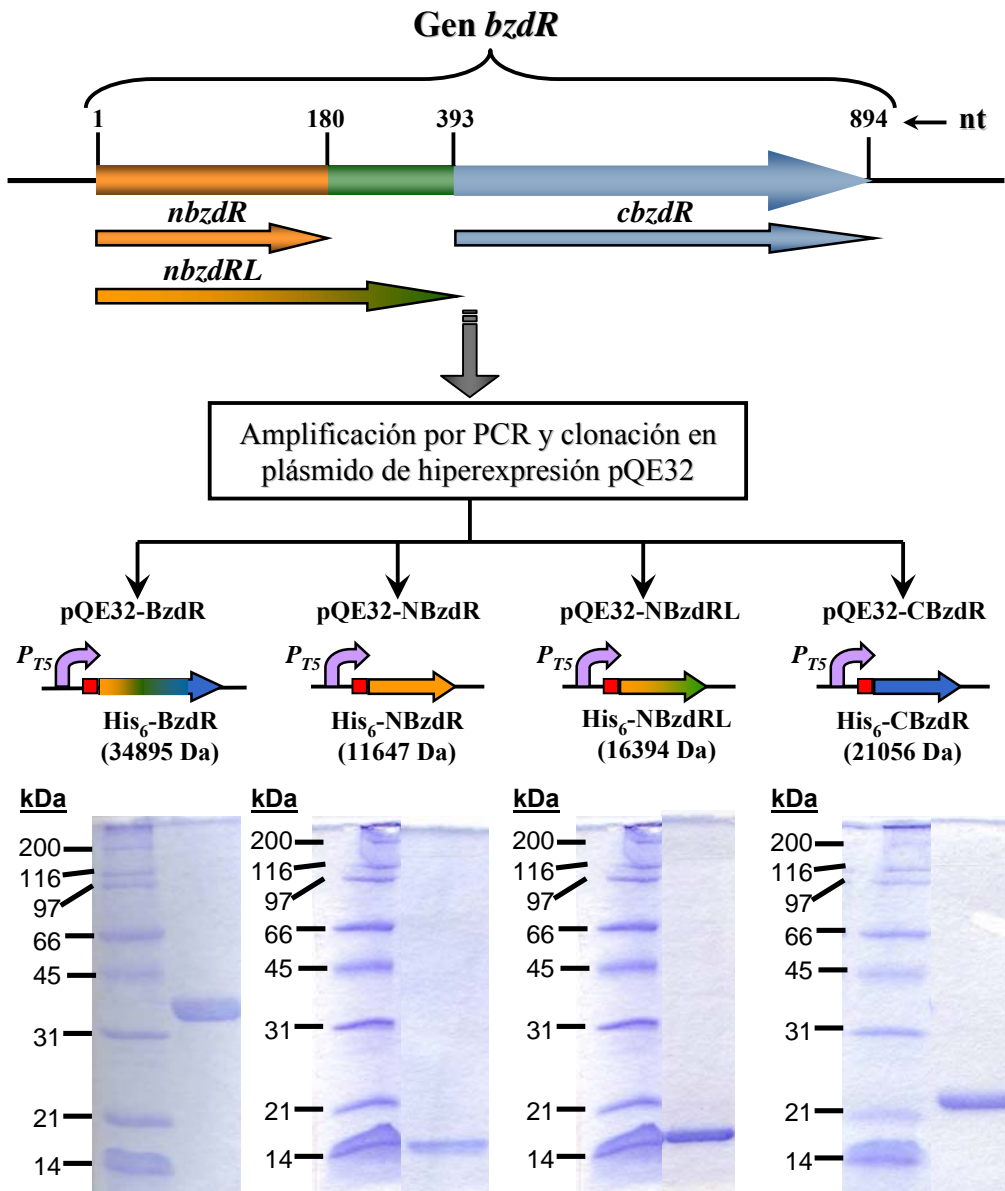


Figura 29. Esquema de la clonación del gen *bzdR* y de las regiones que codifican los dominios NBzdR, NBzdRL y CBzdR. Los dominios NBzdR, NBzdRL y CBzdR están indicados con los colores naranja, naranja + verde y azul, respectivamente. Todos ellos fueron clonados en el plásmido de hiperexpresión pQE32, bajo el control del promotor T5 (flecha violeta) y con un *tag* de 6 histidinas (rectángulo rojo) en su extremo N-terminal, como se detalla en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos. Se han indicado entre paréntesis las masas moleculares teóricas de cada una de las proteínas. En la zona inferior de la figura se muestran las proteínas purificadas, con los respectivos patrones de tamaño a la izquierda (en kDa), en SDS-PAGE al 12.5 y al 15%.

Se pudo observar que ambos dominios, especialmente CBzdR, parecían ser más solubles que la proteína completa. Por ello, se intentó retomar la cristalización de ambos dominios por separado. Por un lado, se intentó purificar a gran escala NBzdR y NBzdRL, pero en ambos casos surgió el mismo problema ocurrido con BzdR, y las proteínas precipitaban al ser eliminado el imidazol durante el proceso de diálisis. Por otro lado, también se tuvo éxito en la purificación a gran escala del dominio CBzdR hasta el punto de obtener concentraciones cercanas a 50 mg/ml. Además, en este caso se logró eliminar el imidazol y reducir la concentración salina manteniendo la proteína soluble, logrando así unas condiciones óptimas de cristalización. Sin embargo, se probaron más de 500 condiciones de cristalización mediante el método de gota invertida y en ningún caso se obtuvieron cristales con la calidad adecuada para permitir su estudio cristalográfico. Estos resultados sugieren que la cristalografía no parece ser el mejor método para elucidar la estructura tridimensional de este regulador transcripcional.

3.2.1 Estudio del dominio NBzdR

3.2.1.1 El dominio NBzdR se une y reprime al promotor P_N

Para verificar si la proteína NBzdR es un verdadero dominio funcional y mantiene su capacidad de reprimir la transcripción del promotor P_N se realizaron abordajes *in vitro* e *in vivo* de interacción con P_N utilizando NBzdR y NBzdRL (Fig. 29). La utilización de estas dos variantes tuvo como objetivo determinar la influencia del *linker* tanto en el proceso de dimerización como en la interacción con el DNA. Los ensayos *in vitro* de retardo en gel demostraron la capacidad de ambas proteínas, NBzdR y NBzdRL, de unirse al promotor P_N (Fig. 30A). Sin embargo, también se pueden apreciar ciertas diferencias en relación a la afinidad por la sonda P_N , ya que con la proteína NBzdR es necesario alcanzar una concentración de 100 nM para retardar totalmente la sonda P_N , mientras que con NBzdRL o con BzdR se observa un retardo casi total de la sonda a una concentración de 50 nM. Otra notable diferencia entre la proteína parental BzdR y el dominio NBzdR es el número de complejos proteína-DNA formados. Mientras que la proteína BzdR da lugar a un único complejo, tanto NBzdR como NBzdRL dan lugar a, al menos, tres complejos, lo que podría reflejar diferencias en la cooperatividad de la unión de las proteínas a las tres cajas operadoras del promotor P_N .

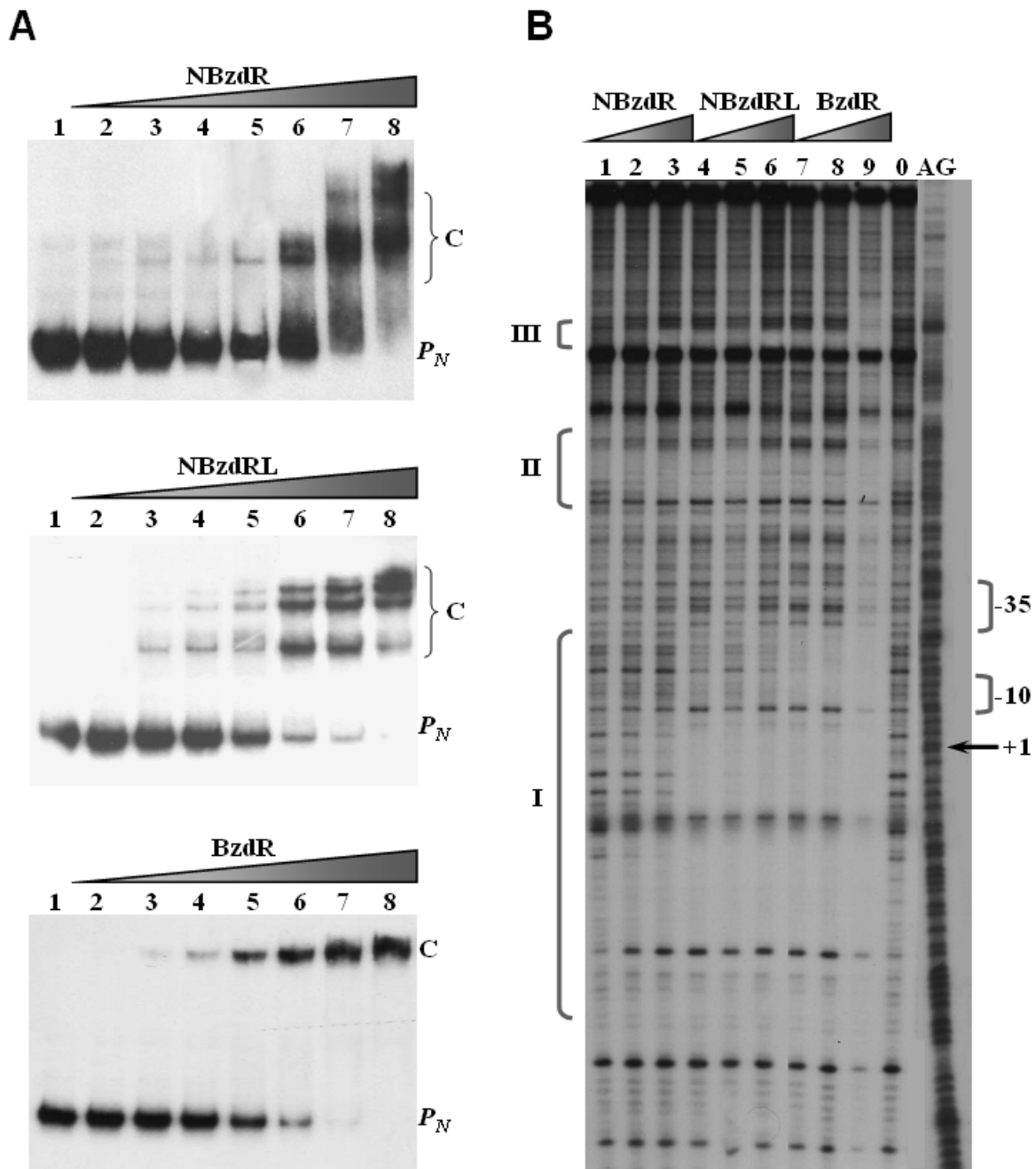


Figura 30. Unión de las proteínas purificadas NBzdR, NBzdRL y BzdR al promotor P_N . (A) Unión de las proteínas al promotor P_N mediante ensayos de retardo en gel realizados como se indica en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. En todos los casos, en la calle 1 se cargó sonda P_N obtenida como se indica en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos, y en las calles 2-8 se añadieron concentraciones crecientes 1, 2, 5, 10, 25, 50 y 100 nM, respectivamente, de las proteínas purificadas. P_N representa la sonda libre y C representa el complejo, o complejos, formados entre la proteína y el promotor P_N . (B) Ensayo de protección frente a la digestión por DNasa I realizado como se indica en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos. En la calle 0 se cargó sonda P_N en ausencia de proteínas. En las calles 1-3, 4-6 y 7-9 se añadieron 50, 100 y 200 nM de las proteínas His₆-NBzdR, His₆-NBzdRL e His₆-BzdR purificadas, respectivamente. Calle AG: reacción de secuenciación del promotor P_N mediante el método de Maxam y Gilbert. A la izquierda se indican con corchetes las tres regiones operadoras (I, II y III) protegidas por las proteínas y a la derecha las cajas -35, -10 y el +1 del promotor P_N .

Con el fin de profundizar en el estudio de la unión de NBzdR al promotor P_N se llevaron a cabo ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I. Tal y como se puede observar en la Figura 30B, la proteína NBzdR protege las mismas tres cajas operadoras descritas para BzdR (Barragán *et al.*, 2005), si bien la caja operadora I no está completamente protegida por NBzdR a las concentraciones de proteína usadas en el ensayo. Este resultado no puede ser explicado por la diferencia volumétrica entre BzdR y NBzdR, ya que la proteína NBzdRL, de volumen similar a NBzdR, fue capaz de proteger totalmente la caja operadora I, al igual que sucede con BzdR, con lo que la causa de la menor protección del operador I de P_N por NBzdR parece deberse a la ausencia del *linker* en el regulador, el cual podría estar implicado en la correcta formación de los dímeros de proteína, lo que incrementaría la afinidad por el DNA y permitiría una protección más extensa de las cajas operadoras.

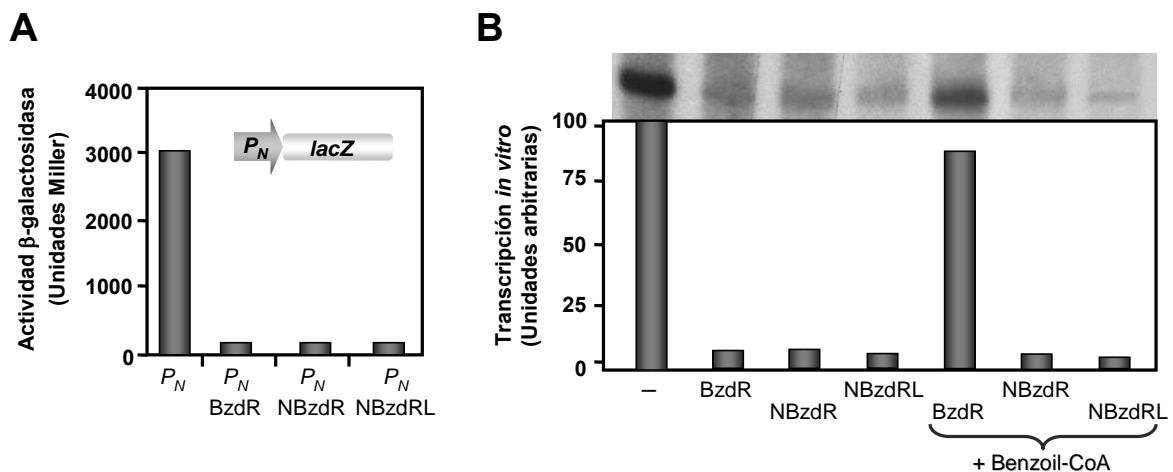


Figura 31. Represión ejercida por las proteínas NBzdR, NBzdRL y BzdR sobre el promotor P_N . (A) **Ensayos *in vivo*.** La cepa *E. coli* MC4100-T1, que incorpora en cromosoma la fusión $P_N::lacZ$ (Tabla 4), fue transformada con los plásmidos pCK01-BzdR, pCK01-NBzdR ó pCK01-NBzdRL, que expresan las proteínas His₆-BzdR, His₆-NBzdR e His₆-NBzdRL, respectivamente (Tabla 5). Las cepas fueron cultivadas en condiciones anaeróbicas y en medio LB a 30°C, hasta que alcanzaron una A_{600} de 0.5. Posteriormente, se ensayó su actividad β -galactosidasa, tal y como se detalla en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes y presentaron una desviación estándar menor del 10%. (B) **Ensayos de transcripción *in vitro* del promotor P_N .** Reacciones de transcripción *in vitro* de múltiples rondas utilizando como molde el plásmido pJCD- P_N , que incluye el promotor P_N (Tabla 5). Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en presencia de RNAP de *E. coli* 50 nM y proteína purificada His₆-Fnr* 20 nM, como se detalla en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos. Además, se añadió proteína purificada His₆-BzdR, His₆-NBzdR ó His₆-NBzdRL 40 nM, en ausencia o presencia de benzoil-CoA 2 mM, según se indica.

Los ensayos de expresión *in vivo* demostraron la capacidad de ambas proteínas, NBzdR y NBzdRL, de unirse y reprimir la actividad del promotor P_N con una efectividad similar a la obtenida con BzdR. Dichos ensayos se llevaron a cabo

midiendo la actividad β -galactosidasa de la fusión traduccional $P_N::lacZ$ en *E. coli* (Fig. 31A). Los ensayos de transcripción *in vitro* también apoyaron estos resultados, como se puede observar en la Figura 31B, donde NBzdRL muestra un nivel de represión del promotor P_N semejante al obtenido con la proteína parental BzdR. Además, se pudo demostrar que únicamente la proteína BzdR presenta la capacidad de responder al inductor, el benzoil-CoA, al contrario de lo que sucede con NBzdRL, que mantiene reprimido el promotor P_N constitutivamente al no poseer el dominio efector CBzdR que presumiblemente une benzoil-CoA. Con la proteína NBzdR se obtuvieron los mismos resultados que con NBzdRL, tal y como se puede apreciar en la Figura 31B.

Estos datos demuestran la funcionalidad del dominio NBzdR y su independencia respecto del dominio CBzdR, siendo capaz de unirse eficazmente al promotor P_N y reprimir constitutivamente su actividad.

3.2.1.2 Estado de oligomerización de BzdR y del dominio NBzdR

Con objeto de estudiar el estado de oligomerización de las proteínas BzdR, NBzdR y NBzdRL, se llevaron a cabo, como primera aproximación, ensayos de *crosslinking in vitro*, incubando cada una de las proteínas purificadas con un agente de entrecruzamiento, el glutaraldehído.

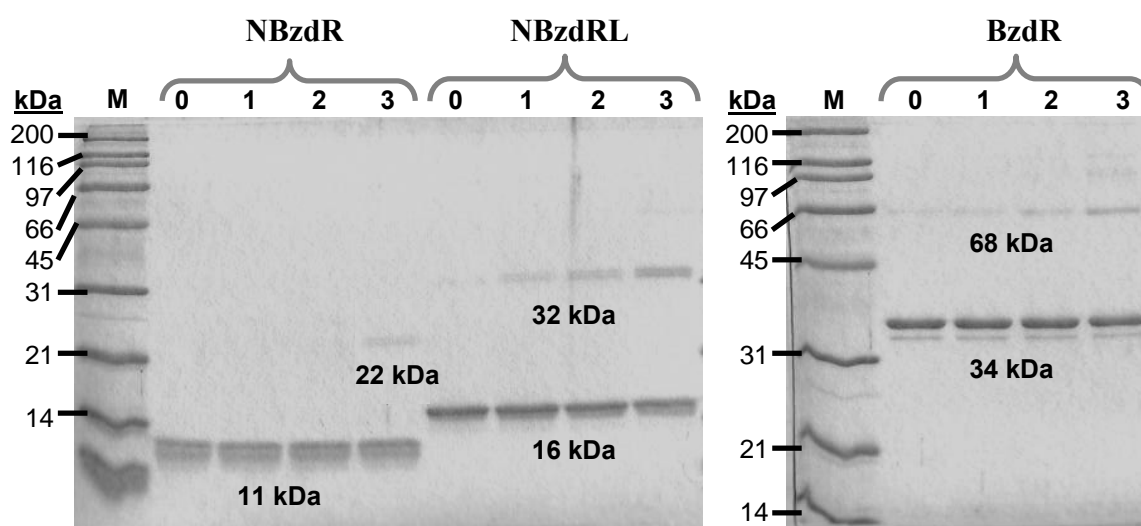


Figura 32. Ensayo de *crosslinking in vitro* con las proteínas purificadas BzdR, NBzdR y NBzdRL. El ensayo fue realizado tal y como se detalla en el apartado 5.5 de Materiales y Métodos, utilizando 5 μ M de las proteínas purificadas His₆-BzdR, His₆-NBzdR e His₆-NBzdRL. Las calles 0, 1, 2 y 3 se corresponden con muestras en presencia de glutaraldehído 0, 0.1, 0.2 y 0.5 μ M, respectivamente. En el gel se indican las masas moleculares de las formas monoméricas y diméricas de cada proteína. En la calle M se cargó un marcador de pesos moleculares, cuyos valores se indican a la izquierda. Las muestras se cargaron en SDS-PAGE al 15% (panel izquierdo) y al 12.5% (panel derecho).

Como se muestra en la Figura 32, en ausencia de glutaraldehído las tres proteínas mostraron en SDS-PAGE un tamaño compatible con su forma monomérica, i. e., BzdR 34 kDa, NBzdR 11 kDa, NBzdRL 16 kDa,. Sin embargo, cuando las proteínas son tratadas previamente con glutaraldehído se puede apreciar en SDS-PAGE una banda adicional que coincide con el tamaño esperado para la forma dimérica de cada una de ellas. Cabe destacar que las proteínas BzdR y NBzdRL eran capaces de dimerizar a concentraciones de glutaraldehído inferiores a las necesarias para obtener la misma proporción de dímero con la proteína NBzdR, lo que sugiere que ésta última presenta una menor capacidad de dimerización.

Con el fin de confirmar de una manera más precisa el estado de oligomerización de la proteína BzdR y su dominio N-terminal, se realizaron ensayos de velocidad y equilibrio de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica, tal y como se detalla en el apartado 7.5 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos (Tabla 8) mostraron especies compatibles con un dímero tanto en el caso de la proteína BzdR, como en el caso de NBzdR y NBzdRL (Fig. 33). En los tres casos, los dímeros fueron homogéneos y presentaron una forma esencialmente globular, con unos índices de fricción f/f_0 de 1.4 para BzdR, 1.5 para NBzdR y 1.6 para NBzdRL en las condiciones experimentales empleadas. Todos estos datos sugieren que tanto la proteína BzdR como el dominio NBzdR y la proteína NBzdRL, son dímeros en solución.

Tabla 8. Datos obtenidos en los experimentos de ultracentrifugación analítica. M_m representa la masa molecular y f/f_0 el coeficiente de fricción.

Proteína	M_m teórica (Da)	f/f_0	Coefficiente de sedimentación (s)	Estado de asociación compatible
BzdR	34895	1.4	4 ± 0.2	Dímero
NBzdR	11647	1.5	1.8 ± 0.2	Dímero
NBzdRL	16394	1.6	2.3 ± 0.2	Dímero
CBzdR	21056	1.5	1.8 ± 0.3	Monómero

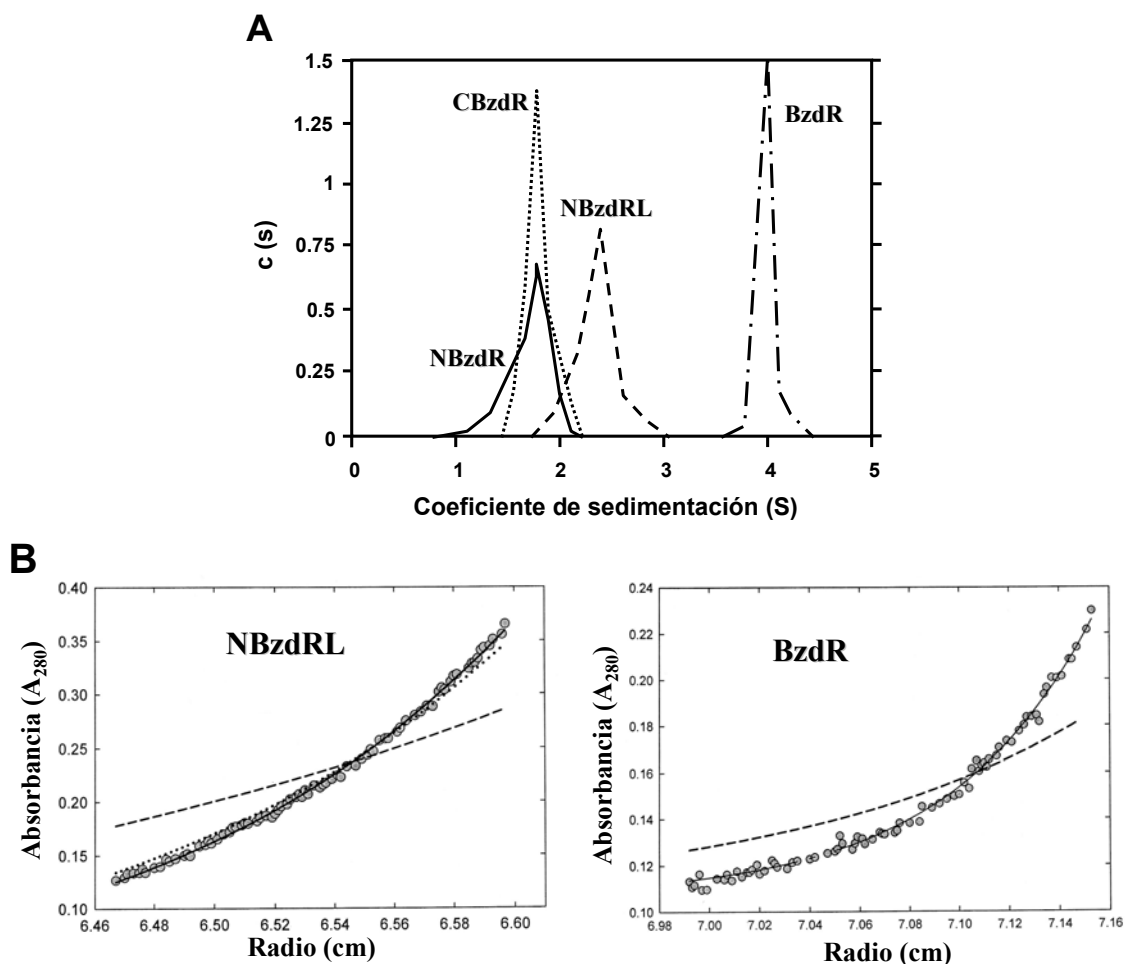


Figura 33. (A) Análisis mediante velocidad de sedimentación de las proteínas purificadas BzdR, NBzdR, NBzdRL y CBzdR. Se representa el perfil de distribución de concentraciones frente al coeficiente de sedimentación de las diferentes proteínas ensayadas. El valor del coeficiente de sedimentación obtenido para las proteínas purificadas His₆-BzdR, His₆-NBzdR, His₆-NBzdRL e His₆-CBzdR se ha representado mediante líneas de rayas y puntos, continua, de rayas y de puntos, respectivamente. **(B) Análisis mediante equilibrio de sedimentación de las proteínas purificadas NBzdRL y BzdR.** Gradiente en equilibrio de sedimentación de las proteínas His₆-NBzdRL (panel izquierdo) e His₆-BzdR (panel derecho). Los círculos representan las medidas realizadas, la línea continua que los cruza muestra el gradiente teórico correspondiente a un dímero, en cada caso, y la línea discontinua muestra el gradiente teórico correspondiente a un monómero.

3.2.2 Estudio del dominio CBzdR

Como se ha descrito en el apartado 3.1.2 de Introducción, el dominio CBzdR se ha supuesto implicado en la interacción con la molécula inductora benzoil-CoA (Barragán *et al.*, 2005). Este dominio presenta una significativa identidad en su secuencia de aminoácidos con enzimas que presentan actividad siquimato quinasa. Con el fin de obtener información acerca del contenido en estructura secundaria del dominio CBzdR, se llevaron a cabo medidas de dicroísmo circular. Para ello, se utilizó la proteína CBzdR purificada como se indica en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos. El análisis fue realizado en el intervalo de longitudes de onda entre 200-

250 nm, que permite estimar el contenido de estructura secundaria de la proteína. El análisis de los espectros mediante el conjunto de programas CDPro indica que la proteína His₆-CBzdR posee un 40% de estructura en α -hélice, un 13.5% en cadena β y un 46.5% en estructura no ordenada o irregular (Fig. 34).

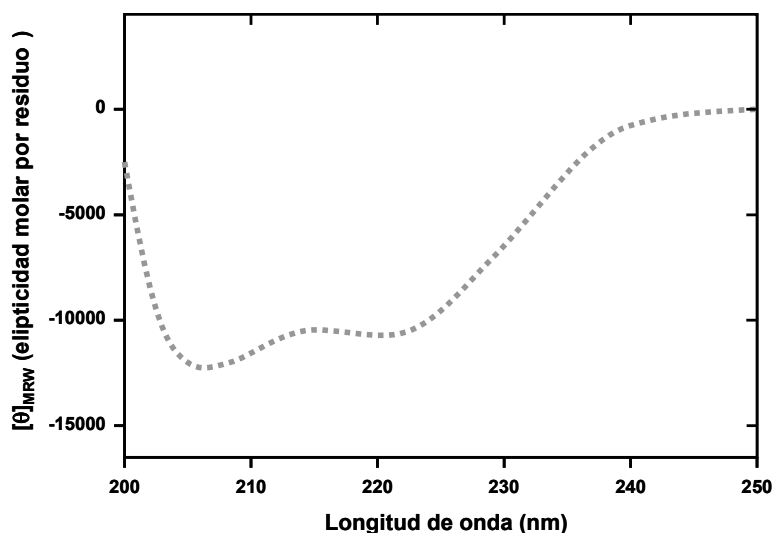


Figura 34. Espectro de diroísmo circular en el UV lejano de la proteína CBzdR. En la gráfica se representa la elipticidad molar promedio por residuo (MRW) de la proteína His₆-CBzdR en la región del UV lejano ($\lambda < 250$ nm). La muestra fue preparada en tampón Tris-HCl 20 mM pH 8.0 y KCl 100 mM, en el cual la proteína se encontraba a una concentración de 10 μ M. El espectro de diroísmo circular se obtuvo tal y como se detalla en el apartado 5.8 de Materiales y Métodos.

Además, se realizaron ensayos de velocidad y equilibrio de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica con el dominio CBzdR, tal y como se detalla en el apartado 7.5 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos mostraron una especie única compatible con un monómero (Fig. 33A y Tabla 8).

Con el fin de establecer si CBzdR presenta actividad siquimato quinasa, se ensayó dicha actividad con la proteína CBzdR y con la proteína parental BzdR purificadas, tal y como se detalla en el apartado 6.1.2 de Materiales y Métodos. En estos ensayos se utilizó la proteína siquimato quinasa I (SKI) purificada de *E. coli*, His₆-SKI, como control positivo (ver detalles sobre su hiperexpresión y purificación en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos). Como se puede apreciar en la Figura 35, mientras que la proteína SKI mostró unos valores de actividad enzimática significativos, ni la proteína CBzdR, ni la proteína parental BzdR mostraron actividad siquimato quinasa. Por otro lado, con el fin de demostrar la interacción de la proteína CBzdR con el benzoil-CoA, el inductor de la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB (Barragán *et al.*, 2005), se llevaron a

cabo ensayos de espectroscopía de fluorescencia en la región UV-visible del espectro. Para ello, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de CBzdR en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de varios ligandos, excitando las muestras a una longitud de onda de 275 nm (a la cual absorben tanto los triptófanos como las tirosinas de las proteínas).

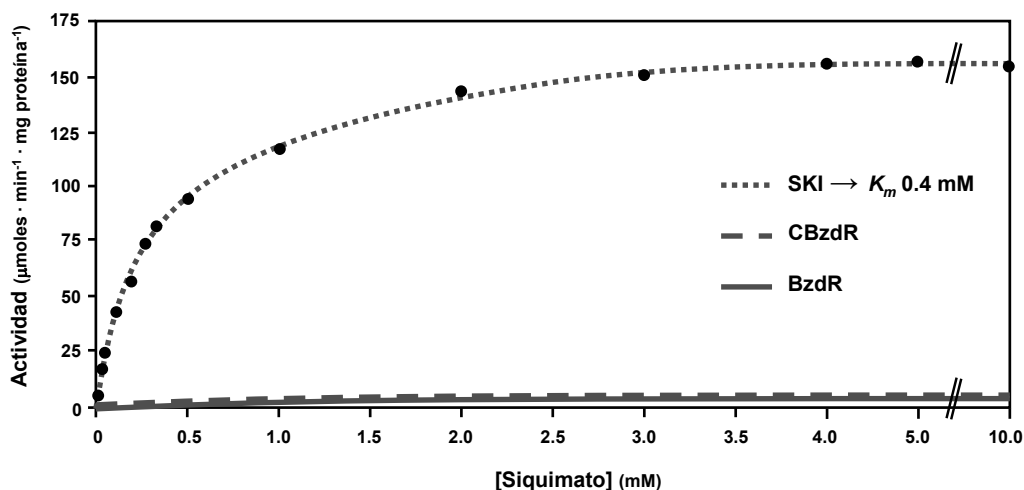


Figura 35. Actividad siquimato quinasa de las proteínas purificadas SKI, CBzdR y BzdR. El ensayo de actividad siquimato quinasa se llevó a cabo tal y como se detalla en el apartado 6.1.2 de Materiales y Métodos. Se utilizaron 14 medidas para la obtención de la curva logarítmica. En el interior de la gráfica se muestra el valor de K_m para la proteína His₆-SKI. Cada uno de los 14 puntos utilizados fue el resultado de realizar la media de tres medidas independientes, cuya desviación estándar fue menor del 10%.

Como se observa en la Figura 36, el espectro de emisión obtenido para la proteína CBzdR se vio reducido unas 5 veces cuando las medidas se realizaron en presencia de benzoil-CoA, utilizando una relación [proteína]:[ligando] de 1:30. Además, la reducción de fluorescencia iba acompañada de un desplazamiento del máximo de emisión, que pasa de 312 nm en ausencia de ligando, a 325 nm en presencia de benzoil-CoA. Estos datos sugerían la existencia de una variación notable en el entorno del Trp229 (el único existente en CBzdR), como resultado del cambio conformacional inducido por la interacción del benzoil-CoA con el dominio C-terminal de BzdR.

Cuando se emplearon otros ligandos tales como fenilacetil-CoA, CoA, ATP, benzoato y succinato, sólo se obtuvieron diferencias en el espectro de emisión en el caso del fenilacetil-CoA, CoA y ATP, y con todos ellos, la intensidad de fluorescencia se vio reducida a la mitad con respecto al espectro de la proteína en ausencia de ligandos (Fig. 36).

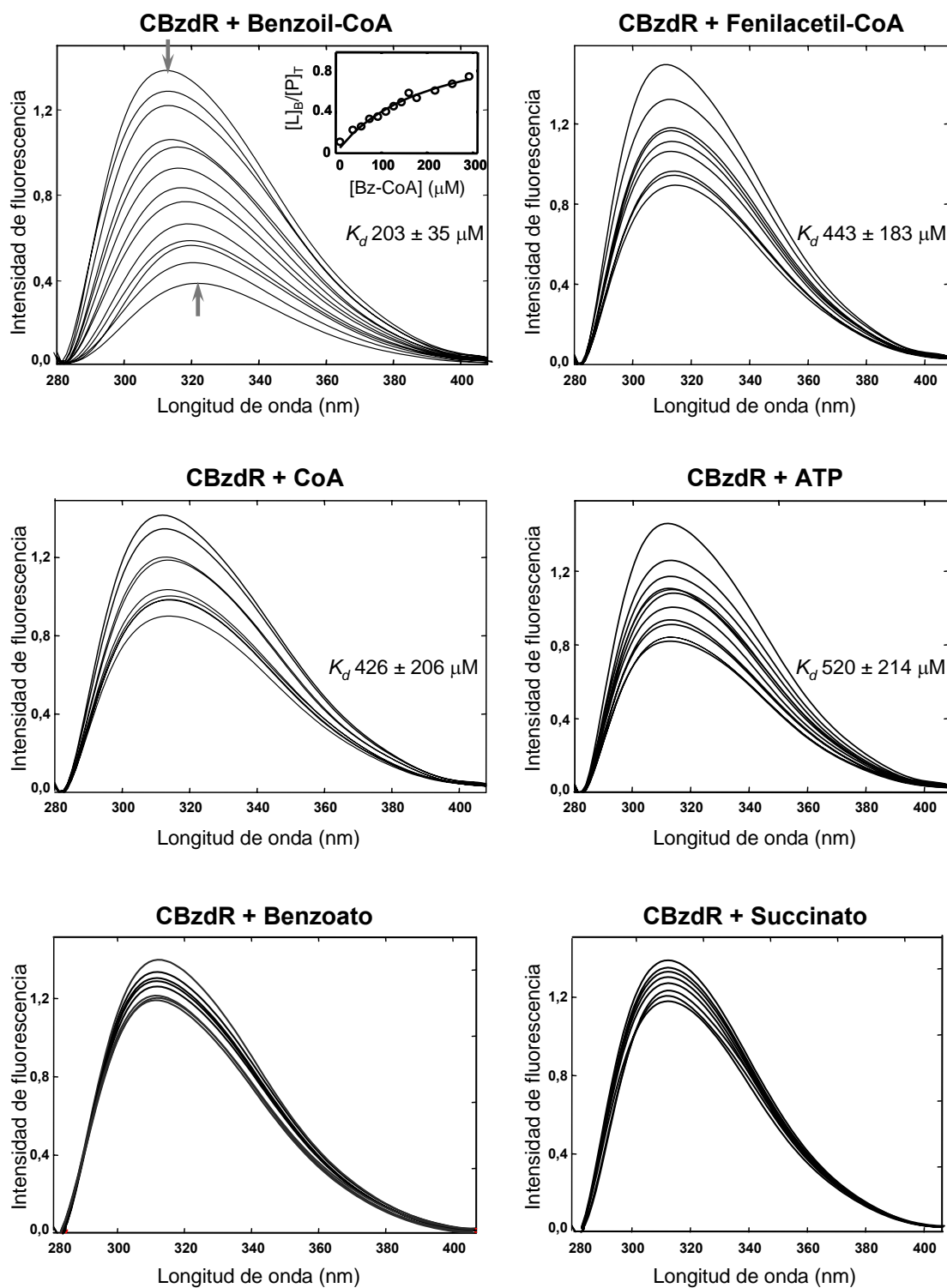


Figura 36. Interacción de la proteína CBzdR con diversos ligandos. Ensayo de espectroscopía de fluorescencia de la proteína His₆-CBzdR en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de benzoil-CoA, fenilacetil-CoA, CoA, ATP, benzoato y succinato. En todos los casos se parte de una concentración fija de proteína (10 μM) y se va incrementando la cantidad de ligando desde 0 hasta una concentración de 300 μM. En el interior de cada una de las gráficas ha sido incluido el valor obtenido para la constante de disociación (K_d), excepto en el caso del benzoato y del succinato, que no poseían afinidad. En la gráfica de interacción entre His₆-CBzdR y benzoil-CoA también se ha incluido una curva de unión que representa la relación de ligando unido (L_B) entre proteína total (P_T) frente a la concentración de ligando (Bz-CoA), la cual muestra el buen ajuste de los resultados experimentales al modelo de unión considerado. Las flechas grises indican el máximo de emisión a la mínima y máxima concentración de benzoil-CoA. Los ensayos se realizaron como se detalla en el apartado 5.7 de Materiales y Métodos.

Además, a diferencia de lo observado previamente con benzoil-CoA, en este caso no se pudo apreciar desplazamiento alguno en la longitud de onda del máximo de emisión. El ajuste de estos resultados a un modelo que supone la existencia de un único sitio de unión del ligando en la proteína, permitió calcular las constantes de disociación (K_d), para cada uno de los ligandos (Fig. 36).

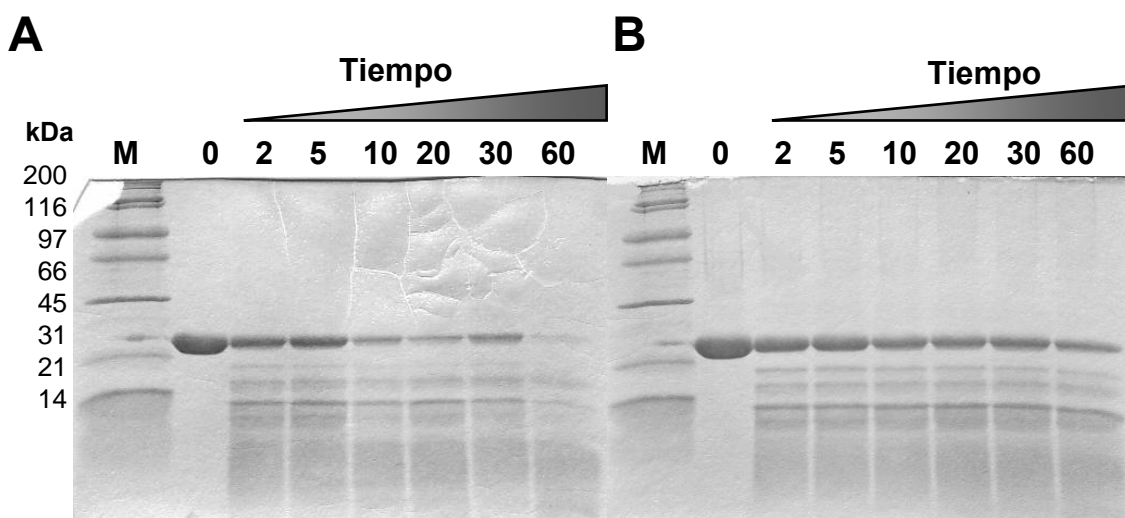


Figura 37. Ensayo de digestión con tripsina de la proteína purificada CBzdR. El ensayo fue realizado con CBzdR 10 μ M y tripsina 0.02 mg/ml, tal y como se detalla en el apartado 5.6 de Materiales y Métodos. Calles 0-60: muestras incubadas a 37°C (condiciones óptimas de la tripsina) durante 0, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos, respectivamente. Las reacciones se realizaron en ausencia (panel A) o presencia (panel B) de benzoil-CoA 2 mM. Calles M: marcadores de pesos moleculares, indicados a la izquierda en kDa. Las muestras se cargaron en SDS-PAGE al 12.5%.

Con el fin de confirmar el cambio conformacional sugerido en los experimentos anteriores, se realizaron ensayos de proteólisis limitada con tripsina (ver apartado 5.6 de Materiales y Métodos). Como se puede apreciar en la Figura 37, CBzdR mostró ser más sensible a la digestión por tripsina en ausencia de benzoil-CoA que en presencia de este ligando, lo que sugiere un cambio conformacional en CBzdR tras su interacción con el benzoil-CoA, como consecuencia del cual los aminoácidos reconocidos por la tripsina, principalmente residuos de lisina y arginina, han adquirido una nueva disposición espacial en la que son menos accesibles a la enzima proteolítica.

Todos estos resultados tomados en conjunto demostraban que el dominio CBzdR sufre un cambio conformacional como consecuencia de la unión de la molécula inductora benzoil-CoA.

3.2.3 Estudio del *linker* de la proteína BzdR (LBzdR)

3.2.3.1 Análisis estructural de la región LBzdR

Con el fin de determinar el papel del *linker* en la estructura nativa y en la función de la proteína BzdR se analizó, inicialmente, la secuencia de aminoácidos y la posible estructura de esta región (LBzdR). La secuencia de aminoácidos de LBzdR fue comparada con las estructuras tridimensionales depositadas en la base de datos PDB y se detectó una región (αA) de la formato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ de *Pseudomonas* sp. 101 (PDB: 2NAD) (Lamzin *et al.*, 1992; Tishkov *et al.*, 1991), que presentaba una identidad significativa (42%) con parte de la secuencia (21 residuos) de LBzdR (Fig. 38).

	Posición		Posición
LBzdR	95	L T L L I Q Y L S R F P P K T H E W A R	115
FDH	159	L S L V R N Y L P ----- S H E W A R K	174
		* : * : * * : * * * * * :	

Figura 38. Alineamiento de la secuencia de la región central del *linker* de BzdR (LBzdR) con la región correspondiente de la hélice αA de la formato deshidrogenasa de *Pseudomonas* sp. 101 (FDH). Los aminoácidos han sido representados mediante el código de una letra y en color rojo (apolares), verde (polares sin carga), azul (ácidos) y rosa (básicos). En la zona inferior del alineamiento, un asterisco (*) significa que los residuos de esa posición son idénticos, y dos puntos (:) significa que existen sustituciones conservadas, acordes con el código de colores mencionado anteriormente. Se recuadran en gris los residuos Glu111 y Arg114 que fueron sustituidos en las proteínas mutantes BzdR3, BzdR4 y BzdR5.

La formato deshidrogenasa es un dímero y en su estructura tridimensional se puede apreciar que las hélices αA de cada uno de los monómeros se encuentran enfrentadas en sentido paralelo (Lamzin *et al.*, 1994), sugiriéndose su implicación en la dimerización de la enzima. De este modo, se propuso una función similar para LBzdR, en cuya secuencia, asumiendo que posee una estructura semejante a la de la región αA de la formato deshidrogenasa, pueden destacarse dos aminoácidos, Glu111 y Arg114, que podrían estar formando parte de un par de puentes salinos esenciales para la dimerización (Fig. 38).

En base a esta hipótesis, se diseñaron mediante mutagénesis dirigida las proteínas mutantes BzdR3 y BzdR4, que poseen las sustituciones Glu-111-Arg y Arg-114-Glu (ver apartado 3.6 de Materiales y Métodos), las cuales deberían

ocasionar la ruptura de los supuestos puentes salinos en el dímero LBzdR de las proteínas mutantes. Por otro lado, se construyó el doble mutante BzdR5 (Glu-111-Arg y Arg-114-Glu) que, teóricamente, debería haber reconstituido los puentes salinos en el dímero LBzdR, aunque en orientación invertida respecto de la proteína parental BzdR. La hiperproducción y purificación de las proteínas mutantes se realizó de un modo similar a como se ha descrito anteriormente para la proteína BzdR y se observó que éstas presentaban una solubilidad similar a la de la proteína parental.

Cuando se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con el promotor P_N , tanto la proteína BzdR4 como BzdR5 mostraron una significativa reducción en su capacidad de unión al promotor P_N (Fig. 39). Sin embargo, la proteína BzdR3 mostró una capacidad de unión similar a la de la proteína BzdR parental.

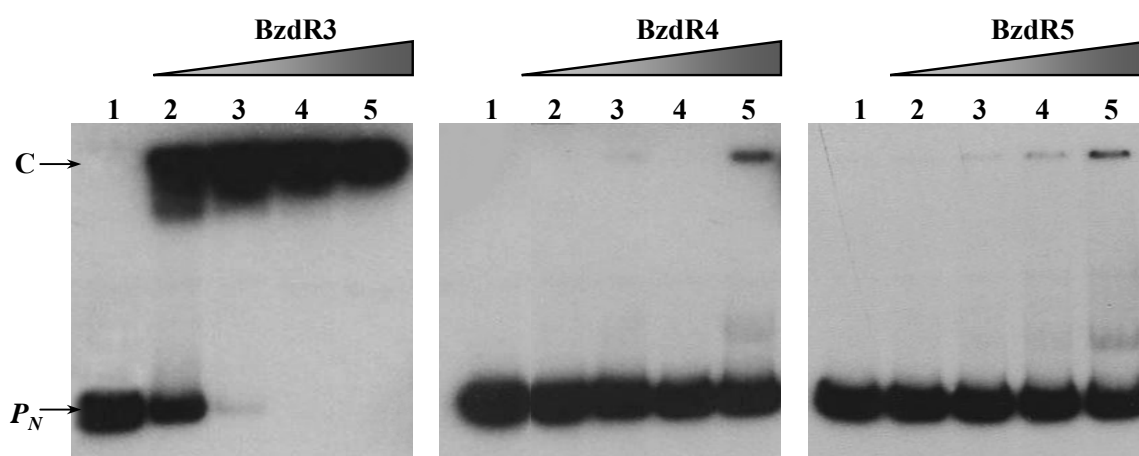


Figura 39. Ensayos *in vitro* de unión de las proteínas mutantes BzdR3, BzdR4 y BzdR5 al promotor P_N . Los 3 ensayos de retardo en gel fueron llevados a cabo en las mismas condiciones (ver apartado 7.2 de Materiales y Métodos). Calles 1: sonda P_N . En las calles 2-5 se añadieron concentraciones crecientes de las proteínas purificadas His₆-BzdR3, His₆-BzdR4 e His₆-BzdR5 (25, 50, 100 y 200 nM, respectivamente), tal y como se indica en la figura. La sonda P_N y el complejo (C) se indican a la izquierda.

Para confirmar el estado oligomérico de las proteínas BzdR3, BzdR4 y BzdR5, se realizaron ensayos de velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica. Como se muestra en la Tabla 9, la proteína mutante BzdR4 mostró varios estados oligoméricos, encontrándose el 52% de la proteína en estado de monómero, una tercera parte en estado de dímero (37%) y un pequeño porcentaje (11%) como multímeros. La proteína mutante BzdR5 también mostró varios estados oligoméricos, encontrándose la mayor parte (88%) en estado de

monómero. Por el contrario, la proteína mutante BzdR3, si bien mostró varios estados oligoméricos, se encontró en su mayor parte (91%) en estado de dímero.

Tabla 9. Datos obtenidos en los experimentos de ultracentrifugación analítica. M_m representa la masa molecular y f/f_0 el coeficiente de fricción.

Proteína	M_m teórica (Da)	f/f_0	Coefficiente de sedimentación (s)	Estado de asociación compatible
BzdR	34895	1.4	4 ± 0.21	▪ Dímero = 100%
BzdR3	34922	1.6	3.9 ± 0.15 ---	▪ Dímero = 91% ▪ Otros = 9%
BzdR4	34868	2.3	3.5 ± 0.23 2.2 ± 0.18 ---	▪ Dímero = 37% ▪ Monómero = 52% ▪ Otros = 11%
BzdR5	34895	2.3	2.3 ± 0.32 ---	▪ Monómero = 88% ▪ Otros = 12%

Todos estos resultados sugerían que si bien la sustitución del residuo Arg114 por Glu impedía la dimerización de BzdR, este estado oligomérico no dependía de la formación de puentes salinos entre los residuos Arg114 y Glu111 de la región del *linker*. Además, los resultados obtenidos revelaban que la proteína BzdR no es capaz de interactuar eficazmente con el promotor P_N en estado monomérico, requiriéndose un dímero del regulador para la unión al DNA diana.

3.2.3.2 Análisis funcional de la región LBzdR

Con el fin de confirmar si la región LBzdR influye en la dimerización de la proteína BzdR y/o interviene en la transmisión de la señal entre los dominios NBzdR y CBzdR, se utilizó un abordaje genético de mono-híbrido desarrollado con el fin de caracterizar interacciones proteína-proteína en organismos procariontas (Di Lallo *et al.*, 1999). Este sistema aprovecha la estructura y las propiedades de la proteína represora dimérica codificada por el gen *cI* del fago λ (Di Lallo *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 1990; Longo *et al.*, 1995). El represor CI del fago λ (λcI) presenta dos regiones, N-terminal (λNcI) y C-terminal (λCcI), conectados por una secuencia *linker* (λLcI) de 38 residuos (Pabo *et al.*, 1979). Aunque la región $\lambda NcI + \lambda LcI$ (dominio NTDcI) es capaz de dimerizar débilmente en solución (Pabo *et al.*, 1979), es el dominio C-terminal (CTDcI) el principal responsable del proceso de dimerización de la proteína reguladora, así como de la unión cooperativa de los dímeros de λcI a las regiones operadoras del promotor P_R del fago λ (Pabo y Lewis, 1982). Por ello, el dominio NTDcI es una útil herramienta para detectar dominios de

dimerización heterólogos, que al fusionarse con el primero, permiten al regulador quimérico resultante unirse al promotor P_R (Di Lallo *et al.*, 1999).

El sistema genético desarrollado en esta tesis está basado en el plásmido que expresa el dominio NTDcI solo o fusionado a diversos dominios heterólogos, incluyendo el gen *cat* (Di Lallo *et al.*, 1999) que codifica la enzima dimérica cloranfenicol acetiltransferasa tipo III de *E. coli* (control positivo de dimerización; Fig. 40) (Leslie, 1990), y en el plásmido compatible pSJ6 que expresa la fusión $P_R::lacZ$ (Jaenecke *et al.*, 1996), la cual permite monitorizar la unión al DNA de los distintos reguladores quiméricos. Como se aprecia en la Figura 40B, cuando se expresa el dominio NTDcI, el promotor P_R muestra unos niveles de expresión significativos (~ 400 U. Miller), mientras que cuando se expresa la quimera control NTD-Cat, la actividad β -galactosidasa se reduce en más de un orden de magnitud.

La quimera NTD-LBzdR, si bien mostró una actividad represora sobre el promotor P_R ligeramente menor que la proteína NTDcI (Fig. 40B), no redujo los niveles de actividad β -galactosidasa tan drásticamente como lo hacía la quimera control NTD-Cat, lo que parecía indicar que la capacidad de dimerización inducida por la región LBzdR era nula o, al menos, muy reducida.

Asumiendo que el resultado observado podía haberse producido por un mal plegamiento del *linker* al quedar situado en el extremo C-terminal de la proteína NTD-LBzdR, se construyó una nueva quimera ($Q\lambda$) donde se fusionó el dominio NTDcI a la región LBzdR y al dominio CBzdR. En este caso, la quimera $Q\lambda$ mostró los mismos niveles de represión ejercidos por la quimera control NTD-Cat (Fig. 40B), lo que indicaba que la quimera $Q\lambda$ se encontraba en forma dimérica.

Con el fin de determinar si el *linker* de BzdR era el responsable directo de la dimerización de la quimera $Q\lambda$, se diseñó una nueva quimera denominada $Q\lambda 2$, que contiene el dominio CBzdR fusionado al dominio NTDcI y en la que LBzdR está ausente. Como se aprecia en la Figura 40B, los niveles de represión causados por $Q\lambda 2$ fueron similares a los niveles obtenidos con la quimera $Q\lambda$, lo que indica que $Q\lambda 2$ se encuentra en forma de dímero. En conclusión, todos estos datos sugerían que la región LBzdR no es imprescindible en la dimerización de las proteínas quiméricas y, por ende, en la dimerización de BzdR.

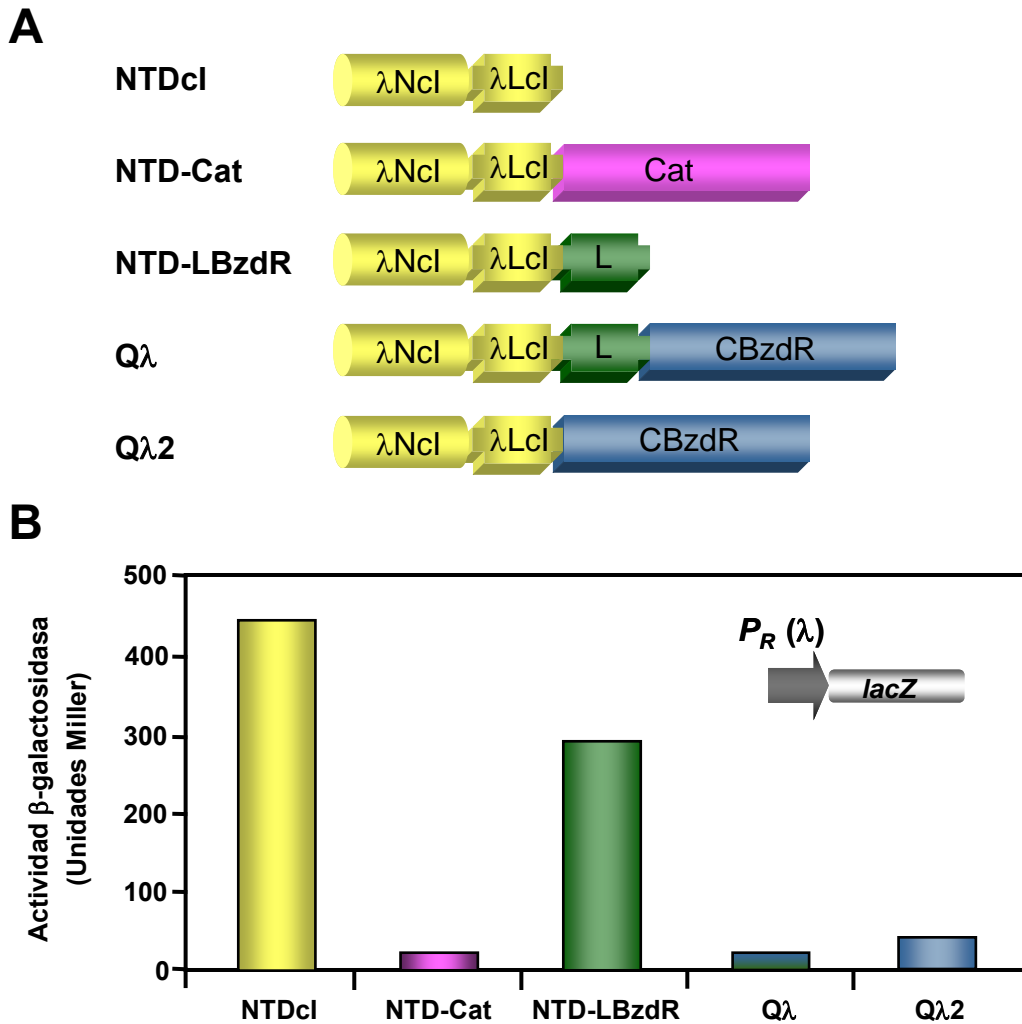


Figura 40. (A) Representación esquemática de las fusiones llevadas a cabo con el dominio NTD del represor λ cI. Amarillo: dominio NTD del represor λ cI (**NTDcI**). Verde: región *linker* LBzdR de la proteína BzdR (L). Rosa: cloranfenicol acetiltransferasa (**Cat**). Azul: dominio C-terminal de la proteína BzdR (**CBzdR**). **(B) Actividad β-galactosidasa del ensayo de mono-híbrido con la fusión $P_R::lacZ$.** La cepa *E. coli* MV1190 pSJ6($P_R::lacZ$) fue transformada con los plásmidos p λ cI, p λ cI-cat, p λ cI-LBzdR, p λ cI-Qλ y p λ cI-Qλ2 que expresan las fusiones **NTDcI**, **NTD-Cat**, **NTD-LBzdR**, **Qλ** y **Qλ2**, respectivamente. Las distintas cepas se cultivaron en medio LB y se midió la actividad β-galactosidasa tal y como se detalla en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

Por otro lado, los resultados del experimento de mono-híbrido con la quimera Qλ2 revelaron que, si bien el dominio CBzdR aislado es un monómero homogéneo en solución, como se ha demostrado anteriormente (Tabla 8), dicho dominio CBzdR debe presentar motivos implicados en el proceso de dimerización suficientes para estabilizar el dímero de NTDcI. Una vez descartado un papel esencial del *linker* de BzdR en la dimerización del regulador, se exploró su posible

función en la transmisión de información entre los dos dominios de la proteína BzdR en presencia del inductor benzoil-CoA.

Con el fin de abordar esta cuestión, se construyeron las cepas *E. coli* MV1190 portadoras de los plásmidos p*cl*-Q λ (expresa la proteína Q λ) ó p*cl*-Q λ 2 (expresa la proteína Q λ 2), y los plásmidos compatibles pCK01-BzdA (expresa la enzima benzoato-CoA ligasa, cuya actividad enzimática da lugar al inductor benzoil-CoA a partir de benzoato y CoA) y pSJ6 (incluye la fusión $P_R::lacZ$). Cuando estas células fueron cultivadas en presencia o en ausencia de benzoato se pudo observar que, si bien tanto Q λ como Q λ 2 eran capaces de reprimir eficazmente la expresión de la fusión $P_R::lacZ$ en ausencia de benzoato, sólo la quimera Q λ permitía la actividad del promotor P_R en presencia de benzoato y, por tanto, cuando existía el inductor benzoil-CoA en la célula (Fig. 41).

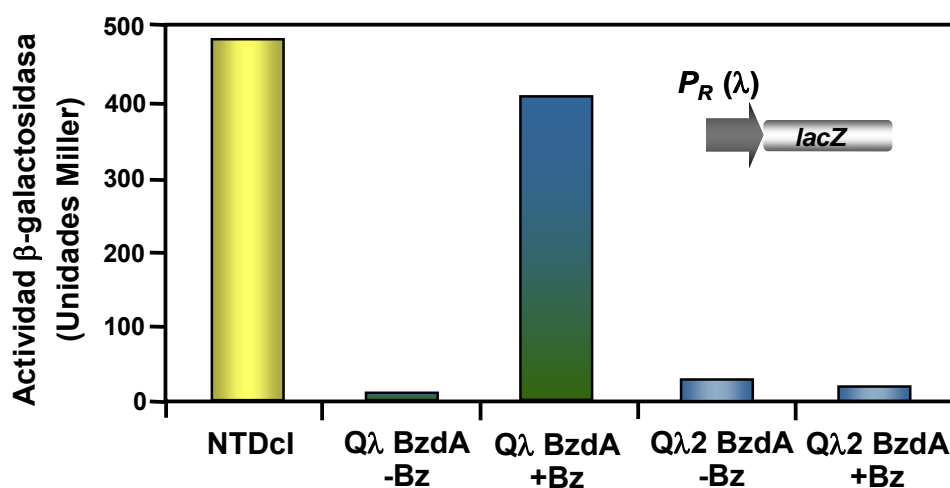


Figura 41. Ensayo de mono-híbrido con las proteínas Q λ y Q λ 2 en presencia o ausencia de benzoato. La cepa *E. coli* MV1190 pSJ6 ($P_R::lacZ$) fue transformada con los plásmidos p*cl*, p*cl*-Q λ ó p*cl*-Q λ 2, que expresan las fusiones NTD*cl*, Q λ y Q λ 2, respectivamente, y con el plásmido pCK01-BzdA que expresa la enzima benzoato-CoA ligasa (BzdA). Tras ser cultivadas anaeróbicamente en medio LB en presencia (+Bz) o ausencia (-Bz) de benzoato 3 mM, se midió su actividad β -galactosidasa tal y como se detalla en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

Estos resultados revelaban que la quimera Q λ es capaz de reconocer eficazmente benzoil-CoA y transmitir el cambio conformacional sufrido por el dominio CBzdR al dominio NTD*cl* induciendo la desrepresión del promotor P_R . Sin embargo, este fenómeno de desrepresión no se observa con la quimera Q λ 2, lo que

indica que en este caso no se produce de forma eficaz la transmisión de información desde el dominio CBzdR al NTDcI en presencia de benzoil-CoA.

Todos estos datos tomados en conjunto sugieren que el papel del *linker* (LBzdR), si bien no parece ser fundamental en el proceso de dimerización de BzdR, es crucial en el proceso de transmisión de la información desde el dominio CBzdR, que sufre un cambio conformacional al interactuar con el inductor benzoil-CoA, al dominio NBzdR.

3.3 Análisis del cambio conformacional sufrido por la proteína BzdR en presencia del inductor

El cambio conformacional sufrido por la proteína BzdR al unirse a su inductor, el benzoil-CoA, se analizó mediante distintas técnicas. Los resultados obtenidos mediante espectroscopía de fluorescencia en la región UV-visible del espectro excitando las muestras a una longitud de onda de 275 nm revelaron un cambio conformacional como resultado de la interacción entre BzdR y el benzoil-CoA (Fig. 42). Al igual que sucedía con la proteína CBzdR, cuando la proteína BzdR se encuentra en presencia del inductor benzoil-CoA, no sólo se detecta un descenso de la emisión de fluorescencia, sino que además se puede observar un desplazamiento del máximo de emisión, aunque en este caso, dicho máximo estaba en los 326 nm en ausencia de ligando, desplazándose hasta los 332 nm en presencia de benzoil-CoA. Al igual que en el caso de la proteína CBzdR, este desplazamiento del espectro indicaba una variación notable del entorno de los residuos de triptófano, ya que los residuos de tirosina apenas emiten en este rango de longitudes de onda. En base a los resultados obtenidos con CBzdR cabe suponer que el Trp229 es responsable, al menos en parte, de dicho desplazamiento, sin poderse descartar que el otro Trp de la proteína parental (Trp112) pueda estar también implicado.

Por otro lado, los experimentos de proteólisis limitada con tripsina llevados a cabo con la proteína BzdR también revelaron un cambio conformacional como resultado de la interacción entre BzdR y el benzoil-CoA, haciéndose la proteína más resistente al ataque de la tripsina en presencia de benzoil-CoA (Fig. 43).

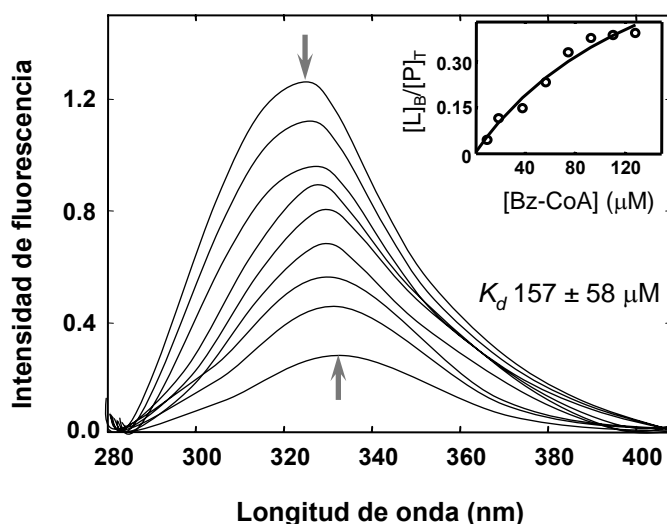


Figura 42. Interacción de la proteína BzdR con benzoil-CoA. Ensayo de espectroscopía de fluorescencia de la proteína His₆-BzdR en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de benzoil-CoA. Se parte de una concentración fija de proteína (7.5 μM) y se va incrementando la cantidad de ligando desde 0 hasta una concentración de 130 μM . En el interior de la gráfica ha sido incluido el valor obtenido para la constante de disociación (K_d). En la zona superior derecha se ha incluido una curva de unión que representa la relación de ligando unido (L_B) entre proteína total (P_T) frente a la concentración de ligando (Bz-CoA), la cual muestra el buen ajuste de los resultados experimentales al modelo de unión considerado. Las flechas grises indican el máximo de emisión a la mínima y máxima concentración de benzoil-CoA. Los ensayos se realizaron como se detalla en el apartado 5.7 de Materiales y Métodos.

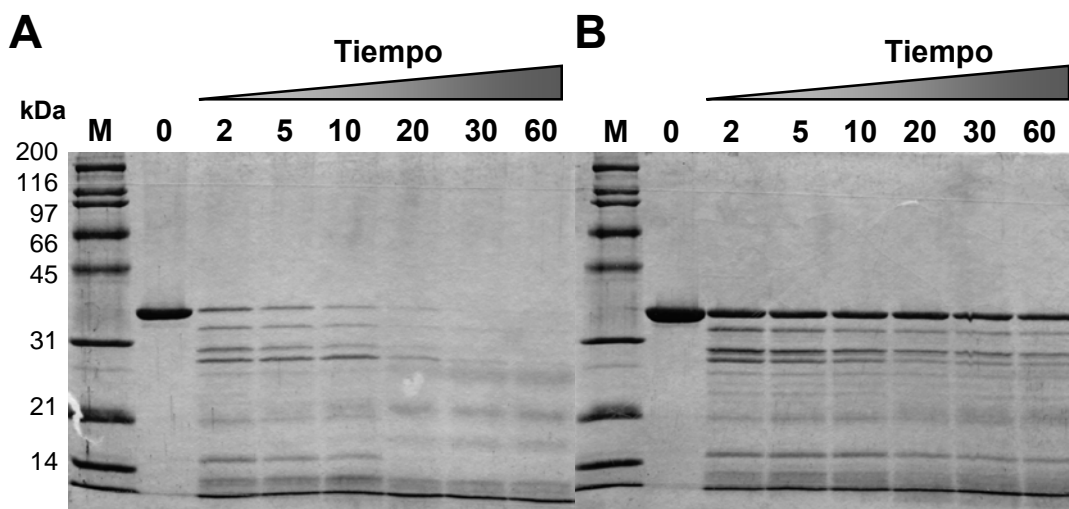


Figura 43. Ensayo de digestión con tripsina de la proteína purificada BzdR. El ensayo fue realizado con BzdR 10 μM y tripsina 0.02 mg/ml, tal y como se detalla en el apartado 5.6 de Materiales y Métodos. Calles 0-60: muestras incubadas a 37°C (condiciones óptimas de la tripsina) durante 0, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos, respectivamente. Las reacciones se realizaron en ausencia (panel A) o presencia (panel B) de benzoil-CoA 2 mM. Calles M: marcadores de pesos moleculares, indicados a la izquierda (en kDa). Las muestras se cargaron en SDS-PAGE al 12.5%.

Se llevaron a cabo experimentos de interferencia mediante ultracentrifugación analítica con la proteína purificada BzdR en presencia o ausencia de benzoil-CoA. Los resultados obtenidos mostraron una pequeña diferencia en el valor del coeficiente de

fricción (f/f_0) de la proteína, siendo menor este valor en presencia de benzoil-CoA (Tabla 10). Este resultado sugiere que la proteína BzdR ha sufrido una compactación de su estructura tras su interacción con el benzoil-CoA, lo que está de acuerdo con el resultado obtenido en el experimento de proteólisis limitada, donde la proteína BzdR es menos sensible a la tripsina en presencia de benzoil-CoA, sugiriéndose igualmente una compactación de su estructura.

Tabla 10. Datos obtenidos en el ensayo de interferencia llevado a cabo mediante ultracentrifugación analítica. M_m representa la masa molecular y f/f_0 el coeficiente de fricción.

Proteína	M_m teórica (Da)	f/f_0	Coefficiente de sedimentación (s)	Estado de asociación compatible
BzdR	34895	1.4	3.62 ± 0.1	Dímero
Benzoil-CoA	860	-	-	-
BzdR + Benzoil-CoA	35755	1.0	3.82 ± 0.1	Dímero

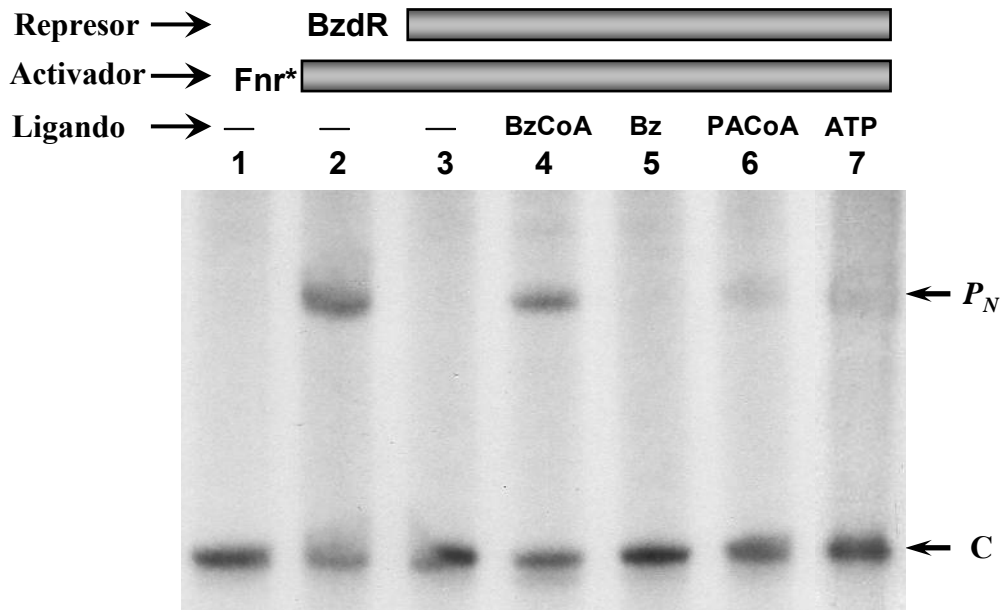


Figura 44. Efecto de distintos ligandos en la represión de la proteína BzdR sobre el promotor P_N . Se llevaron a cabo reacciones de transcripción *in vitro* de múltiples rondas utilizando como molde el plásmido pJCD- P_N (Tabla 5), que incorpora, en sentidos divergentes, un promotor propio, que expresa un RNAm de 105 nucleótidos (C), y el promotor P_N , que expresa un RNAm de 184 nt (P_N). Todas las reacciones incorporaban RNAP 50 nM, según se detalla en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos. Las reacciones de las calles 2-6 contenían además el activador His₆-Fnr* 20 nM. Las calles 3-6 también incorporaban proteína purificada His₆-BzdR 50 nM. Las calles 4, 5, 6 y 7 incluían benzoil-CoA (**BzCoA**) 1 mM, benzoato (**Bz**) 1 mM, fenilacetil-CoA (**PACoA**) 1 mM y ATP (**ATP**) 1 mM, respectivamente.

Todos estos datos tomados en conjunto sugieren que BzdR sufre un cambio conformacional al unirse el benzoil-CoA a su dominio C-terminal. Este cambio conformacional será transmitido al dominio N-terminal por medio del *linker*, dando así lugar a las modificaciones estructurales que se producen en la región HTH y que conllevan a la disociación entre el regulador transcripcional y el promotor P_N (Barragán *et al.*, 2005), y finalmente a la activación de dicho promotor.

La activación específica del benzoil-CoA sobre la represión ejercida por BzdR en el promotor P_N se ha demostrado en ensayos de transcripción *in vitro* (Fig. 44). En estos ensayos también se confirmó que el benzoato no actuaba como inductor y que el fenilacetil-CoA era capaz de causar una ligera activación de P_N . Además, también se pudo apreciar una ligera activación en presencia de ATP, lo que estaba de acuerdo con los resultados de espectroscopía de fluorescencia (Fig. 36) que indicaban una determinada interacción del fenilacetil-CoA y del ATP con el dominio CBzdR.

Objetivo 4. Utilización de la proteína BzdR como modelo para la generación de nuevos reguladores transcripcionales

Como se ha demostrado anteriormente, la proteína BzdR posee una arquitectura modular con dos dominios, NBzdR y CBzdR, estructural y funcionalmente independientes, conectados entre sí por una región *linker*, LBzdR, que actúa como transmisor de la información entre ambos en presencia de la molécula inductora benzoil-CoA. La naturaleza modular de BzdR facilita su utilización para el diseño de nuevos reguladores artificiales que permitan profundizar en el estudio de las relaciones estructura/función de los dominios de BzdR, en el origen evolutivo de los reguladores de la subfamilia BzdR, así como en el desarrollo de nuevos circuitos reguladores de interés en el campo de la biología sintética.

4.1 La proteína quimérica Q λ controla el ciclo lítico del fago λ

La proteína quimérica Q λ es una proteína capaz de reprimir el promotor P_R del fago λ (Fig. 40). Este promotor está directamente implicado en la activación del ciclo lítico tras la infección fágica (Herskowitz, 1973; Reichardt, 1975a; Reichardt, 1975b), por lo que la proteína Q λ debería ser capaz, en principio, de proteger de la lisis a células de *E. coli* portadoras de dicha quimera tras su infección con el fago λ . Con el fin de comprobar esta hipótesis, se diseñó un experimento de infección con fago λ de la cepa *E. coli* MV1190 expresando distintas proteínas. La cepa parental *E. coli* MV1190 generó 6.4×10^6 calvas de lisis tras la infección con la preparación de fago λ (Fig. 45). Como cabría esperar, el control negativo llevado a cabo con la cepa *E. coli* MV1190 expresando el dominio NTDCI del represor CI, que no puede reprimir de forma eficaz al promotor P_R del fago λ (Fig. 40), no mostró una reducción significativa del número de placas de lisis tras la infección con dicho fago λ . Por el contrario, el control positivo *E. coli* MV1190 expresando la proteína NTD-Cat que es capaz de reprimir eficazmente al promotor P_R (Fig. 40), sí mostró una clara reducción en el número de placas de lisis observadas (Fig. 45), lo que revela el papel de este regulador quimérico como represor efectivo del ciclo lítico del fago λ .

Cuando la cepa *E. coli* MV1190 expresa la quimera Q λ , se observa también una significativa reducción (más de dos órdenes de magnitud) en el número de calvas de lisis respecto a la cepa parental tras la infección con el fago λ (Fig. 45), lo que está de

acuerdo con la represión del promotor P_R por parte de la quimera $Q\lambda$ observada previamente (Fig. 40). Además, la represión del ciclo lítico fue revertida con benzoato en la cepa *E. coli* MV1190 expresando la quimera $Q\lambda$ y la enzima benzoato-CoA ligasa que genera el inductor benzoil-CoA. Por el contrario, el benzoato no causó ningún efecto en la infección del fago λ sobre la cepa *E. coli* MV1190 expresando la quimera $Q\lambda 2$ y la enzima benzoato-CoA ligasa, lo cual está de acuerdo con el papel del *linker* de BzdR como transmisor de la información entre los dominios CBzdR/NBzdR tras la unión al primero del inductor benzoil-CoA.

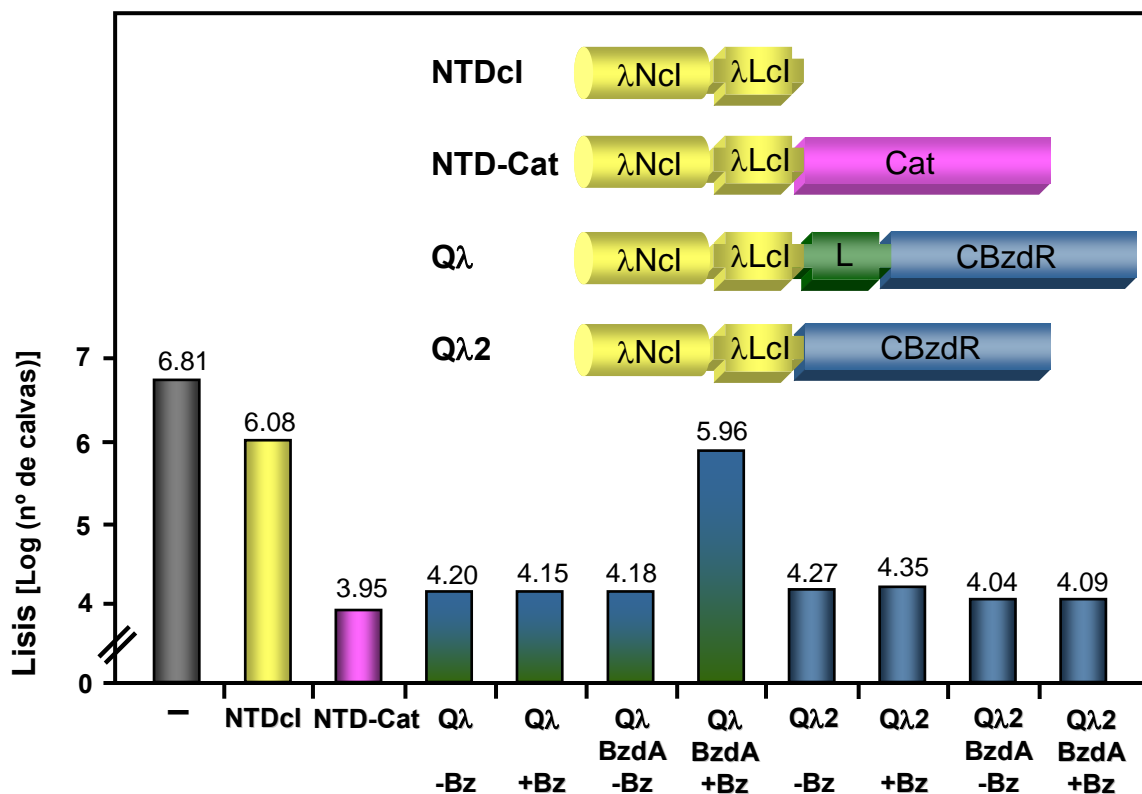


Figura 45. Ensayo de infección y lisis mediada por el fago λ en la cepa *E. coli* MV1190. La cepa *E. coli* MV1190 (-) fue transformada con los plásmidos pCl, pCl-cat, pCl- $Q\lambda$ y pCl- $Q\lambda 2$ que expresan las fusiones NTDcl, NTD-Cat, $Q\lambda$ y $Q\lambda 2$, respectivamente, representadas en las figuras en color. Las cepas con las fusiones $Q\lambda$ ó $Q\lambda 2$ fueron transformadas posteriormente con el plásmido pCK01-BzdA (BzdA), que expresa la enzima benzoato-CoA ligasa, y fueron cultivadas en presencia (+Bz) o ausencia (-Bz) de benzoato 3 mM. La infección con el fago λ fue llevada a cabo tal y como se describe en el apartado 6.4 de Materiales y Métodos. Código de las construcciones: Amarillo: dominio NTD del represor λcI (NTDcl). Verde: región *linker* LBzdR de la proteína BzdR (L). Rosa: cloranfenicol acetiltransferasa (Cat). Azul: dominio C-terminal de la proteína BzdR (CBzdR). Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

En su conjunto, todos estos resultados confirman los obtenidos previamente con la fusión traduccional $P_R::lacZ$ (Figs. 40 y 41), revelando que la quimera $Q\lambda$ es capaz de

reprimir eficazmente al promotor P_R en el genoma del fago λ (inhibición del ciclo lítico), y de reconocer benzoil-CoA como molécula inductora que permite la activación del promotor fágico (activación del ciclo lítico) (Fig. 45). En resumen, la quimera $Q\lambda$ constituye un nuevo regulador artificial capaz de controlar el ciclo lítico del fago λ en respuesta a la presencia/ausencia de benzoato (benzoil-CoA) en la célula.

4.2 La proteína quimérica Q1: un nuevo represor transcripcional con actividad enzimática

Para confirmar la capacidad del dominio NBzdR de unirse al promotor P_N y de la región linker de BzdR de transmitir la información desde el dominio receptor de ligando al dominio NBzdR, se fusionó NBzdRL con la enzima monomérica siquimato quinasa I (SKI; producto del gen *aroK* de *E. coli*) (Fig. 46), tal y como se detalla en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos. La proteína quimérica Q1 fue hiperproducida desde el plásmido pQE32-Q1 y posteriormente purificada tal y como se detalla en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos.

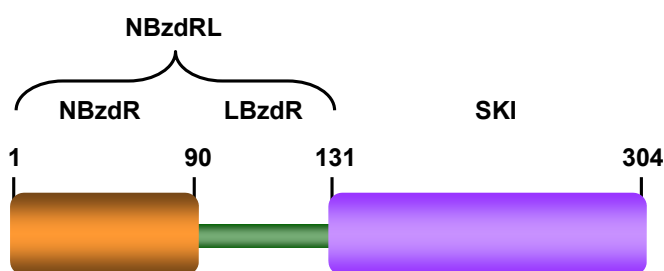


Figura 46. Arquitectura modular de la proteína quimérica Q1. Representación esquemática de los dominios que componen la quimera Q1. En naranja se muestra el dominio N-terminal de BzdR (NBzdR), en verde la región del *linker* de BzdR (LBzdR) y en morado la proteína siquimato quinasa I de *E. coli* (SKI).

4.2.1 Funcionalidad del dominio N-terminal (NBzdRL) de la quimera Q1

Con el fin de confirmar la función predicha para el dominio NBzdRL en la quimera Q1, se llevaron a cabo una serie de ensayos de interacción con el promotor P_N *in vitro* e *in vivo*.

En primer lugar, se realizaron ensayos de retardo en gel que demostraron la capacidad de la quimera Q1 para unirse eficientemente al promotor P_N , tal y como puede apreciarse en la Figura 47A. Esta interacción era específica ya que se inhibía en presencia de sonda P_N no marcada radiactivamente (Fig. 47A). En segundo lugar, se llevaron a cabo ensayos *in vivo*, transformando la cepa *E. coli* MC4100-T1 (que incluye la fusión $P_N::lacZ$ en cromosoma; Tabla 4) con el plásmido pCK01-Q1

(Tabla 5), que expresa la proteína Q1. Como se puede apreciar en la Figura 47B, la proteína Q1 mostró una capacidad represora del promotor P_N tan eficiente como la mostrada por la proteína parental BzdR.

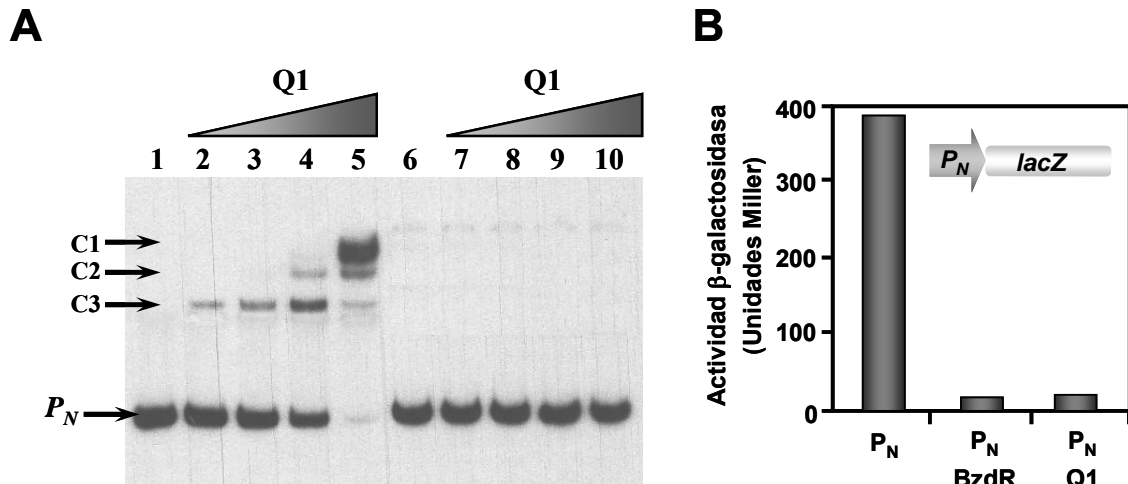


Figura 47. Ensayos *in vitro* e *in vivo* de la unión de la proteína quimérica Q1 al promotor P_N . (A) Ensayo de retardo en gel. Calles 1 y 6, sonda P_N libre. En las calles 2-5 y 7-10 se añadieron concentraciones crecientes, 5, 10, 25 y 50 nM, respectivamente, de la proteína purificada His₆-Q1. Además, en las calles 6-10 se añadió sonda P_N no marcada radiactivamente a una concentración de 100 nM. Los tres complejos P_N :His₆-Q1 formados se indican como C1, C2 y C3. Los ensayos fueron realizados tal y como se indica en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. (B) Actividad β -galactosidasa de la cepa *E. coli* MC4100-T1, que incorpora la fusión P_N ::*lacZ* (P_N). Dicha cepa fue transformada con el plásmido pCK01-BzdR (P_N BzdR) o pCK01-Q1 (P_N Q1), que expresan las proteínas His₆-BzdR e His₆-Q1, respectivamente. Todas las cepas fueron cultivadas anaeróbicamente en medio LB y posteriormente se midió su actividad β -galactosidasa tal y como se detalla en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

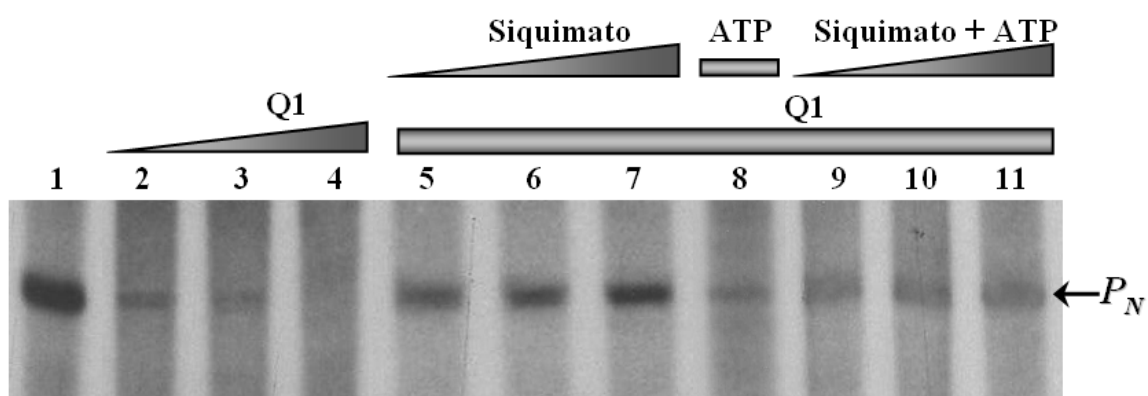


Figura 48. Efecto del siquimato y el ATP en el control de la actividad del promotor P_N por la quimera Q1. Se llevaron a cabo reacciones de transcripción *in vitro* de múltiples rondas utilizando como molde el plásmido pJCD- P_N (Tabla 5), que incorpora el promotor P_N , transcribiendo un RNAm de 184 nt (P_N), y añadiendo RNAP 50 nM y proteína Fnr* 20 nM, ambas necesarias para la actividad del promotor P_N . En las calles 1-4 se añadieron concentraciones crecientes 0, 25, 50 y 100 nM de la quimera His₆-Q1, respectivamente. En las calles 5-11 se fijó la concentración de His₆-Q1 en 50 nM. En las calles 5-7, se añadió siquimato 1, 2 y 4 mM, respectivamente; en la calle 8, se añadió ATP 4 mM; y en las calles 9-11, se añadió siquimato + ATP 1, 2 y 4 mM de cada uno de ellos, respectivamente.

También se ensayó la capacidad de represión de la quimera Q1 sobre el promotor P_N , mediante experimentos de transcripción *in vitro*. Al igual que en los ensayos *in vivo*, la proteína Q1 fue capaz de reprimir la actividad del promotor P_N tan eficientemente como lo hacía la proteína parental BzdR, tal y como se puede apreciar en la Figura 48 (calles 1-4).

Por último, se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación con el fin de comprobar la homogeneidad y el estado oligomérico de la quimera Q1. Se ensayaron diferentes concentraciones de proteína Q1, entre 1 y 20 μM , obteniendo en todos los casos una especie única compatible con una masa molecular de una forma dimérica de la proteína (Tabla 11).

Tabla 11. Datos obtenidos en los experimentos de ultracentrifugación analítica con la quimera Q1. M_m representa la masa molecular y f/f_0 el coeficiente de fricción.

Proteína	M_m teórica (Da)	f/f_0	Coefficiente de sedimentación (s)	Estado de asociación compatible
Q1	36072	1.4	3.68 ± 0.2	Dímero

Todos estos resultados, en su conjunto, indicaban claramente que el dominio NBzdRL de la quimera Q1 mantenía su integridad estructural y funcional, lo que permitía el reconocimiento y represión del promotor P_N , así como la dimerización de la quimera Q1.

4.2.2 Funcionalidad del dominio C-terminal (SKI) de la quimera Q1

Dado que la enzima SKI constituye el dominio C-terminal en la quimera Q1, se decidió comprobar si dicho dominio mantenía su actividad catalítica en la quimera. Se realizó un ensayo para medir la posible actividad siquimato quinasa de la proteína Q1 purificada. Como control positivo se utilizó la proteína SKI de *E. coli* purificada a partir de las células que hiperexpresan el gen *aroK* desde el plásmido pQE32, tal y como se detalla en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos. En la Figura 49 se puede apreciar que la quimera Q1 posee una actividad siquimato quinasa similar a la de la enzima SKI.

Con el fin de corroborar la actividad siquimato quinasa de la quimera Q1 en un ensayo *in vivo*, se utilizó una cepa defectiva en los genes *aroK* y *aroL*, que codifican las dos isoformas, SKI y SKII, respectivamente, de la siquimato quinasa en *E. coli*.

Esta cepa, denominada *E. coli* ALO807 (*aroK*, *aroL*), no es capaz de crecer en medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono, al no ser capaz de sintetizar aminoácidos aromáticos (Lobner-Olesen y Marinus, 1992), aunque sí puede hacerlo en presencia de aminoácidos aromáticos suplementados en los casaminoácidos (Lobner-Olesen y Marinus, 1992). Cuando *E. coli* ALO807 se transformó con el plásmido pQE32-Q1 que expresa la quimera Q1, fue capaz de crecer en medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono y sin necesidad de ser suplementada con casaminoácidos, lo que demostró que la proteína Q1 restauraba la actividad siquimato quinasa en la célula (Fig. 50).

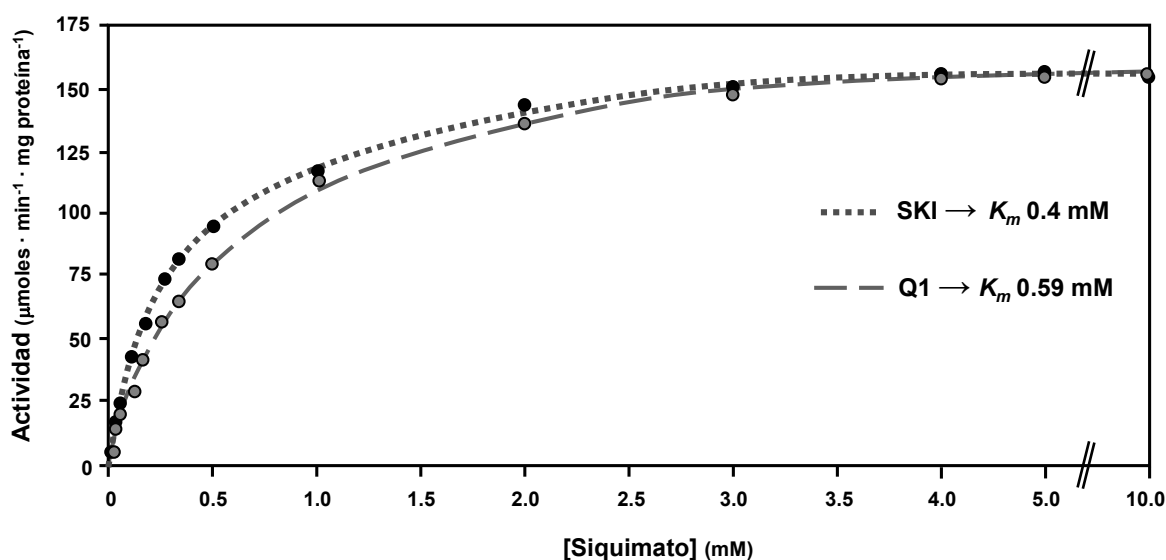


Figura 49. Actividad siquimato quinasa de las proteínas purificadas SKI y Q1. El ensayo de actividad siquimato quinasa se llevó a cabo tal y como se detalla en el apartado 6.1.2 de Materiales y Métodos. Se utilizaron 14 medidas para la obtención de la curva logarítmica. En el interior de la gráfica se muestra el valor calculado de K_m para las proteínas His₆-Q1 e His₆-SKI. Cada uno de los 14 puntos utilizados fue el resultado de realizar la media de tres medidas independientes, cuya desviación estándar fue menor del 10%.

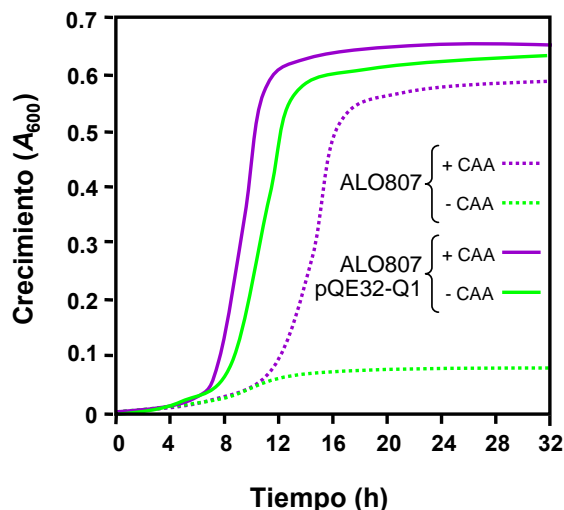


Figura 50. Curvas de crecimiento de las cepas de *E. coli* defectivas en los genes *aroK* y *aroL*. La cepa *E. coli* ALO807 (*aroK*, *aroL*) fue cultivada en medio mínimo M63, utilizando como fuente de carbono glicerol 30 mM en presencia (línea discontinua morada) o en ausencia (línea discontinua verde) de casaminoácidos (CAA) 0.4% (p/v). También fue cultivada en idénticas condiciones la cepa *E. coli* ALO807 (pQE32-Q1), que expresa la proteína His₆-Q1 en presencia (línea morada) o en ausencia (línea verde) de casaminoácidos 0.4% (p/v). Las curvas son el resultado de realizar la media de tres medidas separadas e independientes, cuya desviación estándar fue menor del 10%.

Estos resultados muestran que el dominio C-terminal de la quimera Q1 mantiene su integridad estructural y funcional en la proteína de fusión.

4.2.3 La quimera Q1 es un represor transcripcional que responde a siquimato

Puesto que ambos dominios de la quimera Q1, NBzdR y SKI, mantenían sus respectivas funciones, cabía la posibilidad de que el cambio conformacional producido en el dominio C-terminal (SKI) tras la unión de sus sustratos, se transmitiera al dominio N-terminal (NBzdR) y fuera capaz de modificar su afinidad por el DNA. De ser así, la quimera Q1 se habría convertido en un nuevo regulador transcripcional, capaz de responder a un nuevo estímulo, el siquimato, el cual daría lugar a la desrepresión del promotor P_N de forma análoga a como lo hace el benzoil-CoA al unirse a BzdR.

Con objeto de comprobar esta hipótesis, se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con la sonda P_N , añadiendo los sustratos naturales de la SKI, siquimato y ATP, a la quimera Q1. Como se puede observar en la Figura 51, la proteína Q1 se despegaba de la sonda P_N cuando se añaden concentraciones crecientes de siquimato, de siquimato más ATP ó, en menor medida, de ATP. Sin embargo, al añadir ligandos control tales como el benzoato o la glucosa (moléculas con cierta similitud estructural al siquimato), no se observó ningún efecto sobre el retardo de la sonda P_N por la proteína Q1, lo que sugería que el cambio conformacional producido en el dominio SKI es específico de los sustratos de la actividad enzimática siquimato quinasa, y puede transmitirse al dominio NBzdR de la quimera Q1 reduciendo su capacidad de unión al promotor P_N .

Con el fin de confirmar este resultado, se llevaron a cabo ensayos de transcripción *in vitro* con los sustratos empleados anteriormente, tal y como puede apreciarse en la Figura 48. La represión ejercida por la quimera Q1 sobre el promotor P_N dejaba de producirse al añadir siquimato a la mezcla de reacción. Sin embargo, cuando se añadía ATP sólo o ambos sustratos, ATP y siquimato, los niveles de transcripción observados eran extremadamente bajos y no permitían concluir un efecto activador sobre el promotor P_N .

En vista de estos resultados, se realizaron ensayos *in vivo* en la cepa *E. coli* MC4100 (pSJ3P_N), que expresa la fusión $P_N::lacZ$ en multicopia, transformada con el plásmido pCK01-Q1, que expresa la proteína His₆-Q1. Ni siquiera en presencia de siquimato en el medio de cultivo se logró detectar actividad del promotor P_N al

realizar los correspondientes ensayos de actividad β -galactosidasa (Fig. 52), lo que sugería que dentro de la célula (y por tanto en presencia de ATP y del siquimato añadido) no se estaba produciendo la activación del promotor P_N inducida por el siquimato, al igual que sucedía en los ensayos de transcripción *in vitro*.

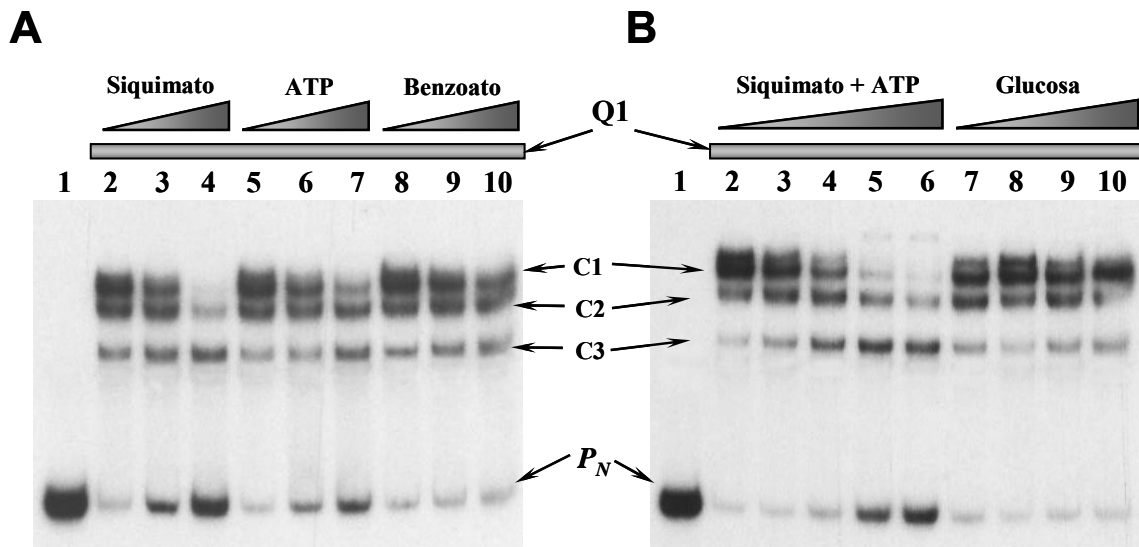


Figura 51. Ensayos de retardo en gel de la interacción de la proteína Q1 con el promotor P_N . (A) Calle 1, sonda P_N libre. En las calles 2-10 se añadió proteína His₆-Q1 a una concentración de 50 nM. En las calles 2-4, 5-7 y 8-10 se añadieron tres concentraciones crecientes (0, 2 y 4 mM) de siquimato, ATP y benzoato, respectivamente. (B) Calle 1, sonda P_N libre. En las calles 2-10 se añadió proteína His₆-Q1 a una concentración de 50 nM. En las calles 2-6 se añadieron concentraciones crecientes 0, 0.2, 0.5, 1 y 2 mM, respectivamente, tanto de siquimato como de ATP. En las calles 7-10 se añadieron concentraciones crecientes 0, 1, 2, y 4 mM, respectivamente, de glucosa. En ambos casos se indican los tres complejos $P_N::Q1$ (C1, C2 y C3), así como la sonda P_N libre. Los ensayos de retardo fueron realizados tal y como se detalla en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos.

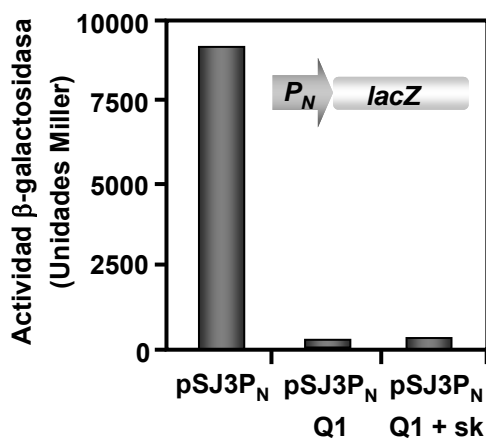


Figura 52. Ensayo *in vivo* del efecto del siquimato en la represión del promotor P_N por la quimera Q1. La cepa *E. coli* MC4100 pSJ3- P_N , que incorpora la fusión $P_N::lacZ$ en multicopia (pSJ3P_N), fue transformada con el plásmido pCK01-Q1. El crecimiento se llevó a cabo en LB y en condiciones anaeróbicas. La cepa que expresaba la proteína His₆-Q1 fue cultivada en ausencia (pSJ3P_N Q1) ó en presencia (pSJ3P_N Q1 + sk) de siquimato 5 mM. Posteriormente, se midió su actividad β -galactosidasa tal y como se detalla en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

Estas aparentes discrepancias surgidas entre los resultados obtenidos en los ensayos de retardo en gel y los resultados obtenidos tanto en los ensayos de transcripción *in vitro* como en los ensayos de actividad *in vivo*, podían ser

explicados teniendo en cuenta el mecanismo catalítico de la siquimato quinasa. Así, la SKI sufre un cambio de conformación cuando uno alguno de sus dos sustratos (siquimato y ATP) o ambos (Hartmann *et al.*, 2006), lo cual posibilita que se catalice la reacción enzimática, generándose siquimato-3P y ADP (De Feyter, 1987; Pittard, 1987), siempre y cuando esté presente un cofactor necesario para ello, el catión Mg^{2+} (DeFeyter y Pittard, 1986). En ausencia de Mg^{2+} , los sustratos de la SKI son todavía capaces de unirse al centro activo de la enzima generándose el cambio de conformación correspondiente, pero no se puede producir la reacción enzimática. Teniendo en cuenta esta información, y el hecho de que el tampón utilizado en las reacciones de retardo en gel no lleva Mg^{2+} , mientras que el tampón utilizado en las reacciones de transcripción *in vitro*, sí lleva Mg^{2+} (véase apartado 6.2 de Materiales y Métodos), se podía sugerir que el diferente comportamiento observado era consecuencia de que en los ensayos de retardo la quimera Q1 no presentaba actividad siquimato quinasa, mientras que en los ensayos de transcripción *in vitro*, sí.

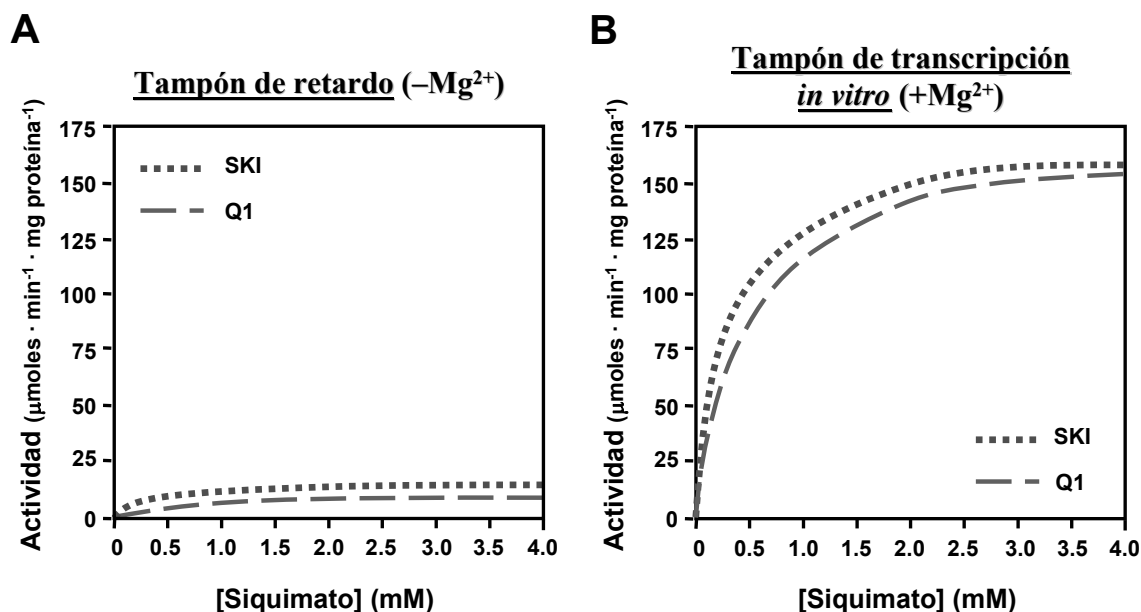


Figura 53. Actividad siquimato quinasa de las proteínas purificadas SKI y Q1 en el tampón de retardo (A) y en el de transcripción *in vitro* (B). El ensayo de actividad siquimato quinasa se llevó a cabo tal y como se detalla en el apartado 6.1.2 de Materiales y Métodos. Se utilizaron 8 medidas para la obtención de la curva logarítmica. Cada uno de los 8 puntos utilizados fue el resultado de realizar la media de tres medidas independientes, cuya desviación estándar fue menor del 10%.

Con objeto de confirmar si la proteína Q1 mostraba actividad enzimática en estos ensayos, se llevaron a cabo los experimentos mostrados en la Figura 53, donde

se puede apreciar que ni la quimera Q1 ni la SKI parental mostraron actividad siquimato quinasa en el tampón de retardo, al contrario de lo que sucedía en el tampón de transcripción *in vitro*, donde sí existía actividad. De esta forma, cuando el dominio SKI de la quimera Q1 no es capaz de catalizar la reacción enzimática (ensayos de retardo), pero sí de interaccionar con sus dos sustratos (siquimato y ATP), se produce un cambio conformacional estable que se transmite eficazmente al dominio NBzdR y no se produce la interacción de Q1 con la sonda P_N (Fig. 51). Por el contrario, en presencia de Mg^{2+} (ensayos de transcripción *in vitro* y ensayos *in vivo*), el cambio conformacional tras la unión de los dos sustratos es transitorio en el mecanismo de catálisis y, por ello, no puede ser transmitido al dominio NBzdR, con lo que la quimera Q1 funciona como un “super-represor” de P_N (Figs. 48 y 52).

4.3 La proteína quimérica Q2: un nuevo represor transcripcional que responde a siquimato *in vivo*

Dado que el catión Mg^{2+} es imprescindible para que tenga lugar la reacción enzimática de la siquimato quinasa, se planteó la posibilidad de mutar en la quimera Q1 el residuo o residuos implicados en la unión del catión Mg^{2+} , con la idea de generar una nueva quimera sin actividad siquimato quinasa y que fuese capaz de responder al efecto inductor del siquimato sobre la actividad del promotor P_N *in vivo*. En la siquimato quinasa de *Mycobacterium tuberculosis* se ha podido determinar que los residuos Thr16, Asp32 y Asp34 están implicados en la coordinación de un átomo de Mg^{2+} (Gu *et al.*, 2002). La SKI de *E. coli* posee dos residuos Asp en las posiciones 34 y 36 que, por similitud con la siquimato quinasa de *M. tuberculosis*, parecen ser los implicados en la unión del catión Mg^{2+} . De esta forma, se construyó mediante mutagénesis dirigida un mutante de la quimera Q1 (ver apartado 3.8 de Materiales y Métodos), en el que se sustituyó el residuo Asp168 (correspondiente al Asp36 en SKI) por un residuo Ala, dando lugar a la nueva quimera Q2 (Q1_{D168A}) (Fig. 54A).

Tras la hiperproducción y purificación de la quimera Q2 (ver apartado 5.4 de Materiales y Métodos), se llevó a cabo un ensayo de actividad siquimato quinasa, con el cual se demostró, tal y como se esperaba, que la sustitución D168A daba lugar a una proteína sin dicha actividad (Fig. 54B). Sin embargo, la quimera Q2 mantuvo su capacidad de unirse al promotor P_N , y dicha unión se inhibía en presencia de siquimato (Fig. 54C).

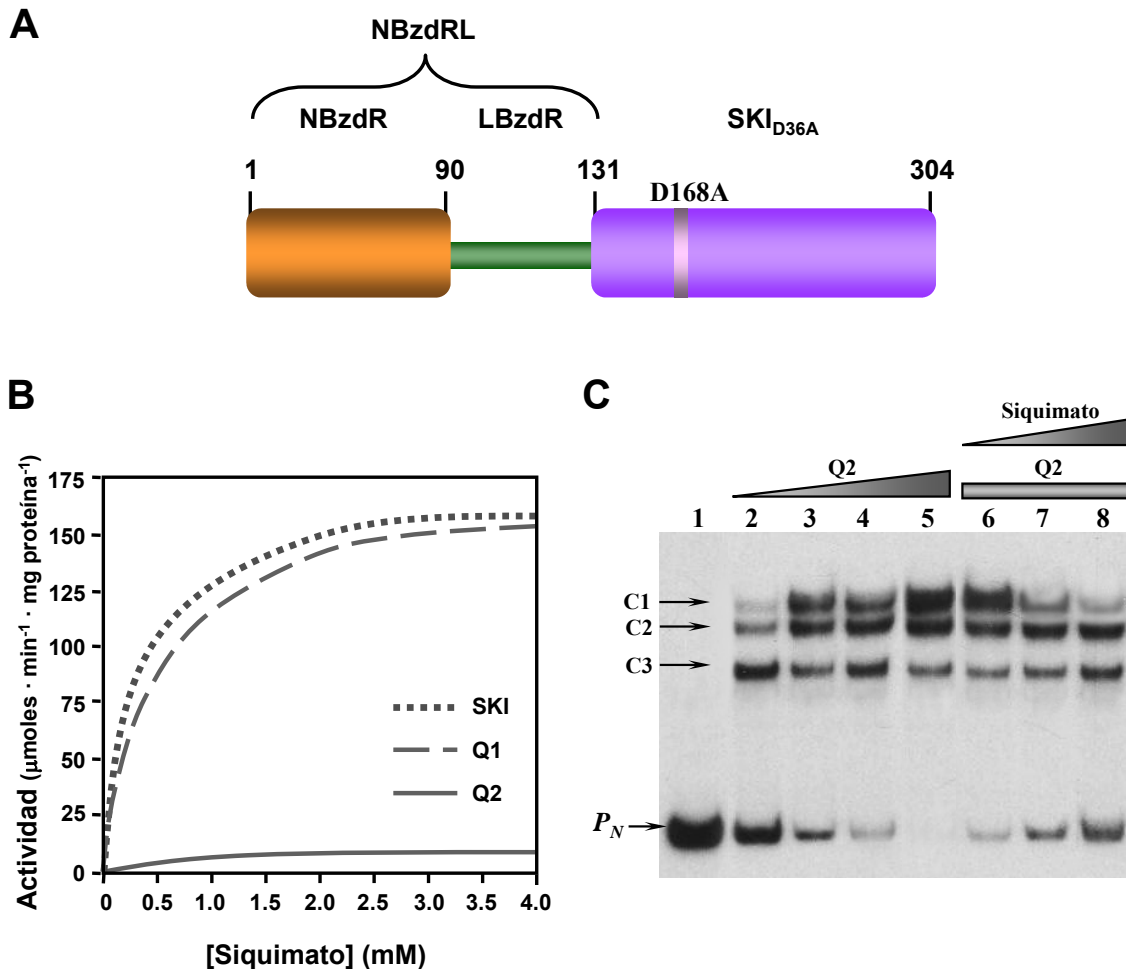


Figura 54. (A) Arquitectura modular de la proteína quimérica Q2. Representación esquemática de los dominios que componen la quimera Q2. En naranja se muestra el dominio N-terminal de BzdR (NBzdR), en verde la región del *linker* de BzdR (LBzdR) y en morado la proteína siquimato quinasa I de *E. coli*, con la sustitución D168A (SKI_{D36A}). **(B) Actividad siquimato quinasa de las proteínas purificadas SKI, Q1 y Q2.** El ensayo de actividad siquimato quinasa se llevó a cabo tal y como se detalla en el apartado 6.1.2 de Materiales y Métodos. Se utilizaron 8 medidas para la obtención de la curva logarítmica. Cada uno de los 8 puntos utilizados fue el resultado de realizar la media de tres medidas independientes, cuya desviación estándar fue menor del 10%. **(C) Ensayos de retardo en gel de la interacción de la proteína Q2 con el promotor P_N .** Calle 1, sonda P_N libre. En las calles 2-5 se añadió proteína His₆-Q2 a concentraciones crecientes de 5, 10, 25 y 50 nM, respectivamente. En las calles 6-8 se añadió proteína His₆-Q2 a una concentración de 25 nM, así como concentraciones crecientes 0.5, 2 y 4 mM, respectivamente, de siquimato. A la izquierda del gel se indican las bandas correspondientes a los tres complejos formados (C1, C2 y C3) y a la sonda P_N . Los ensayos se realizaron tal y como se detalla en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos.

En este caso, a diferencia de lo que sucedía con la quimera Q1, los ensayos de transcripción *in vitro* demostraron que la quimera Q2 permitía la actividad del promotor P_N en presencia de siquimato y ATP (Fig. 55). Por otro lado, se llevaron a cabo experimentos *in vivo* con la cepa *E. coli* MC4100 (pSJ3P_N), que expresa la fusión $P_N::lacZ$ en multicopia, transformada con el plásmido pCK01-Q2, que expresa la

proteína quimérica His₆-Q2. Como se puede apreciar en la Figura 56, la proteína Q2 fue capaz de reprimir eficazmente la actividad del promotor P_N al igual que se observó previamente con la quimera Q1 (Fig. 52). Sin embargo, y a diferencia de lo observado con la proteína Q1, al añadir siquimato al medio, se restauró la actividad β -galactosidasa, lo que indicaba que el promotor P_N era activo y, por tanto, que la quimera Q2 no era capaz de reprimirlo en presencia de siquimato.

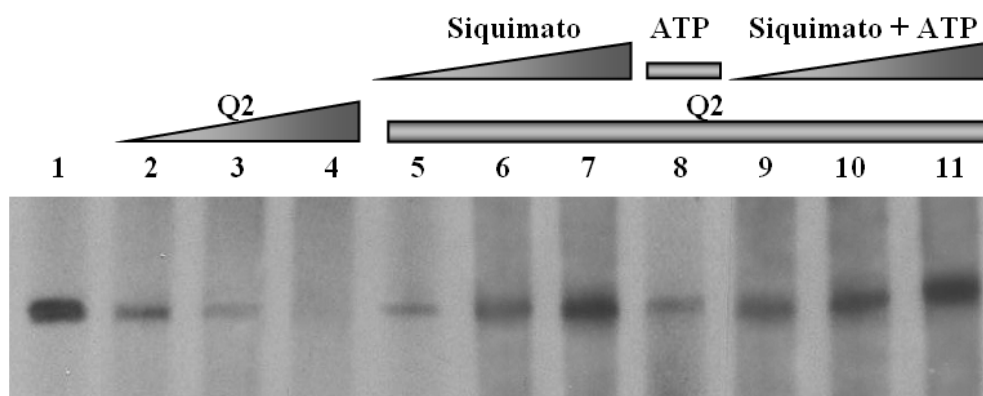


Figura 55. Efecto del siquimato y el ATP en el control de la actividad del promotor P_N por la quimera Q2. Se llevaron a cabo reacciones de transcripción *in vitro* de múltiples rondas utilizando como molde el plásmido pJCD- P_N (Tabla 5), que incorpora el promotor P_N , transcribiendo un RNAm de 184 nt (P_N), y añadiendo RNAP 50 nM y proteína Fnr* 20 nM, ambas necesarias para la actividad del promotor P_N . En las calles 1-4, se añadieron concentraciones crecientes 0, 25, 50 y 100 nM, respectivamente, de la quimera His₆-Q2. En las calles 5-11, se fijó la concentración de His₆-Q2 en 50 nM. En las calles 5-7, se añadió siquimato 1, 2 y 4 mM, respectivamente; en la calle 8 se añadió ATP 4 mM, y en las calles 9-11 se añadió siquimato + ATP 1, 2 y 4 mM de cada uno, respectivamente.

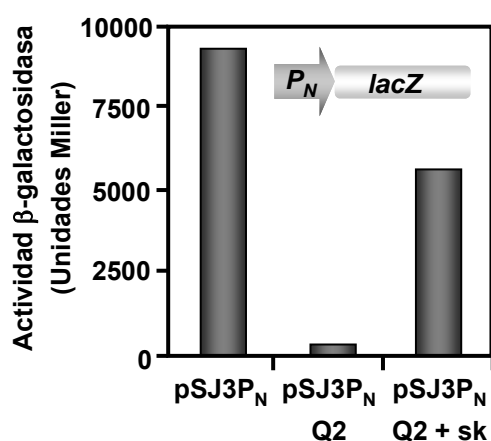


Figura 56. Ensayo *in vivo* del efecto del siquimato en la represión del promotor P_N por la quimera Q2.

La cepa *E. coli* MC4100 (pSJ3- P_N), que incorpora la fusión $P_N::lacZ$ en multicopia (pSJ3 P_N), fue transformada con el plásmido pCK01-Q2. El crecimiento se llevó a cabo en LB y en condiciones anaeróbicas. La cepa que expresaba la proteína His₆-Q2 fue cultivada en ausencia (pSJ3 P_N Q2) ó en presencia (pSJ3 P_N Q2 + sk) de siquimato 5 mM. Posteriormente, se midió su actividad β -galactosidasa tal y como se detalla en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

Estos resultados sugerían que la quimera Q2 era capaz de interactuar con el siquimato y mantener el cambio conformacional que éste induce en la estructura del dominio SKI, lo que permitiría la transmisión de esta información al dominio NBzdR,

impidiendo la unión de éste al DNA diana. De esta forma, la pérdida de la actividad siquimato quinasa por parte del dominio SKI permite considerar a la quimera Q2 como un nuevo regulador artificial que controla eficazmente al promotor P_N en respuesta a la presencia o ausencia de siquimato.

4.4 La región LBzdR es indispensable para la correcta actividad reguladora de la transcripción de las quimeras

El papel del *linker* de BzdR en la transmisión de la información desde el dominio CBzdR al dominio NTDcI tras la unión del inductor benzoil-CoA, quedó patente en los ensayos realizados con las quimeras Q λ y Q λ 2 (ver apartados 3.2.3.2 y 4.1 de Resultados). Con el fin de determinar la importancia del *linker* en el proceso de transmisión de la información desde el dominio SKI al dominio NBzdR en las quimeras Q1 y Q2 cuando se unen los ligandos correspondientes, ATP y siquimato, se construyeron dos nuevas quimeras, Q4 y Q5 (Fig. 57), en las que se eliminó la región *linker* de BzdR (LBzdR) (ver apartados 3.7 y 3.8 de Materiales y Métodos). Ambas quimeras, Q4 y Q5, fueron hiperproducidas y purificadas, tal y como se describe en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos.

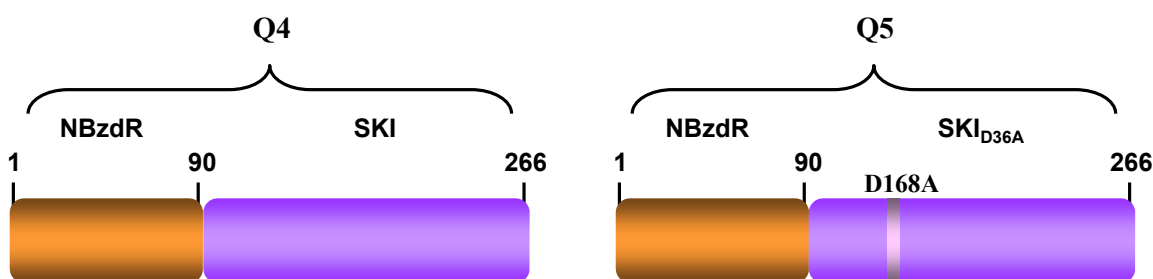


Figura 57. Arquitectura modular de las proteínas quiméricas Q4 y Q5. Representación esquemática de los dominios que componen las quimeras Q4 y Q5. En naranja se muestra el dominio N-terminal de BzdR (NBzdR) y en morado la proteína siquimato quinasa I de *E. coli* (SKI), con la sustitución D168A (SKI_{D36A}) en el caso de la quimera Q5.

En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con la quimera Q4 sobre el promotor P_N , en presencia o ausencia de siquimato y ATP. Si bien la quimera Q4 era capaz de unirse al promotor P_N con una afinidad ligeramente menor a la de la quimera Q1 en ausencia de ligandos, no fue capaz de despegarse del promotor P_N cuando las reacciones se realizaron en presencia de siquimato y/o ATP (Figs. 58A y 58B).

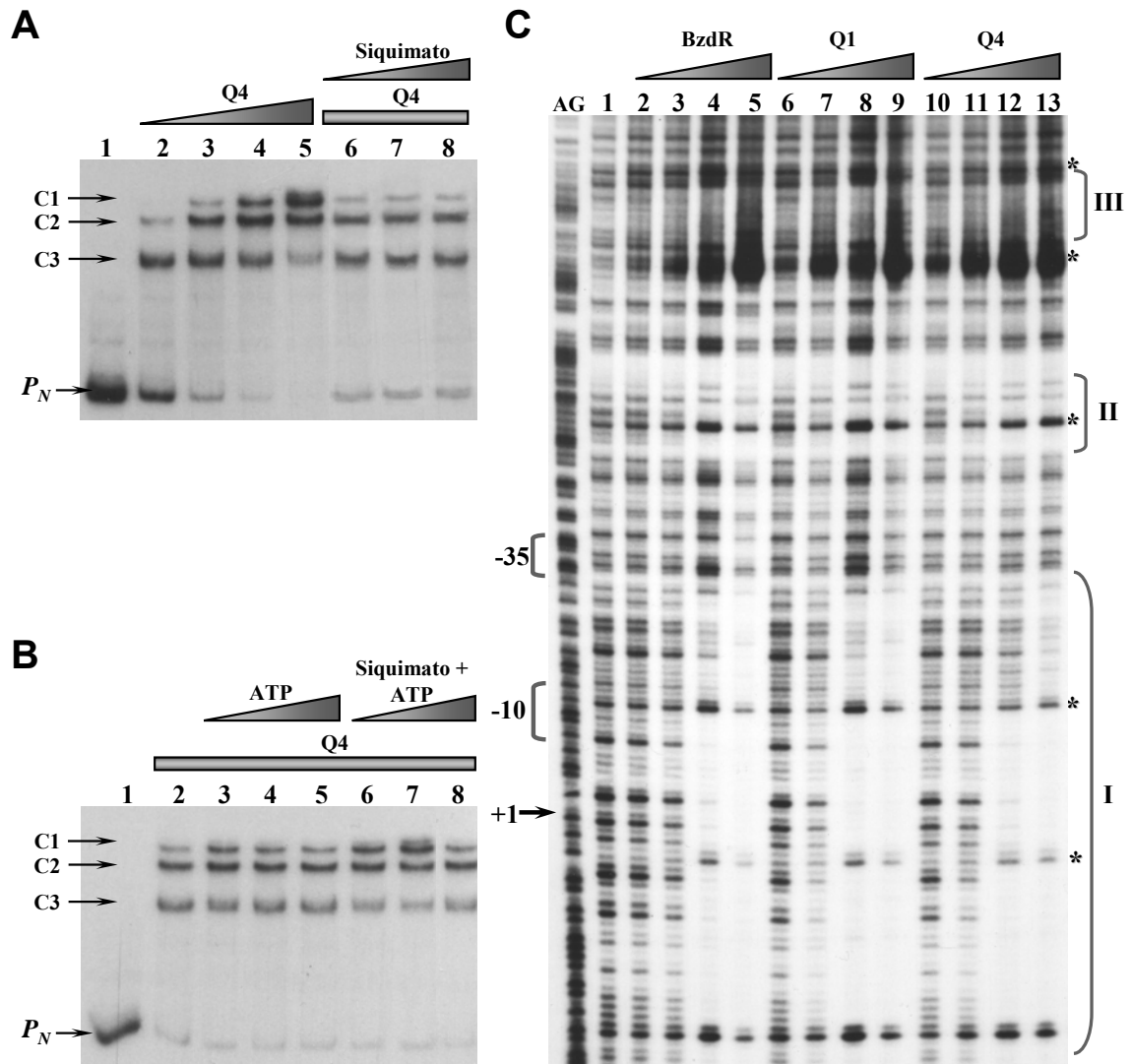


Figura 58. A) y B) Ensayos de retardo en gel de la interacción de la proteína Q4 con el promotor P_N . Calles 1, sonda P_N libre. En el panel A, en las calles 2-5 se añadió proteína His₆-Q4 a concentraciones crecientes de 5, 10, 25 y 50 nM, respectivamente. En las calles 6-8, se añadió proteína His₆-Q4 a una concentración de 10 nM, así como concentraciones crecientes 0.5, 2 y 4 mM, respectivamente, de siquimato. En el panel B, en las calles 2-8 se añadió proteína His₆-Q4 a una concentración de 10 nM. En las calles 3-5 y 6-8 se añadieron concentraciones crecientes 0, 2 y 4 mM de ATP y de siquimato + ATP, respectivamente. **(C) Ensayo de protección frente a la digestión por DNasa I de la interacción de las proteínas BzdR, Q1 y Q4 con el promotor P_N .** Calle 1, sonda P_N libre. En las calles 2-5, 6-9 y 10-13 se añadieron concentraciones crecientes 25, 50, 100 y 200 nM de las proteínas purificadas His₆-BzdR, His₆-Q1 e His₆-Q4, respectivamente. En la calle AG fue cargada la reacción de secuenciación A+G de Maxam y Gilbert del promotor P_N . A la derecha, se pueden apreciar las 3 regiones operadoras del promotor P_N protegidas por las proteínas, así como los nucleótidos hipersensibles a la digestión por DNasa I (señalados con asteriscos). También se indican a la izquierda las regiones -35, -10 y +1 del promotor P_N .

Por otro lado, con el fin de determinar si las proteínas BzdR, Q1 y Q4 protegían las mismas regiones operadoras del promotor P_N , se llevó a cabo un ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I. Como se puede observar en la Figura 58C, las tres

proteínas mostraron huellas de protección similares, lo que sugería que la interacción DNA-proteína se producía del mismo modo en los tres casos.

Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de transcripción *in vitro* con la quimera Q5 usando como molde el plásmido pJCD- P_N (Tabla 5). A diferencia de los resultados obtenidos con la quimera Q2 (Figs. 54, 55 y 56), la quimera Q5 mantuvo la represión sobre el promotor P_N en presencia de siquimato, de ATP o de ambos (Fig. 59A).

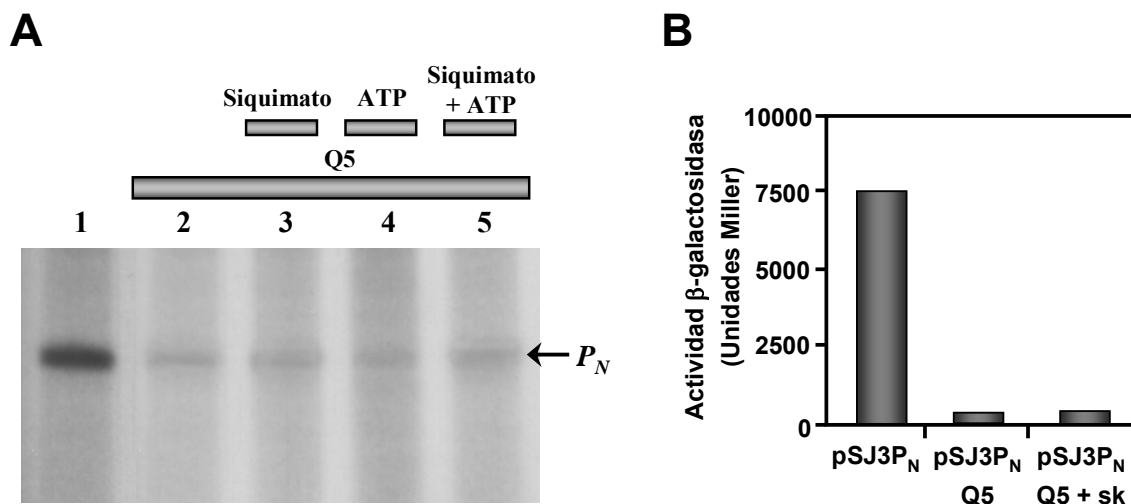


Figura 59. (A) Efecto del siquimato y/o el ATP en la represión del promotor P_N por la quimera Q5 *in vitro*. Se llevaron a cabo reacciones de transcripción *in vitro* de múltiples rondas utilizando como molde el plásmido pJCD- P_N , que incorpora el promotor P_N desde el cual se expresa un RNAm de 184 nt (ver apartado 6.2 de Materiales y Métodos). En todas las reacciones se añadió RNAP 50 nM y proteína His₆-Fnr* 20 nM. En las calles 2-5 se añadió proteína purificada His₆-Q5 50 nM. En las calles 3, 4 y 5 se añadió siquimato, ATP y siquimato + ATP 2 mM, respectivamente. **(B) Efecto del siquimato en la represión del promotor P_N por la quimera Q5 *in vivo*.** La cepa *E. coli* MC4100 (pSJ3- P_N), que incorpora la fusión P_N ::*lacZ* en multicopia (pSJ3 P_N), fue transformada con el plásmido pCK01-Q5 (Tabla 5). El crecimiento se llevó a cabo en LB y en condiciones anaeróbicas. La cepa que expresaba la proteína His₆-Q5 fue cultivada en ausencia (pSJ3 P_N Q5) o en presencia (pSJ3 P_N Q5 + sk) de siquimato 5 mM. Posteriormente, se midió su actividad β -galactosidasa tal y como se detalla en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

Por último, el gen que codifica la quimera Q5 fue subclonado en el plásmido pCK01, y el plásmido resultante (pCK01-Q5, Tabla 5) expresado en la cepa *E. coli* MC4100 (pSJ3- P_N). Cuando esta cepa recombinante se cultivó en presencia o ausencia de siquimato, no se pudo detectar actividad β -galactosidasa (Fig. 59B), lo que indicaba que la quimera Q5 tampoco era capaz de responder al siquimato *in vivo*, y por lo tanto funcionaba como un “super-represor” del promotor P_N .

Todos estos resultados tomados en conjunto indicaban que la región LBzdR es imprescindible en la transmisión de la información desde el dominio SKI hasta el

dominio NBzdR, ya que su ausencia daba lugar a “super-represores” del promotor P_N incapaces de responder al inductor, el siquimato.

Objetivo 5. Estudio de la arquitectura del promotor P_N y su interacción con la proteína BzdR

En el promotor P_N , la región de interacción con la proteína BzdR se extiende desde la posición -146 a la posición +31 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1). A lo largo de esta región se pueden distinguir 3 cajas operadoras bien diferenciadas: región I (desde +31 a -32), región II (desde -63 a -83) y región III (desde -126 a -146), como se puede apreciar en la Figura 60 (Barragán *et al.*, 2005). Con el objetivo de profundizar en el estudio de la arquitectura del promotor P_N y su interacción con el represor BzdR se llevaron a cabo tanto experimentos *in vitro* como *in vivo*.

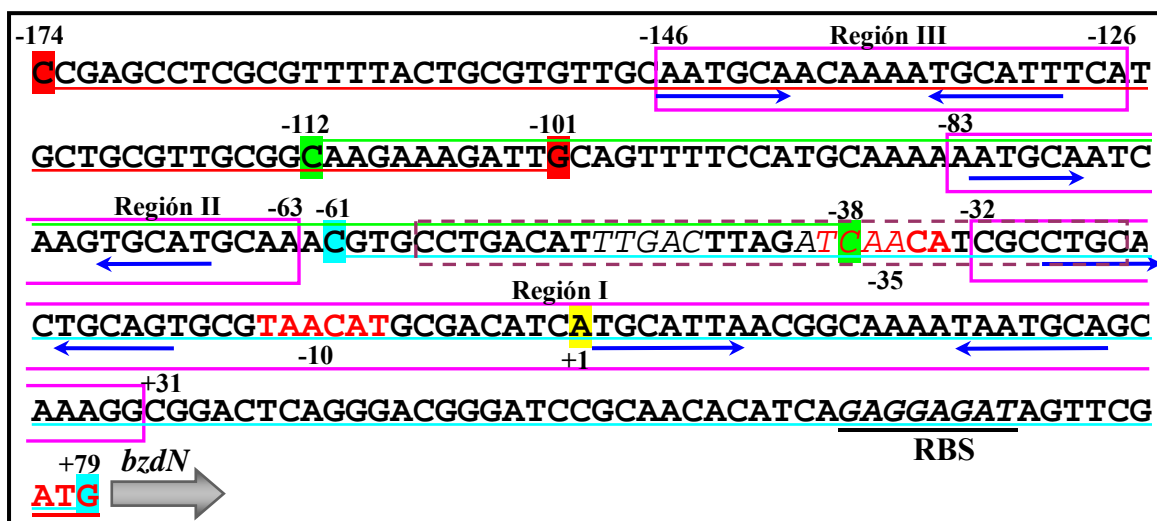


Figura 60. Estructura primaria del promotor P_N . Secuencia del promotor P_N desde la posición -174 a la +79, con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1, indicado en amarillo). Se han señalado todas las posiciones que acotan cada una de las regiones operadoras I, II y III, de interacción con la proteína BzdR recuadradas en color rosa. También se indican las secuencias y las posiciones que acotan las sondas mI (línea azul), mII (línea verde) y mIII (línea roja). Las flechas azules indican las secuencias palindrómicas presentes en cada una de ellas. El recuadro en línea discontinua muestra la región protegida por AcpR, conteniendo las secuencias palindrómicas que reconoce en cursiva. Igualmente, se han señalado las cajas -10 y -35 en letras rojas, la región de unión del ribosoma (RBS) subrayada en negro y en cursiva, y el codón de iniciación (ATG) del gen *bzdN*, subrayado en color rojo.

5.1 Estudios *in vitro* de la interacción de BzdR con las distintas regiones operadoras del promotor P_N

Se amplificaron por separado cada una de las tres regiones operadoras del promotor P_N para estudiar su interacción con BzdR mediante ensayos *in vitro*. Así, se obtuvieron las siguientes sondas: mI (incluye la región I), de +79 a -61, mII (incluye la región II), de -38 a -112, mIII (incluye la región III), de -101 a -174 (Fig. 60).

Cuando se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con estas sondas y la proteína BzdR purificada, en todos los casos se obtuvieron complejos de retardo, si bien BzdR mostró la mayor afinidad por la sonda mI, la cual era totalmente retardada a una concentración de BzdR 250 nM ($K_d \sim 10$ nM), la menor afinidad por la sonda mII ($K_d \sim 250$ nM) y una afinidad intermedia ($K_d \sim 50$ nM) por la sonda mIII (Fig. 61). Merece la pena destacar que cuando se utilizó el promotor P_N completo como sonda ésta era retardada completamente a una concentración de BzdR 50 nM (Fig 30A).

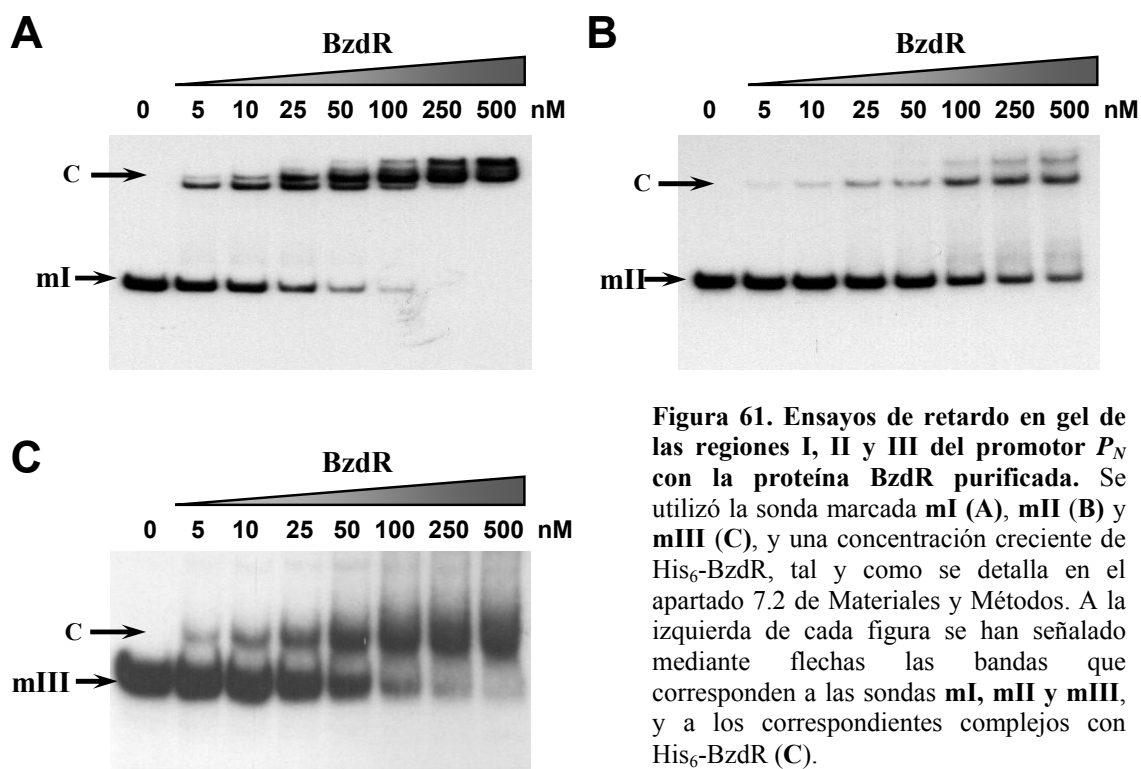


Figura 61. Ensayos de retardo en gel de las regiones I, II y III del promotor P_N con la proteína BzdR purificada. Se utilizó la sonda marcada mI (A), mII (B) y mIII (C), y una concentración creciente de His₆-BzdR, tal y como se detalla en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. A la izquierda de cada figura se han señalado mediante flechas las bandas que corresponden a las sondas mI, mII y mIII, y a los correspondientes complejos con His₆-BzdR (C).

También se llevaron a cabo ensayos de protección frente a la digestión por DNasaI con las 3 sondas y la proteína BzdR, donde pudieron apreciarse las regiones protegidas en cada caso (Fig. 62). En los tres casos, las regiones protegidas por la proteína BzdR en las sondas mI, mII y mIII, coincidieron con las regiones I, II y III, respectivamente, protegidas por BzdR en el promotor P_N completo (Fig. 30B).

Todos estos resultados tomados en conjunto y comparados con los obtenidos con el promotor P_N completo, parecían indicar que, aunque BzdR es capaz de reconocer e interaccionar independientemente con cada una de las regiones operadoras, la presencia simultánea de las tres regiones en el promotor P_N completo incrementa la afinidad del represor BzdR por su DNA diana.

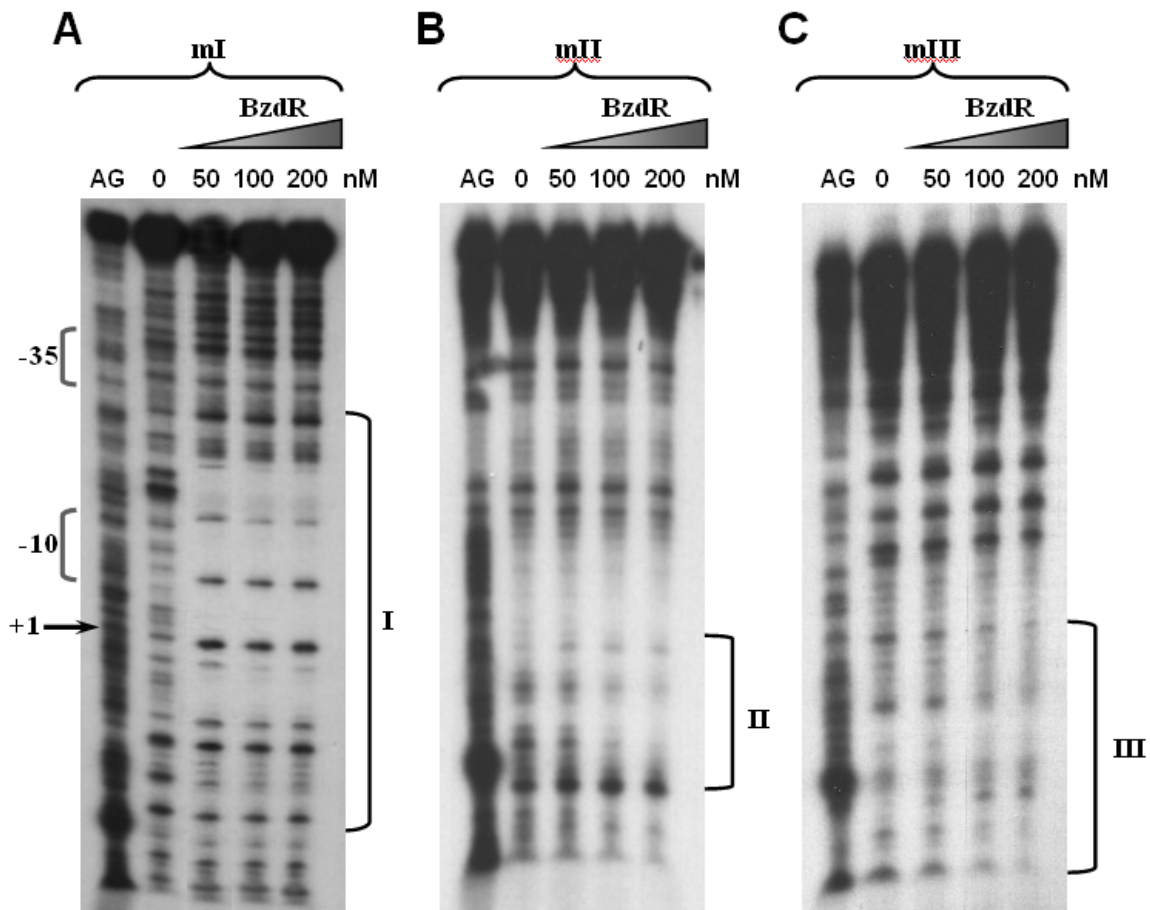


Figura 62. Ensayo de protección frente a la digestión por DNasa I de la interacción de la proteína BzdR con las regiones I (A), II (B) y III (C) del promotor P_N . En cada uno de los ensayos se utilizó la sonda marcada correspondiente (**mI** en panel **A**, **mII** en panel **B** y **mIII** en panel **C**), y una concentración creciente de His₆-BzdR, tal y como se indica. En la calle **AG** fue cargada la reacción de secuenciación A+G de Maxam y Gilbert, llevada a cabo con cada una de las sondas, tal y como se detalla en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos. A la derecha de cada figura se han señalado mediante corchetes las regiones operadoras I, II y III protegidas por la proteína His₆-BzdR en cada caso. También se indican el sitio de inicio de la transcripción (+1) y las cajas -10 y -35 en el panel A.

5.2 Estudios *in vivo* de la represión de BzdR sobre variantes truncadas del promotor P_N

Se llevaron a cabo ensayos *in vivo* con variantes truncadas del promotor P_N que contenían la región I (de +79 a -32) ó la región I+II (de +79 a -112), con el fin de observar posibles diferencias de actividad promotora con respecto al promotor P_N completo. Para ello, se clonaron las sondas mI y mI+II en el plásmido pSJ3, dando lugar a las fusiones traduccionales $P_{NI}::lacZ$ y $P_{NI+II}::lacZ$ (ver apartado 3.9 de Materiales y Métodos). Estas construcciones fueron transformadas en la cepa *E. coli* MC4100 en presencia o en ausencia del plásmido pCK01-BzdR que expresa el gen *bzdR*. Mediante ensayos de actividad β -galactosidasa se pudo comprobar que tanto la región I como la I+II generaban promotores cuyos niveles de actividad eran semejantes a los obtenidos

con el promotor P_N completo. De igual forma, la proteína BzdR era capaz de reprimir la actividad de los promotores P_{NI} y P_{NI+II} tan eficientemente como lo hacía con el promotor P_N (Fig. 63).

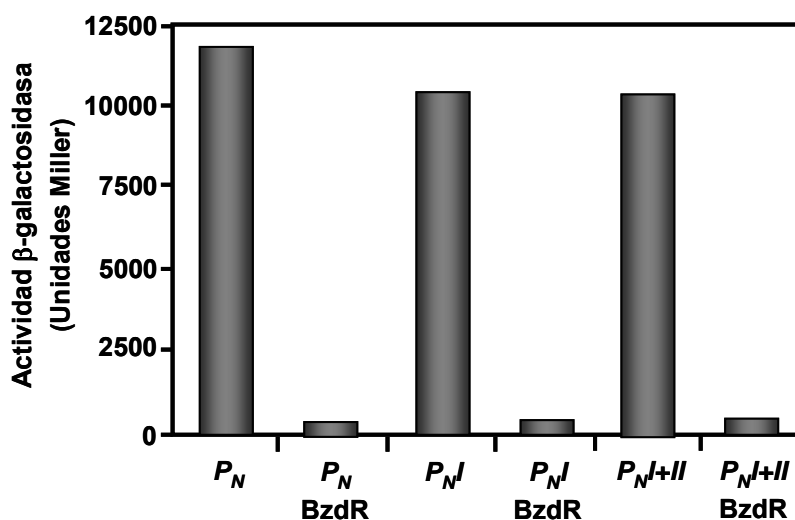


Figura 63. Ensayo *in vivo* de la acción de la proteína BzdR sobre los promotores P_N , P_{NI} y P_{NI+II} . Las cepas *E. coli* MC4100 (pSJ3- P_N), *E. coli* MC4100 (pSJ3- P_{NI}) y *E. coli* MC4100 (pSJ3- P_{NI+II}), que expresan las fusiones $P_N::lacZ$ (P_N), $P_{NI}::lacZ$ (P_{NI}) y $P_{NI+II}::lacZ$ (P_{NI+II}), respectivamente, fueron también transformadas con el plásmido pCK01-BzdR (P_N BzdR, P_{NI} BzdR y P_{NI+II} BzdR). El crecimiento se llevó a cabo en LB y en condiciones anaeróbicas durante 16 horas. Posteriormente, se midió su actividad β -galactosidasa tal y como se detalla en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos semejantes en *Azoarcus* sp. CIB. Para ello, se clonaron las sondas mI y $mI+II$ en el vector pBBR1MCS-5 (Tabla 5), dando lugar a los plásmidos pBBR5 P_{NI} y pBBR5 P_{NI+II} , que contienen las fusiones traduccionales $P_{NI}::lacZ$ y $P_{NI+II}::lacZ$ (ver apartado 3.9 de Materiales y Métodos). Estas construcciones fueron introducidas mediante conjugación en la cepa *Azoarcus* sp. CIB. Mediante ensayos de actividad β -galactosidasa se pudo comprobar que los niveles de represión del promotor P_{NI+II} cuando las células eran cultivadas en presencia de succinato eran semejantes a los observados con el promotor P_N completo. Sin embargo, en el caso del promotor P_{NI} , la represión era peor, alcanzando valores cercanos al doble de los observados con el promotor P_N completo. De igual modo, cuando las células eran cultivadas en presencia de benzoato (condiciones de inducción), los promotores P_{NI+II} y P_N mostraron niveles de actividad similares y, en cualquier caso, inferiores a los mostrados por el promotor P_{NI} (Fig. 64).

Todos estos resultados sugerían que la interacción del represor BzdR con el promotor P_{NI} era más débil que la mostrada con el promotor completo P_N .

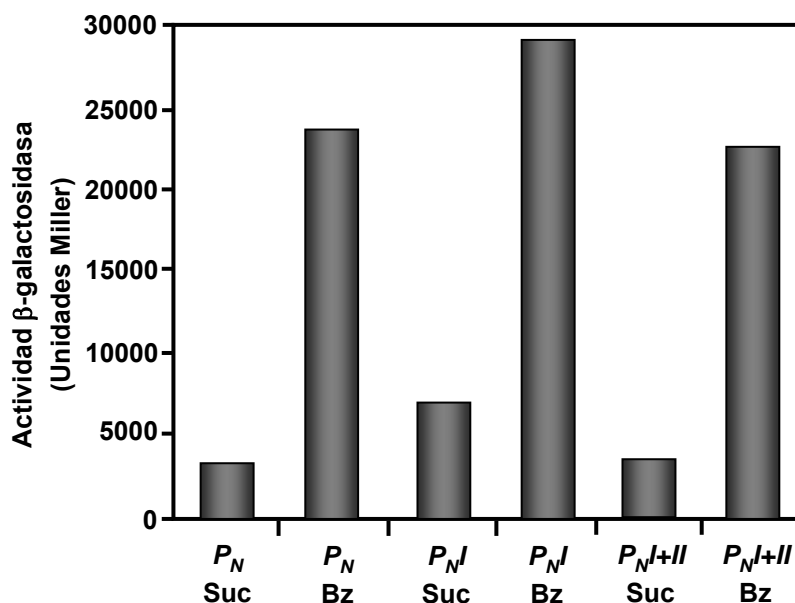


Figura 64. Ensayo *in vivo* de la expresión de los promotores P_N , P_{NI} y P_{NI+II} en *Azoarcus* sp. CIB. Las cepas *Azoarcus* sp. CIB (pBBR5 P_N), *Azoarcus* sp. CIB (pBBR5 P_{NI}) y *Azoarcus* sp. CIB (pBBR5 P_{NI+II}), que expresan las fusiones $P_N::lacZ$ (P_N), $P_{NI}::lacZ$ (P_{NI}) y $P_{NI+II}::lacZ$ (P_{NI+II}), respectivamente, fueron cultivadas anaerómicamente durante 24-72 h en medio mínimo MC en presencia de succinato 0.2% (Suc) y benzoato 3 mM (Bz). Posteriormente, se midió su actividad β-galactosidasa tal y como se detalla en el apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos. Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes, y presentaron una desviación estándar menor del 10%.

5.3 Estequiometría de la interacción BzdR/ P_N

Con el fin de elucidar el número de moléculas del represor BzdR que interactúan con el promotor P_N , se llevaron a cabo diversos experimentos de ultracentrifugación analítica de los complejos proteína/DNA.

En primer lugar, se purificó una sonda de 253 pb (desde la posición -174 hasta la posición +79) que incluye las tres regiones (I, II y III) reconocidas por BzdR, denominada P_NU (Fig. 60). Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron fijando la concentración de sonda P_NU a 0.2 μM, y variando la concentración de proteína desde 0.2 μM hasta 10 μM (ver apartado 7.5 de Materiales y Métodos) (Fig. 65). Los complejos proteína/DNA comenzaban a formarse cuando la concentración de BzdR era en torno a 1 μM. En estas condiciones, la masa molecular calculada para el complejo indicaba que se encontraban unidas 2 moléculas de BzdR. Cuando la

concentración de BzdR utilizada era de 2 μM , el número de moléculas de regulador unidas a la sonda P_NU se estimó entre 8 y 10, pero la calidad de los datos no permitió afinar más en esta estimación (Fig. 65). A concentraciones superiores de proteína, se formaban agregados que migraban rápidamente al fondo del tubo de centrifuga y, por tanto, no permitían su análisis. De esta forma, los datos obtenidos sugerían que el tipo de unión entre BzdR y el promotor P_N era cooperativa y parecía saturarse en 8-10 moléculas de proteína por molécula de DNA.

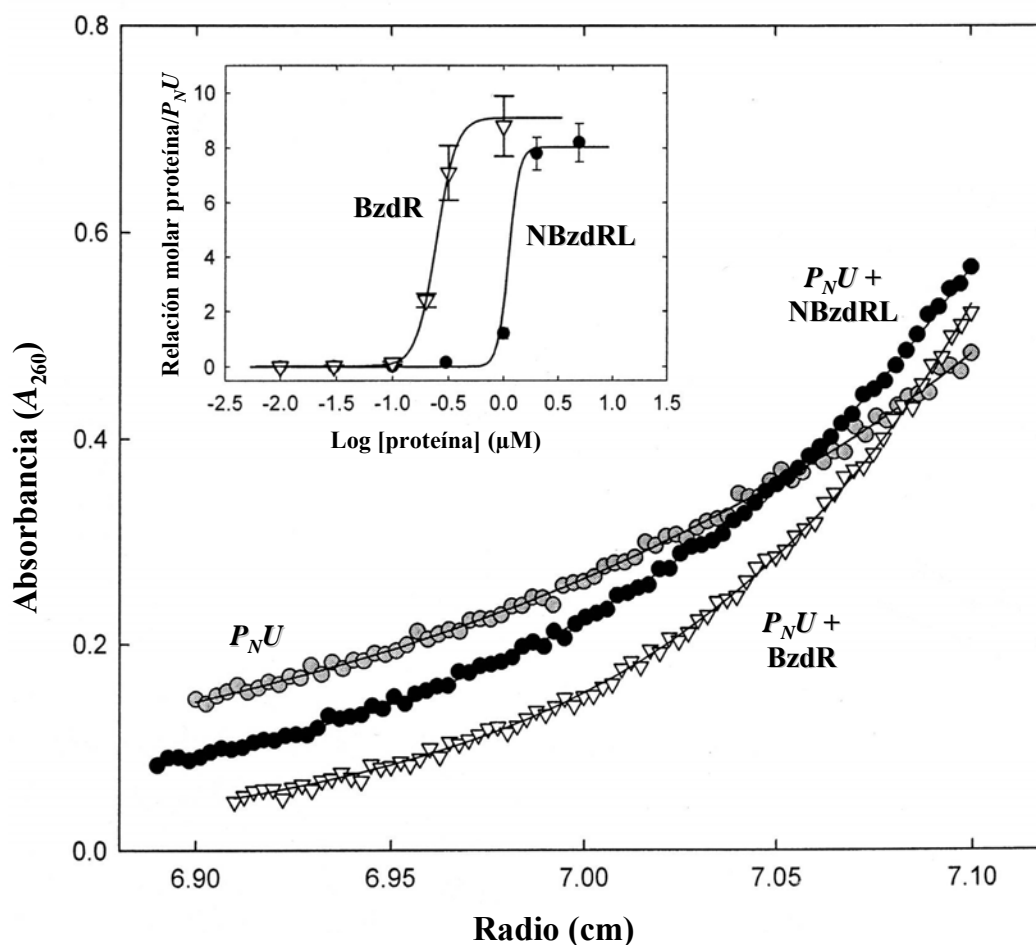


Figura 65. Análisis mediante equilibrio de sedimentación de la interacción de las proteínas purificadas BzdR y NBzdRL con la sonda P_NU y de NBzdRL con la sonda mI. (A) Distribución del gradiente en equilibrio de sedimentación de la sonda P_NU (círculos grises), del complejo $P_NU + \text{NBzdRL}$ (círculos negros) y del complejo $P_NU + \text{BzdR}$ (triángulos blancos). La gráfica interior muestra la relación molar de proteína/DNA a medida que se incrementa la concentración de BzdR (triángulos blancos) o de NBzdRL (círculos negros).

A continuación, se llevó a cabo el mismo tipo de ensayo con el dominio NBzdRL, con el fin de intentar evitar problemas de agregación, puesto que esta proteína era más soluble que BzdR, y permitía alcanzar concentraciones de hasta 8 μM . Cuando se utilizó

una concentración de proteína NBzdRL de 1 μM , la masa molecular calculada para el complejo sugería que se encontraban unidas 2 moléculas de proteína. Si tan sólo se aumentaba la concentración de proteína al doble, 2 μM , se obtenía un valor de 8 moléculas unidas. Al aumentar la concentración de proteína a 8 μM , el sistema quedaba saturado y no se superaban las 8 moléculas de NBzdRL por molécula de P_NU (Fig. 65). Por lo tanto, se pudo establecer claramente que la unión entre el regulador y el promotor P_NU era de tipo cooperativo, ya que se pasaba de dos a ocho moléculas (correspondiente al nivel de saturación) de regulador unidas en un rango de concentración del regulador inferior a un orden de magnitud (de 1 μM a 2 μM) (Fig. 65).

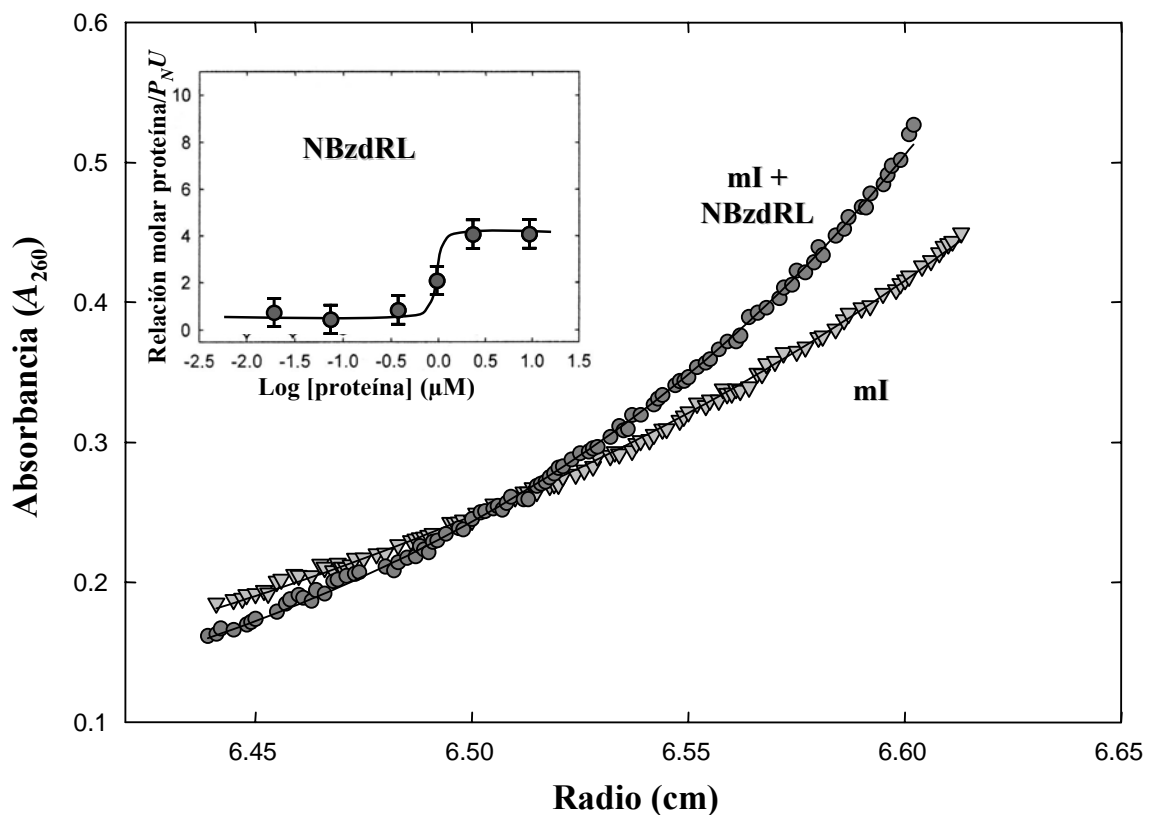


Figura 66. Análisis mediante equilibrio de sedimentación de la interacción de la proteína purificada BzdR y NBzdRL con la sonda P_NU y de NBzdRL con la sonda mI. (A) Distribución del gradiente en equilibrio de sedimentación de la sonda mI (triángulos), y del complejo mI + NBzdRL (círculos). La gráfica interior muestra la relación molar de proteína/DNA a medida que se incrementa la concentración de NBzdRL (círculos).

De igual modo, se llevó a cabo este ensayo con la proteína NBzdRL y la sonda mI (la misma que la utilizada en los experimentos *in vitro*), que sólo incluye la región operadora I y, por tanto, dos de las regiones palindrómicas del promotor P_N . En este caso, cuando se utilizó una concentración de proteína NBzdRL de 1 μM , la masa

molecular calculada para el complejo sugería que se encontraban unidas 2 moléculas de proteína. Si tan sólo se aumentaba la concentración de proteína al doble, $2 \mu\text{M}$, se obtenía un valor de 4 moléculas unidas. Al aumentar la concentración de proteína a $8 \mu\text{M}$, el sistema quedaba saturado y no se superaban las 4 moléculas de NBzdRL por molécula de mI (Fig. 66). Al igual que en el caso del promotor P_{NU} , se pudo establecer que la unión entre el regulador y la sonda mI era de tipo cooperativo, ya que se pasaba de dos a cuatro moléculas (correspondiente al nivel de saturación) de regulador unidas en un rango de concentración del regulador inferior a un orden de magnitud (de $1 \mu\text{M}$ a $2 \mu\text{M}$) (Fig. 66), lo que está de acuerdo con el hecho de que en este caso la sonda de DNA sólo posea dos de las regiones palindrómicas reconocidas por BzdR, a la cual se estarían uniendo dos dímeros de NBzdRL.

5.4 Visualización de la interacción BzdR/ P_N mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

La técnica de AFM, detallada en el apartado 7.8 de Materiales y Métodos, permite visualizar directamente los complejos proteína/DNA dispuestos sobre una superficie atómicamente plana, facilitando los estudios sobre la topología y estequiometría de dichos complejos.

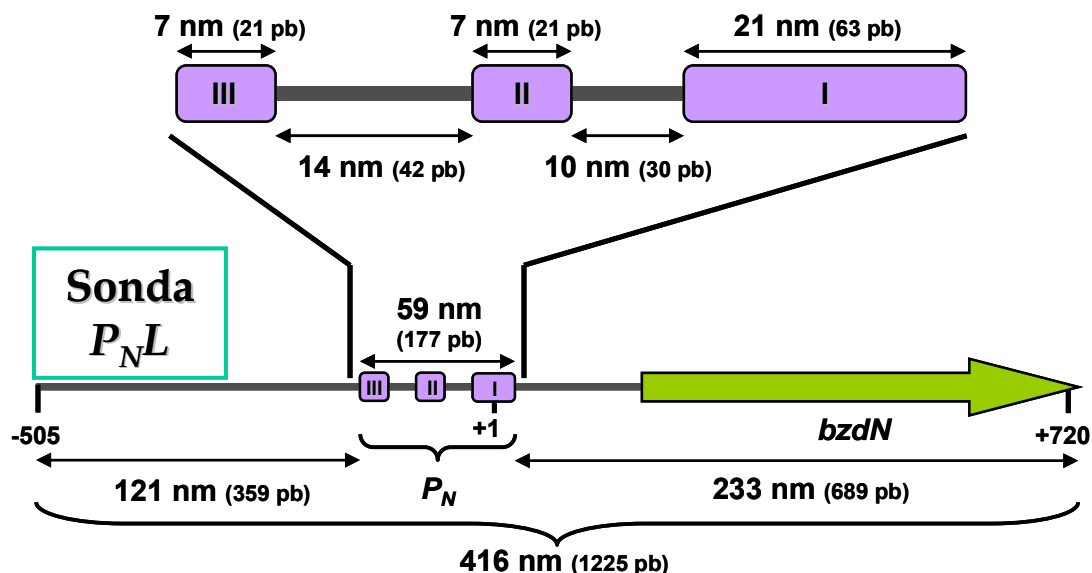


Figura 67. Esquema de la sonda P_{NL} utilizada en los ensayos de AFM. La sonda de DNA P_{NL} se extiende desde la posición -505 hasta la +720, respecto del sitio de inicio de la transcripción del promotor P_N (+1) indicado en la figura, incluyendo parte del gen estructural $bzdN$, representado con una flecha verde. Las regiones operadoras reconocidas por BzdR han sido representadas mediante cajas moradas con su correspondiente número en el interior (I, II ó III), y ampliadas en la zona superior. Se indican las distancias que separan cada una de las regiones señaladas y, entre paréntesis, el número de pares de bases correspondientes.

Cuando se analizó la interacción entre la proteína BzdR purificada y la sonda P_NL (Fig. 67), utilizando una relación 50:1 de [proteína]:[DNA] (ver apartado 7.8.1 de Materiales y Métodos), se observaron distintos tipos de complejos BzdR/ P_NL . De este modo, se pudieron visualizar interacciones de BzdR con las regiones I, III, I+II, I+III, II+III y I+II+III (Fig. 68A).

A modo de ejemplo, en la imagen de la Figura 68B, se puede observar la sonda P_NL interaccionando con la proteína BzdR en la región I. Al analizar el perfil de la hebra se pudo determinar una altura homogénea, en torno a los 3 nm en el caso del complejo BzdR/DNA en la región I, y en torno a 1.7 nm en el caso del DNA desnudo (Fig. 68C). Además, la imagen de este complejo muestra dos zonas bien diferenciadas, lo que se traduce en dos picos en la gráfica, sugiriendo que, en la región I, se encuentran unidos dos dímeros de BzdR.

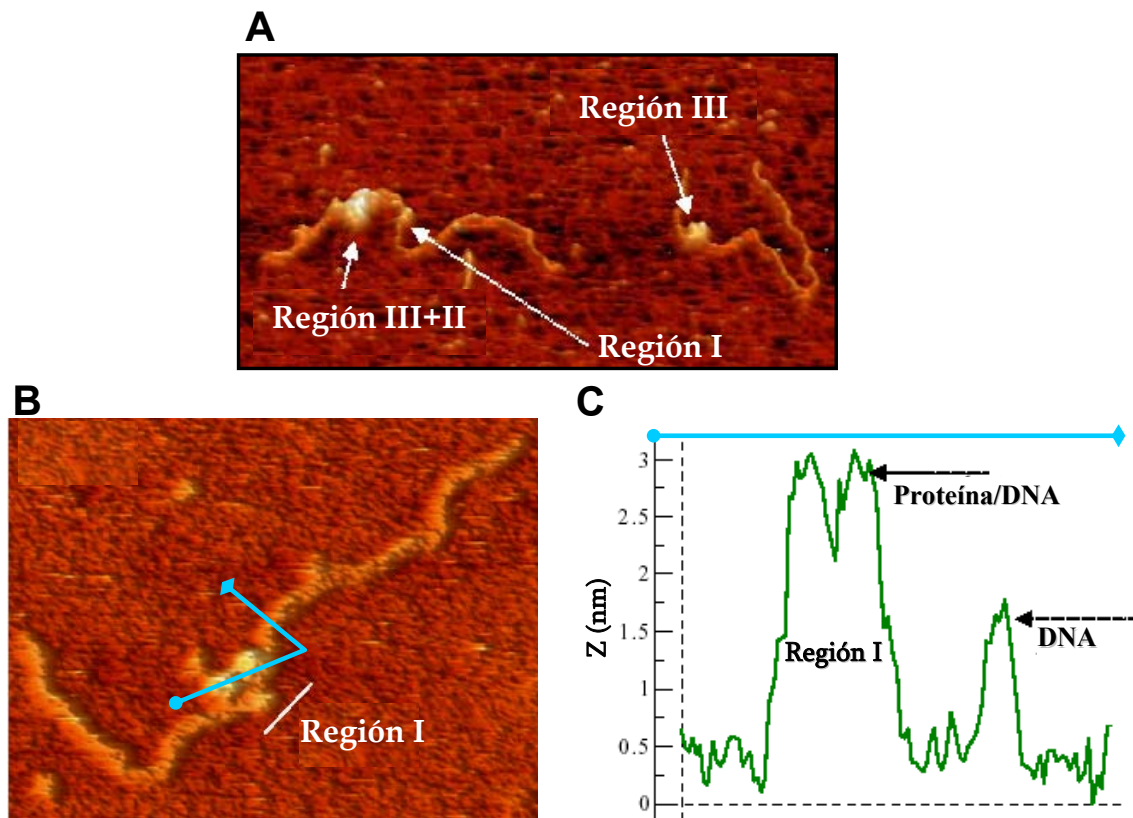


Figura 68. (A) Imagen de la interacción de la proteína BzdR con diversas regiones de la sonda P_NL . (B) Imagen de la interacción de BzdR con la región I de la sonda P_NL . La línea azul muestra el perfil analizado en el panel C. (C) Perfil de la hebra de DNA y del complejo con BzdR. En el eje Z se representa la altura (en nm). La línea azul representa la sección perfilada de la imagen del panel B. Los dos primeros picos indican la altura del complejo proteína/DNA en la región I (~3 nm). El tercer pico indica la altura de la doble hebra de DNA desnudo (~1.7 nm).

Además, a lo largo de todos los análisis realizados, se pudo encontrar una superestructura más compacta que el resto, que se repetía con cierta frecuencia, por lo que se llevó a cabo un análisis más detallado de ésta y de las regiones protegidas por la proteína BzdR. Para tratar de elucidar este punto, se midió la longitud de los brazos emergentes de estas superestructuras obteniendo unos valores promedio de 108.9 ± 20 nm y 199.9 ± 44.2 nm ($N = 16$) (Fig. 69A). Estos valores fueron menores que los esperados para las distancias teóricas desde la región III (121 nm) y la región I (233 nm) hasta los extremos de la sonda P_NL (Fig. 67). Sin embargo, estas medidas estaban de acuerdo con un complejo proteína/DNA en el que la proteína interacciona con las regiones I, II y III, y el DNA se dispone en forma de lazo alrededor del complejo proteico, siendo la longitud de dicho lazo de 99.4 ± 14 nm ($N = 14$). Con esta disposición en lazo, la longitud total de la sonda P_NL (416 nm) se reduce en un 4% con un valor promedio de 398.6 ± 28.9 nm ($N = 14$), lo que está de acuerdo con la longitud de la sonda observada en las imágenes (Fig. 69A).

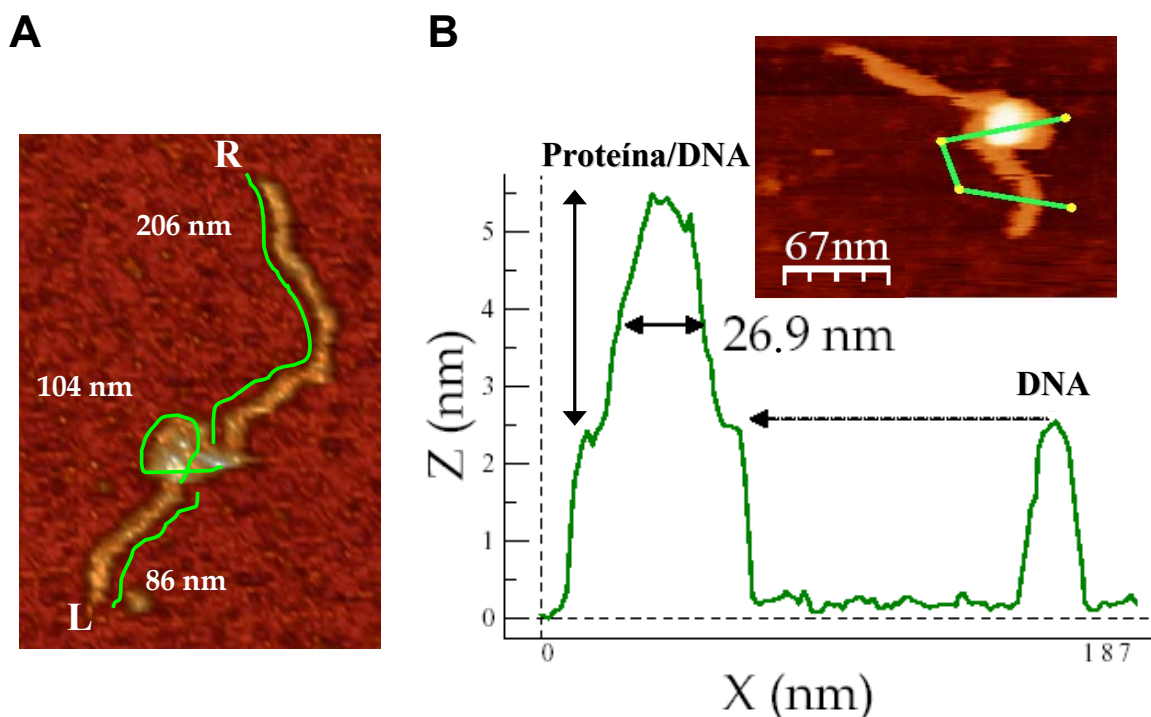


Figura 69. (A) Imagen de una superestructura del complejo BzdR/ P_NL . En la imagen se han detallado las distancias tanto de los brazos, como del lazo de la superestructura. L y R indican el extremo izquierdo y derecho de la sonda P_NL , respectivamente. **(B) Imagen de una superestructura BzdR/DNA y su correspondiente perfil de altura.** La línea verde de la imagen se corresponde con el perfil trazado en la gráfica inferior. En dicha gráfica, en el eje X se representa la longitud de la hebra y en el eje Z, la altura (ambos en nm). El primer pico se corresponde con la superestructura y el segundo pico con el DNA desnudo.

Adicionalmente, se midió la anchura de estas superestructuras a la mitad de su altura, tal y como se muestra en la Figura 69B, obteniéndose un valor de 26.9 ± 6 nm ($N = 10$). Esta anchura, dado que la altura del dímero de BzdR está en torno a los 5 nm (Fig. 28), sería compatible con 4-5 dímeros (8-10 moléculas) de BzdR interaccionando con las regiones I, II y III, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de ultracentrifugación analítica (Fig. 65).

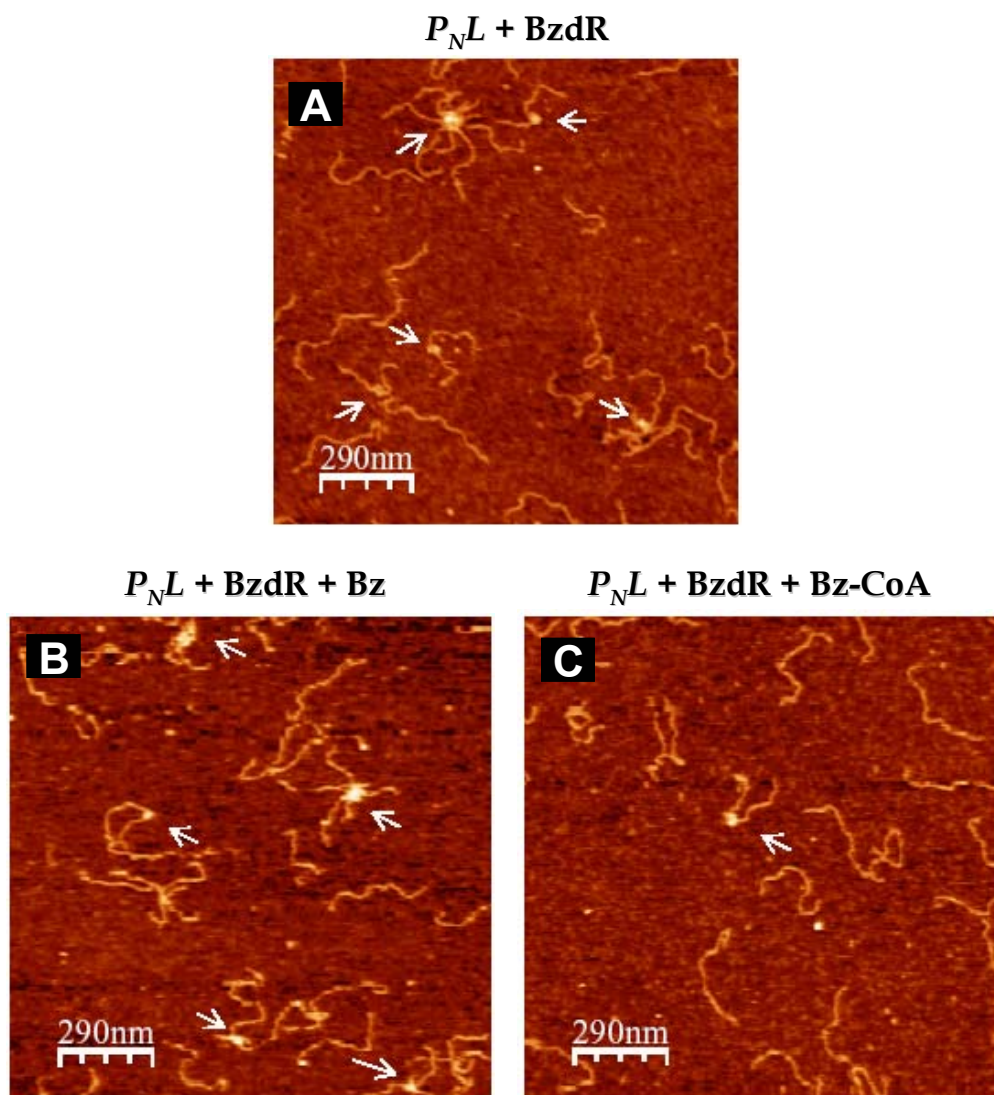


Figura 70. Imágenes de los complejos BzdR/ $P_N L$ en ausencia o presencia de distintos compuestos. (A) Sonda $P_N L + BzdR$. (B) Sonda $P_N L + BzdR +$ benzoato 2 mM. (C) Sonda $P_N L + BzdR +$ benzoyl-CoA 2 mM. Las flechas blancas señalan los complejos visibles en cada uno de los campos.

Finalmente, se trató de determinar el efecto del benzoyl-CoA en la formación de los complejos BzdR/sonda $P_N L$. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de unión de la sonda $P_N L$ y BzdR a una relación 1:42, en presencia de benzoyl-CoA ó benzoato (utilizado

como control negativo). Como se puede observar en la Figura 70, al añadir benzoil-CoA se apreciaba una disminución del número de complejos proteína/DNA, mientras que en presencia de benzoato, esto no sucedía. Estos resultados están de acuerdo con el papel inductor del benzoil-CoA y son consistentes con los datos bioquímicos que sugieren el despegue de la proteína BzdR del promotor P_N en presencia de benzoil-CoA.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Al inicio de este trabajo, la regulación del *cluster bzd* en *Azoarcus* sp. CIB mediada por el regulador BzdR ya había sido descrita y caracterizada (Barragán *et al.*, 2005). Sin embargo, aún quedaban muchos aspectos por estudiar tanto de la regulación y de la arquitectura del promotor P_N como de la proteína BzdR, algunos de los cuales han sido objetivos de esta tesis.

Discusión 1. Estudio de la regulación dependiente de oxígeno de la ruta de degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Uno de los primeros objetivos de esta tesis fue el estudio de la regulación sobreimpuesta del *cluster* de degradación anaeróbica de benzoato (*bzd*) mediada por oxígeno en la β -proteobacteria *Azoarcus* sp. CIB.

El papel del oxígeno en la expresión de los genes involucrados en rutas de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos ya ha sido estudiado en algunos microorganismos. Por ejemplo, cabe destacar el operón *badDEFG* de la α -proteobacteria *Rhodopseudomonas palustris*, que codifica las 4 subunidades de la benzoil-CoA reductasa, cuya expresión se ve drásticamente reprimida en condiciones de crecimiento aeróbicas (Egland y Harwood, 1999). De igual forma, la síntesis de benzoil-CoA reductasa de la β -proteobacteria *Thauera aromatica* se encuentra totalmente reprimida en presencia de oxígeno (Boll y Fuchs, 1995), al igual que ocurre con los genes *bss* que codifican la enzima bencilsuccinato sintasa, implicada en la degradación de tolueno en el microorganismo *Magnetospirillum magnetotacticum* TS-6 o en *Azoarcus* sp. CIB, cuya transcripción únicamente tiene lugar en cultivos anaeróbicos.

Sin embargo, en la literatura existen algunos casos en los que los genes que codifican enzimas sensibles a oxígeno, como es el caso de la benzoil-CoA reductasa de *M. magnetotacticum* TS-6 (genes *bcr*) (Shinoda *et al.*, 2005) y la bencilsuccinato sintasa de *T. aromatica* DNT-1 (genes *bss*) (Shinoda *et al.*, 2005), son transcritos no sólo bajo condiciones anaeróbicas, sino también en cultivos de células creciendo aeróbicamente en presencia de benzoato y tolueno, respectivamente.

Por lo tanto, parece que cada organismo ha desarrollado una particular estrategia de regulación para controlar la expresión de aquellos genes implicados en el catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos. En el caso del *cluster bzd* de *Azoarcus* sp. CIB se ha demostrado, en este trabajo, que el oxígeno inhibe la expresión de dichos genes (Fig. 10A) y, por lo tanto, la activación de la transcripción de los genes de la ruta de degradación anaeróbica de benzoato depende tanto de la presencia de benzoato, fuente del inductor benzoil-CoA, como de la ausencia de oxígeno.

1.1 La proteína Fnr es un activador del promotor P_N

Experimentos *in vivo* realizados con la fusión traduccional $P_N::lacZ$ en *E. coli* JRG1728 (cepa *fnr*⁻) revelaron que la proteína Fnr es imprescindible para que tenga lugar la activación del promotor P_N (Fig. 10B). Mediante ensayos *in vitro* de protección frente a la digestión con DNasa I se ha podido conocer que la región donde se une la proteína Fnr al promotor P_N está centrada en la posición -42.5 respecto al inicio de la transcripción, conteniendo la secuencia 5'-TTGACTTAGATCAA-3', prácticamente idéntica a la secuencia consenso (5'-TTGAT-N₄-ATCAA-3', donde N corresponde a cualquiera de las cuatro bases nitrogenadas) de la proteína Fnr de *E. coli*, y solapa con la caja -35 de reconocimiento de la RNAP (Figs. 11 y 12), lo que define a P_N como un promotor dependiente de Fnr de clase II (Guest, 1996; Rhodius y Busby, 1998). Aunque las secuencias consenso de unión de Fnr centradas en las posiciones -39.5 y -42.5 fueron postuladas como las responsables de que tuviera lugar la expresión del operón *badDEFG* (Egland y Harwood, 1999) y del gen *hbaR* (Egland y Harwood, 2000) en *R. palustris*, respectivamente, los resultados obtenidos en esta tesis ofrecen la primera evidencia experimental de que Fnr interacciona específicamente con estas secuencias consenso, permitiendo la activación de un promotor (P_N) responsable de la expresión de los genes que codifican proteínas del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB.

Tanto la distancia de 19 pb que separa las secuencias -10 (TAACAT) y -35 (TCAACA) del promotor P_N , ligeramente superior a la distancia consenso (17 pb) típica de los promotores que dependen de la subunidad σ^{70} de la RNAP, como el hecho de que la caja -35 difiera parcialmente de la secuencia consenso (TTGACA) (Fig. 11), podrían explicar la necesidad de la proteína Fnr en la correcta formación del complejo cerrado RNAP:: P_N , imprescindible para que dé comienzo el proceso de la transcripción (Fig. 71). De acuerdo con esta hipótesis, tanto los ensayos de retardo en gel de Fnr* + RNAP

(Fig. 15) como los de protección frente a la digestión con DNasa I (Fig. 12C) mostraron que la presencia de Fnr* facilita el reclutamiento y la interacción de la RNAP con el promotor P_N .

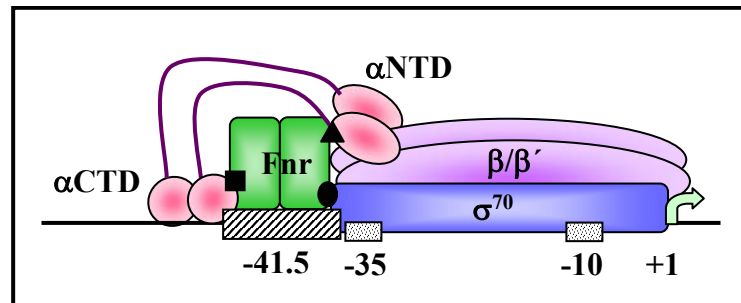


Figura 71. Modelo de los promotores de clase II dependientes de Fnr. Los promotores dependientes de Fnr presentan un sitio de reconocimiento para la proteína Fnr centrada en la posición -41.5 respecto del punto de inicio de la transcripción (+1). La región AR-1 de Fnr (cuadrado negro) hace contacto con el dominio αCTD de la RNAP. La región AR-2 de Fnr (triángulo negro) hace contacto con el dominio αNTD de la RNAP. La región AR-3 de Fnr (círculo negro) hace contacto con la subunidad σ^{70} de la RNAP. También se muestran las subunidades β y β' de la RNAP, así como las cajas -10 y -35 del promotor dependiente de σ^{70} .

Por otro lado, los experimentos de protección frente a la acción del KMnO_4 demostraron que Fnr actúa también promoviendo la transición del complejo cerrado transcripcionalmente inactivo a un complejo abierto transcripcionalmente activo (Fig. 16). Este mismo efecto activador de la transcripción ya ha sido descrito para Fnr en otros promotores de clase II (Tagami y Aiba, 1998; Wing *et al.*, 2000). Por lo tanto, se puede concluir que la activación del promotor P_N por Fnr se lleva a cabo facilitando distintas etapas del proceso de iniciación de la transcripción tales como la formación del complejo cerrado y del complejo abierto $P_N::\text{RNAP}$.

En los resultados *in vitro* obtenidos mediante ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I se pudo apreciar como el aumento en la concentración de RNAP derivaba en una mayor protección del promotor P_N a ambos lados del lugar de unión de la proteína Fnr (Fig. 12C), lo que sugería interacciones entre ambas proteínas. La protección *upstream* respecto del sitio de unión de Fnr podría atribuirse al dominio αCTD de la RNAP, tal y como se ha demostrado en otros promotores de clase II dependientes de Fnr, donde la subunidad αCTD de la RNAP se une al surco menor del DNA, en torno a la posición -61, inmediatamente *upstream* de la región protegida por el dímero de Fnr (Fig. 71), dando lugar a una interacción que contribuye a la activación del promotor (Attey *et al.*, 1994; Busby y Ebright, 1999; Kolb *et al.*, 1993; Wing *et al.*, 2000). Por otro lado, la protección causada por la RNAP *downstream* respecto del sitio

Fnr se debe a la interacción de promotor P_N con la subunidad σ^{70} de la RNAP (Fig. 71). Estudios previos han permitido identificar una pequeña región el dominio C-terminal de la subunidad σ^{70} de la RNAP (residuos 590-603) que es necesaria para que tenga lugar la activación dependiente de Fnr en determinados promotores (Lonetto *et al.*, 1998). Esta región contiene en su secuencia un residuo ácido (Glu591) y seis residuos básicos (Lys593, Arg596, Lys597, Arg599, His600 y Arg603), los cuales, al ser sustituidos, dan lugar a una disminución drástica de la activación de la transcripción dependiente de Fnr (Bell y Busby, 1994; West *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que, en dos de los tres mutantes ensayados, las sustituciones de Lys por Ala de las posiciones 593 (KA593) y 597 (KA597) de la subunidad σ^{70} , redujeron la actividad del promotor P_N (Fig. 13). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos previamente con otros promotores de clase II dependientes de Fnr (Lonetto *et al.*, 1998), y sugieren que el contacto Fnr- σ^{70} juega un papel crucial en la activación del promotor P_N .

Por otro lado, los ensayos de transcripción *in vitro* confirmaron los ensayos *in vivo* y demostraron que Fnr es imprescindible para la actividad del promotor P_N , sugiriendo que la ausencia de actividad del promotor P_N en condiciones aeróbicas es debida a la incapacidad de la proteína Fnr de dimerizar y, por tanto, de unirse a su sitio de reconocimiento en el promotor.

Los estudios realizados con la proteína Fnr de *E. coli* han permitido identificar la necesidad de un regulador adicional que es esencial para la activación del promotor P_N y de cuya existencia no se había sospechado previamente. Con el fin de profundizar en el estudio de la regulación sobreimpuesta dependiente de oxígeno de los genes *bzd*, se procedió a identificar y caracterizar el gen ortólogo de *fnr* en *Azoarcus* sp. CIB.

1.2 AcpR es un activador esencial del promotor P_N en *Azoarcus* sp. CIB

Puesto que el genoma de *Azoarcus* sp. EbN1 está secuenciado (Rabus *et al.*, 2005), se procedió a la búsqueda del gen ortólogo de *fnr* de *E. coli* en el genoma de esta bacteria. De esta forma, se consiguió localizar un gen ortólogo (ebA5149) entre los genes *hemN* (ebA5151), que codifica una coproporfirinógeno III oxidasa, y ebA5146, un gen de función desconocida (Fig. 17). Con esta información se amplificó por medio de PCR el gen ortólogo de *fnr* en *Azoarcus* sp. CIB, el cual fue nombrado como *acpR*.

La asociación de los genes *fnr* y *hemN* en el genoma ya ha sido descrita previamente en otros organismos (Korner *et al.*, 2003).

El gen *acpR* codifica una proteína de 248 aminoácidos que posee una significativa similitud de secuencia con miembros de la superfamilia de reguladores transcripcionales Fnr/Crp. La construcción de una cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB portadora de una interrupción por inserción en el gen *acpR* (*Azoarcus* sp. CIB*dacpR*), y que mostró ser incapaz de crecer anaeróbicamente en diversos compuestos aromáticos, tales como benzoato, fenilacetato o 4-hidroxibenzoato, aunque sí era capaz de degradarlos aeróbicamente, sugería que el gen *acpR* está efectivamente implicado en la regulación de la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB. Cuando dicha cepa mutante fue complementada con el gen *acpR* y éste fue capaz de restaurar el crecimiento anaeróbico en diversos compuestos aromáticos (Fig. 18A), quedó confirmada la implicación de AcpR en la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB.

Para poder establecer una relación directa entre la proteína AcpR y la actividad del promotor P_N se analizó la expresión de la fusión traduccional $P_N::lacZ$ en *Azoarcus* sp. CIB*dacpR*. La ausencia de niveles significativos de actividad β -galactosidasa en la cepa mutante *acpR* tras ser cultivada tanto aeróbica como anaeróbicamente en benzoato, a diferencia de lo observado con la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB que sí mostró unos niveles significativos de actividad β -galactosidasa al ser cultivada anaeróbicamente en benzoato (Fig. 18B), confirmó la implicación de AcpR en el control positivo del promotor P_N en condiciones anaeróbicas.

Todos estos resultados señalan a AcpR como un activador transcripcional imprescindible en la actividad del promotor P_N cuando *Azoarcus* sp. CIB es cultivado en benzoato bajo condiciones anaeróbicas (Fig. 72). En este sentido, el papel fisiológico de AcpR controlando la expresión de los genes responsables de la ruta central de la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB parece ser equivalente a la función llevada a cabo por el regulador AadR, otro miembro de la superfamilia Fnr/Crp, en el microorganismo fototrofo *R. palustris* que también posee la capacidad de degradar anaeróbicamente compuestos aromáticos (Dispensa *et al.*, 1992; Eglund y Harwood, 1999; 2000).

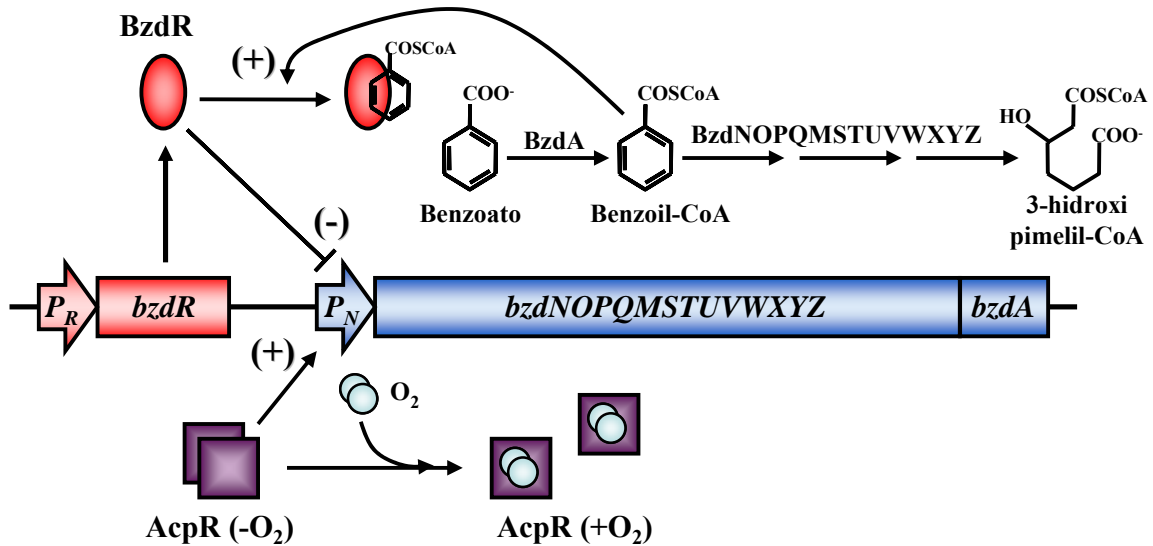
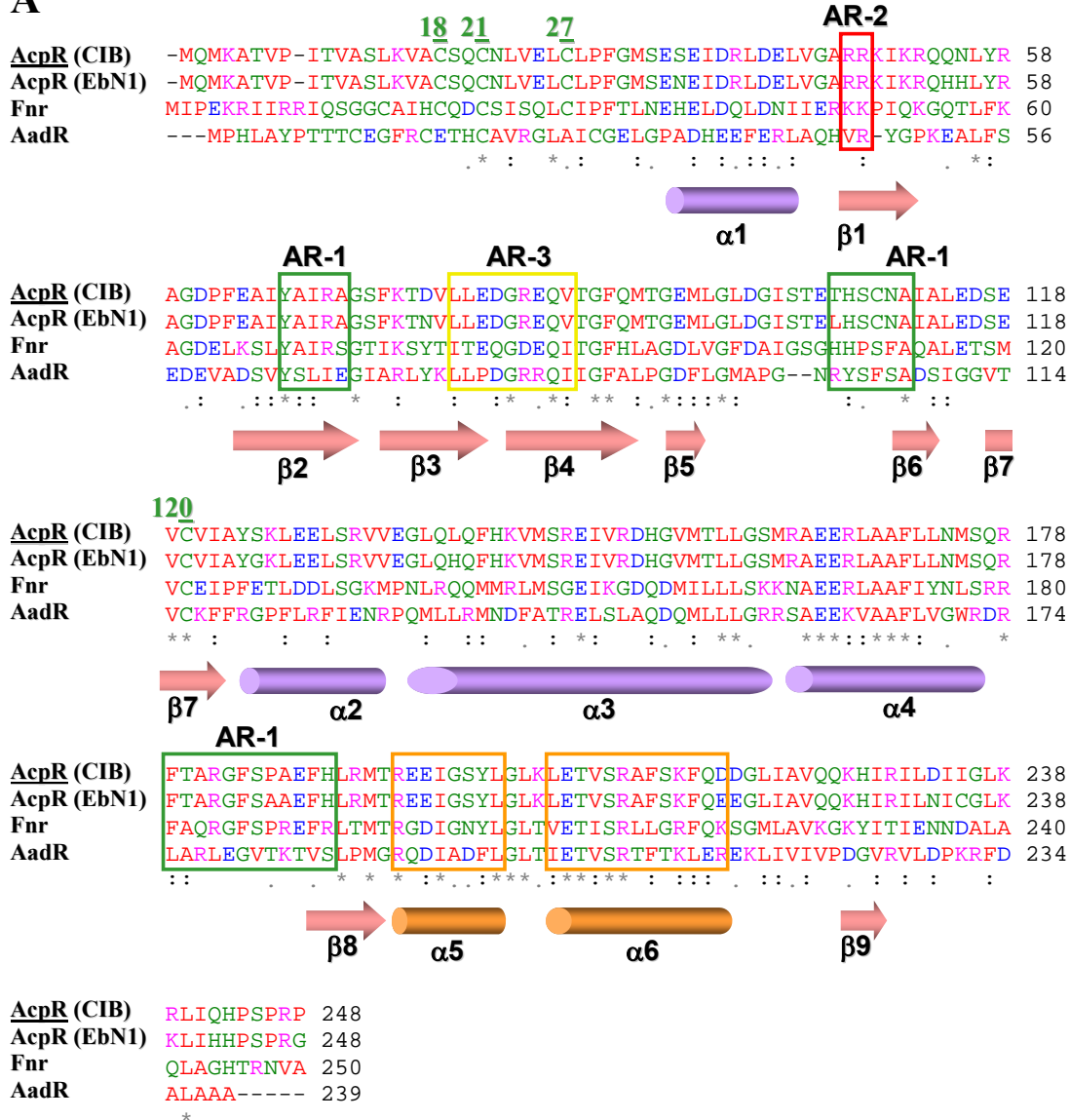


Figura 72. Organización y regulación del cluster *bzd* de *Azoarcus* sp. CIB. Los genes se encuentran agrupados en dos operones, el operón regulador *bzdR* (rojo) y el operón catabólico *bzdNOPQMSTUVWXYZA* (azul), controlados por los promotores P_R y P_N , respectivamente. El promotor P_N es reprimido por la proteína BzdR (elipse roja). La activación del promotor P_N se produce por medio de la molécula inductora, el benzoil-CoA, generado por la acción de la benzoato-CoA ligasa (BzdA) que se une a BzdR. En la zona inferior se muestra la regulación sobreimpuesta mediada por la proteína AcpR, que activa al promotor P_N cuando se encuentra en ausencia de oxígeno. Los símbolos (-) y (+) indican represión y activación transcripcional, respectivamente.

Cuando se llevó a cabo un alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína AcpR con la de otros miembros de la superfamilia Fnr/Crp. Dicho análisis puso de manifiesto que la proteína AcpR pertenece al grupo Fnr, en el cual destaca la proteína Fnr de *E. coli*, ampliamente caracterizada, con la que guarda un 43% de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos, o la proteína AadR de *R. palustris*, con la que guarda un 34% de identidad, además de jugar papeles muy semejantes en el metabolismo celular. Utilizando el modelo de la estructura tridimensional de Fnr de *E. coli* se llevó a cabo un modelo de la estructura tridimensional de la proteína AcpR (Fig. 73B). La proteína Fnr de *E. coli* presenta cuatro residuos de cisteína (Cys20, 23, 29 y 122) que contribuyen a la formación de un complejo ferro-sulfuroso $[4Fe-4S]^{2+}$ esencial en la dimerización (y consecuente activación) de Fnr en ausencia de oxígeno (Green *et al.*, 1996). Estos cuatro residuos de cisteína se encuentran perfectamente conservados en la proteína AcpR de *Azoarcus* sp. CIB (Cys18, 21, 27 y 120), pero no en AadR de *R. palustris*, en la cual únicamente se conservan dos de estos residuos (Cys20 y 116) (Fig. 73A). Por otro lado, las regiones de activación AR-1, AR-2 y AR-3 involucradas en la interacción de la proteína Fnr con las subunidades α CTD, α NTD y σ^{70} -CTD de la RNAP, respectivamente (de Lorenzo y Timmis, 1994; Lamberg *et al.*, 2002; Weber *et*

al., 2005; Williams *et al.*, 1997), se encuentran conservadas en AcpR y AadR, si bien en esta última proteína la secuencia de aminoácidos de la región AR-1 está sólo parcialmente conservada (Fig. 73A).

A



B

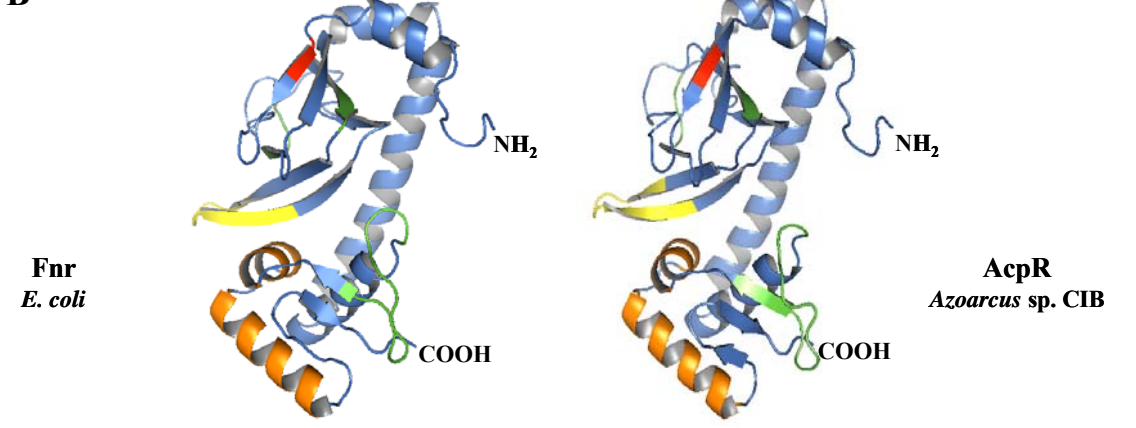


Figura 73. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas AcpR, Fnr y AadR, y modelo tridimensional propuesto para la proteína AcpR. (A) Los números de acceso de las secuencias mostradas son los siguientes: AcpR de *Azoarcus* sp. CIB [**AcpR (CIB)**], AAY81959.1; AcpR de *Azoarcus* sp. EbN1 [**AcpR (EbN1)**], YP_159953.1; Fnr de *E. coli* [**Fnr**], YP_001730333.1; y AadR de *Rhodospseudomonas palustris* [**AadR**], CAE29675.1. Los residuos de cada una de las secuencias están numerados a la derecha. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa de alineamiento múltiple ClustalW2. Los aminoácidos han sido representados mediante el código de una letra y los cuatro colores en que se muestran representan el grupo de aminoácidos al que pertenecen: rojo = apolares; verde = polares sin carga; azul = ácidos; rosa = básicos. En la zona inferior del alineamiento, un asterisco (*) significa que los residuos de esa posición son idénticos en todas las secuencias; dos puntos (:) significa que existen sustituciones conservadas, acordes con el código de colores mencionado anteriormente; un punto (.) significa que existen sustituciones semi-conservadas. Las regiones AR-1, AR-2 y AR-3 se muestran recuadradas en verde, rojo y amarillo, respectivamente. Los elementos de estructura secundaria predichos por el modelo tridimensional de AcpR han sido representados en forma de cilindros morados (hélices α) y flechas rosadas (cadenas β) debajo de las secuencias. De igual forma, se han resaltado en color naranja las dos hélices α del motivo HTH implicadas en la interacción con el DNA, así como las cuatro cisteínas (18, 21, 27 y 120) en color verde, implicadas en la formación del complejo ferro-sulfuroso. (B) Modelos tridimensionales de las proteínas Fnr de *E. coli* y AcpR de *Azoarcus* sp. CIB, donde se pueden apreciar las 6 hélices α y las 9 cadenas β . Las regiones AR-1, AR-2 y AR-3 se muestran coloreadas de verde, rojo y amarillo, respectivamente. Las dos hélices α que conforman el motivo hélice-giro-hélice (HTH) se muestran en color naranja. También han sido indicados los extremos N- y C-terminal como NH₂ y COOH, respectivamente.

Las regiones AR-1, AR-2 y AR-3 de AcpR, así como el motivo hélice-giro-hélice (HTH) (Fig. 73A) (Aravind *et al.*, 2005) implicado en el reconocimiento del promotor P_N , se han podido localizar en el modelo de la estructura tridimensional de AcpR (Fig. 73B).

No obstante, a pesar de la similitud entre Fnr y AcpR, ambas proteínas no presentan las mismas funciones reguladoras en la célula. Por ejemplo, un mutante de *E. coli* incapaz de expresar la proteína Fnr genera un efecto pleiotrópico en la expresión de más de 100 genes (Korner *et al.*, 2003), entre los que cabe destacar aquellos que codifican proteínas necesarias para crecer utilizando nitrato o fumarato como aceptor final de electrones (Unden *et al.*, 1995). De hecho, en esta tesis se ha demostrado que la proteína Fnr* fue también capaz de suplir la actividad de la proteína AcpR sobre el promotor P_N , no sólo en *E. coli* (Fig. 10B), sino también en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBd $acpR$ (pIZ-Fnr*) (Fig. 18A), la cual mostró una curva de crecimiento similar a la de la cepa silvestre al ser cultivada en condiciones anaeróbicas utilizando benzoato como fuente de carbono. Además, cuando el gen *fnr* fue expresado en la cepa *Azoarcus* sp. CIBlacZ (pIZ-Fnr*) cultivada en condiciones aeróbicas utilizando piruvato y benzoato como fuente de carbono, se observó una inducción de la fusión $P_N::lacZ$ de 5 veces respecto de las mismas células cultivadas en piruvato. Este resultado constituye el primer ejemplo de cómo la expresión de una ruta anaeróbica de degradación de compuestos

aromáticos puede ser expresada como si se tratase de una ruta aeróbica únicamente mediante el cambio de una proteína clave a nivel de regulación.

Al contrario de lo sucedido con la proteína Fnr de *E. coli*, el mutante *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* no veía afectada su capacidad de crecimiento anaeróbico al utilizar nitrato como aceptor final de electrones y fuentes de carbono no aromáticas tales como succinato, acetato o malato. Por lo tanto, parece que el papel fisiológico de AcpR se centra exclusivamente en la regulación a nivel transcripcional del *cluster bzd*, en lugar de intervenir en procesos globales de regulación, tal y como hacen otros miembros del grupo Fnr (Korner *et al.*, 2003), por lo que la proteína AcpR puede ser considerada como un regulador de la ruta central del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en *Azoarcus* (de ahí su nombre *aromatic central pathway Regulator*), de forma similar a como funciona la proteína AadR en *R. palustris* (Dispensa *et al.*, 1992; Eglund y Harwood, 1999; 2000).

Las proteínas AcpR y AadR sugieren la existencia de especialización en determinados miembros de la superfamilia Fnr/Crp, lo cual podría establecerse como un principio general de aquellos organismos capaces de degradar compuestos aromáticos tales como *Azoarcus* (Rabus *et al.*, 2005) y *R. palustris* (Larimer *et al.*, 2004), y que poseen un significativo número de reguladores Fnr/Crp que se han adaptado de forma más o menos específica para cumplir un papel muy concreto a nivel fisiológico. Así, por ejemplo, *Azoarcus* sp. EbN1 posee en su genoma hasta siete genes que codifican posibles reguladores transcripcionales pertenecientes a la superfamilia Fnr/Crp, entre los que se encuentran una proteína como Fnr (AcpR), una proteína como Crp, tres proteínas como Dnr y dos proteínas como Nnr (Rabus *et al.*, 2005) (Fig. 74). La posible existencia de reguladores similares en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB y su papel fisiológico en la célula serán objeto de estudios futuros.

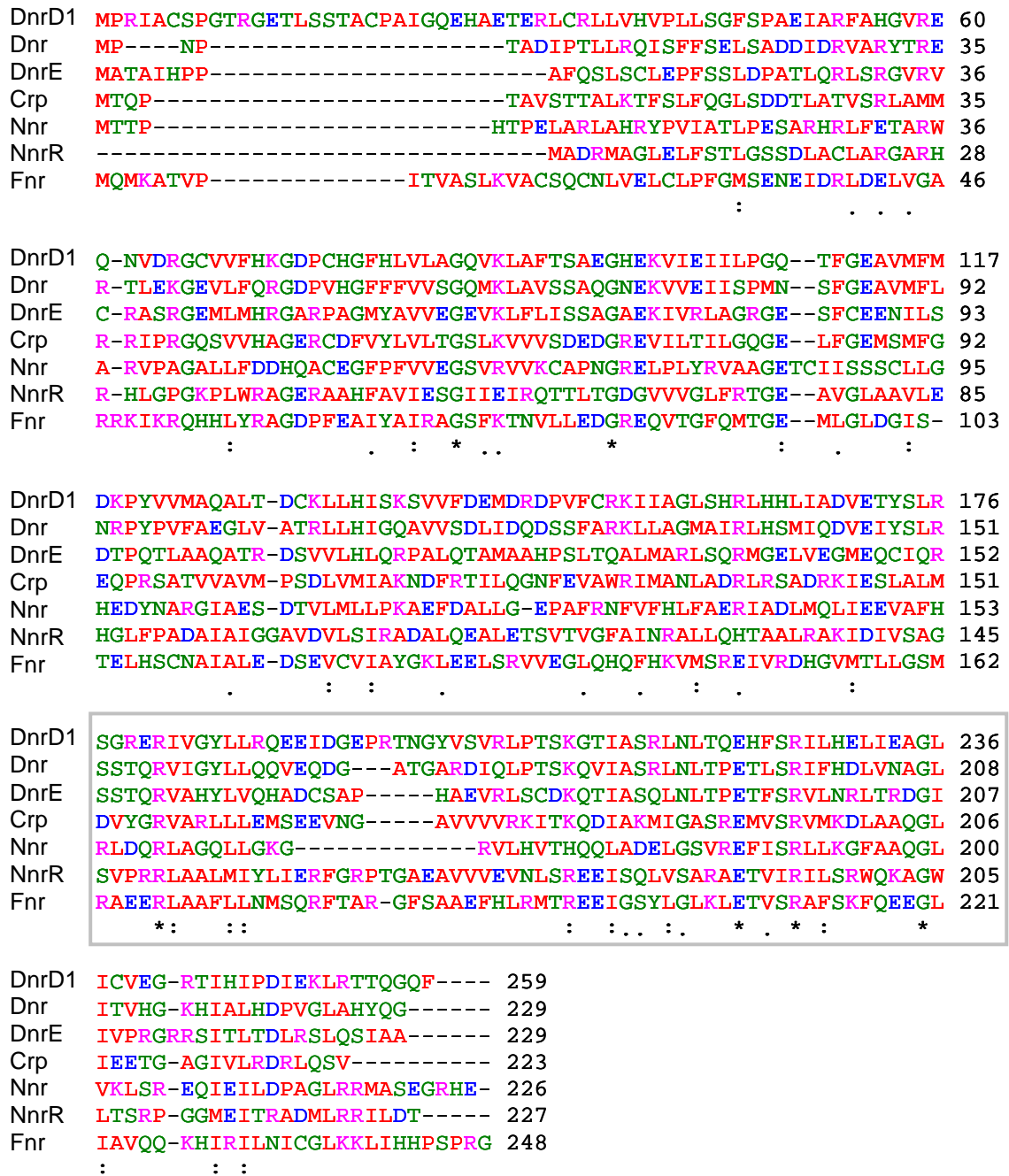


Figura 74. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de 7 proteínas de la superfamilia Fnr/Crp cuyos genes están presentes en el genoma de *Azoarcus* sp. EbN1. A la izquierda se indica en nombre del gen que codifica cada una de las proteínas alineadas. Los números de acceso de las secuencias alineadas son los siguientes: DnrD1 YP_157133.1, Nnr YP_157619.1, DnrE YP_159000.1, NnrR YP_159618.1, Dnr YP_159949.1, Fnr YP_159953.1, Crp YP_161022.1. Los residuos de cada una de las secuencias están numerados a la derecha. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa de alineamiento múltiple ClustalW2. Los aminoácidos han sido representados mediante el código de una letra y los cuatro colores en que se muestran representan el grupo de aminoácidos al que pertenecen: rojo = apolares; verde = polares sin carga; azul = ácidos; rosa = básicos. En la zona inferior del alineamiento, un asterisco (*) significa que los residuos de esa posición son idénticos en todas las secuencias; dos puntos (:) significa que existen sustituciones conservadas, acordes con el código de colores mencionado anteriormente; un punto (.) significa que existen sustituciones semi-conservadas. Por último, se ha recuadrado en color gris la región que incluye el motivo HTH en cada una de las secuencias.

Discusión 2. Estudio del promotor P_R del gen $bzdR$ y su implicación en la regulación de la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Los reguladores transcripcionales que controlan la expresión de promotores catabólicos de rutas de degradación de compuestos aromáticos suelen controlar también su propia expresión (Carmona, 2008; Díaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004). Sin embargo, no parecen existir estudios sobre la autorregulación de reguladores transcripcionales que controlen la expresión de rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos. Con objeto de profundizar en el estudio de estos procesos de autorregulación en rutas de catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos, se procedió al estudio de la regulación del promotor P_R del gen $bzdR$ en *Azoarcus* sp. CIB.

2.1 BzdR se une a su propio promotor P_R y autorregula su expresión

Mediante experimentos *in vivo* e *in vitro* (Figs. 19, 22 y 23) se ha podido demostrar que la proteína BzdR es capaz de unirse a su propio promotor P_R y reprimir así su expresión, revelando un patrón de inducción dependiente de benzoil-CoA similar al previamente estudiado entre BzdR y el promotor P_N en *Azoarcus* sp. CIB (Barragán *et al.*, 2005). Además, se localizó la posición +1 del inicio de la transcripción del gen $bzdR$ a 39 pb *upstream* del codón ATG de iniciación, así como las cajas -10 (CACTAT) y -35 (TTGCAA) separadas por 17 pb, y que difieren de las cajas consenso -10 (TATAAT) y -35 (TTGACA) reconocidas por la subunidad σ^{70} de la RNAP de *E. coli* en 3 y 2 nt, respectivamente. Los ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I (Fig. 23B) revelaron la región protegida por BzdR en el promotor P_R , que se extendía desde la posición -33 a la +25 e incluía 3 repeticiones GCAC (Fig. 21). Por lo tanto, BzdR protege tanto el sitio de inicio de la transcripción (+1) como las cajas -10 y -35 del promotor P_R , de un modo similar a la protección que ejerce sobre el promotor P_N (Barragán *et al.*, 2005), lo que sugiere que ambos promotores, P_N y P_R , están sometidos al mismo mecanismo de represión por la proteína BzdR. Por otro lado, y como ya se ha observado en la interacción BzdR- P_N (Barragán *et al.*, 2005), la unión de BzdR al promotor P_R induce cambios en la estructura del DNA, tal y como ponen de manifiesto los enlaces fosfodiéster que dan lugar a las bandas de hipersensibilidad a la digestión por DNasa I en los ensayos de protección. No obstante, existen diferencias

significativas en la afinidad del regulador BzdR por cada uno de sus promotores. Así, si bien en los ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I fue necesaria una concentración de 50 nM de proteína purificada BzdR para proteger a la sonda P_N (Barragán *et al.*, 2005), en el caso del promotor P_R fue necesaria una concentración de 0.5-1 μ M de BzdR para obtener niveles semejantes de protección (Fig. 24B). Estos resultados parecen ser congruentes con la represión moderada (Figs. 19 y 22) y fuerte (Barragán *et al.*, 2005) ejercida por BzdR sobre los promotores P_R y P_N , respectivamente, y que puede ser un reflejo de la distinta arquitectura de estos promotores. Así, cabe destacar las tres regiones de unión descritas en el promotor P_N , en las que repeticiones de la secuencia TGCA forman parte de los palíndromos de las cajas operadoras (Barragán *et al.*, 2005). Esta arquitectura del promotor P_N se asemeja a la de una serie de promotores regulados por otros miembros pertenecientes a la familia de reguladores transcripcionales HTH-XRE, tales como los represores Cro y 434 de los bacteriófagos λ y 434, respectivamente, los cuales también se unen a cortas secuencias repetidas que, en la mayoría de los casos, se localizan dentro de regiones palindrómicas incluidas en los promotores (Cervin *et al.*, 1998; Koudelka y Lam, 1993; Mandic-Mulec *et al.*, 1995; Weickert y Adhya, 1992). Por el contrario, en el promotor P_R parece que existe únicamente un operador reconocido por BzdR, y una única secuencia TGCA situada entre las posiciones -32 y -29 de la región protegida (Fig. 21). Esta diferente estructura a nivel de arquitectura entre los promotores P_R y P_N podría ser la responsable de las diferentes eficiencias de unión entre dichos promotores y la proteína BzdR.

2.2 Papel del oxígeno y fuentes de carbono preferentes en la expresión del gen *bzdR*

La presencia o ausencia de oxígeno podría jugar un papel esencial en la expresión del gen *bzdR*, tal y como sucede con la expresión de los genes catalíticos *bzd*, cuyo promotor P_N es inhibido por la presencia de oxígeno (véase apartado 1 de la Discusión). Sin embargo, los resultados obtenidos indican que el promotor P_R presenta niveles de actividad similares tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Fig. 24), por lo que parece no estar sujeto a una regulación dependiente de oxígeno, lo cual está de acuerdo con el hecho de que la proteína AcpR no juega un papel en la regulación del promotor P_R (Fig. 24). La expresión aeróbica del gen *bzdR* contribuiría a reducir la expresión basal del operón catabólico *bzd* cuando las células crecen en presencia de oxígeno, evitando así la producción residual de determinadas enzimas sensibles a

oxígeno tales como la benzoil-CoA reductasa (BzdNOPQ) (López Barragán *et al.*, 2004).

El promotor P_N está sometido a represión catabólica mediada por algunos ácidos orgánicos como succinato, malato y acetato (López Barragán *et al.*, 2004). Si bien la base molecular de la represión catabólica ha sido estudiada en algunos *cluster* aeróbicos de degradación de compuestos aromáticos, no ha sido así en los *cluster* anaeróbicos, donde no existen datos sobre posibles factores involucrados en dicha represión catabólica. En algunos trabajos se ha demostrado que la disminución de la respuesta de ciertos promotores de rutas catabólicas cuando las células crecen en presencia de un sustrato particular y una fuente de carbono preferida, está mediada por las variaciones en los niveles de los reguladores transcripcionales específicos de cada ruta. Así por ejemplo, la represión catabólica que se produce en la ruta de degradación de alcanos (genes *alk*) codificada en el plásmido OCT de *Pseudomonas putida* GPo1, es consecuencia de una disminución de la expresión del activador AlkS (Canosa *et al.*, 2000). De forma parecida, la represión catabólica de la ruta de degradación del fenol (genes *phl*) en *P. putida* H, involucra al regulador transcripcional PhIR (Muller *et al.*, 1996).

Por el contrario, los resultados obtenidos en esta tesis tanto por ensayos de actividad β -galactosidasa (Fig. 19), ensayos de RT-PCR en tiempo real (Fig. 25) y ensayos de *Western Blot* (Fig. 26), indican que la expresión del gen *bzdR* no está sujeta a represión catabólica mediada por ácidos orgánicos, tales como succinato, en *Azoarcus* sp. CIB.

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa (Fig. 26) confirman, no obstante, la represión catabólica a nivel transcripcional ejercida por el succinato sobre el promotor catabólico P_N . En este punto se han descrito varias proteínas involucradas en la represión catabólica de diversas rutas de degradación de compuestos aromáticos en *Pseudomonas*, tales como Crc (Morales *et al.*, 2004), PtsN y PtsO (sistema de nitrógeno fosfotransferasa) (Aranda-Olmedo *et al.*, 2005; Aranda-Olmedo *et al.*, 2006; Cases y de Lorenzo, 2005; Marqués *et al.*, 2006), y algunas oxidasas terminales tipo “o” (Cyo) capaces de detectar el estado redox de la célula (Morales *et al.*, 2006; Petruschka *et al.*, 2001; Rojo, 2004). Recientemente, se ha descrito un regulador de respuesta (BphQ) en un sistema de regulación de dos componentes que parece ser el responsable de la represión catabólica del operón *bph* que controla la degradación de policlorobifenilo/bifenilo en la β -proteobacteria *Acidovorax* sp. KKS102 (Ohtsubo *et al.*, 2006). Todas estas proteínas presentan su correspondiente ortólogo en el genoma de

Azoarcus sp. EbN1 (Rabus *et al.*, 2005): Crc (ebA3323), PtsN/PtsO (ebA27937/ebA2794), BphQ (ebA125) y tres ortólogos de la proteína CyoB (ebA4228, ebA156, ebA4554). El papel de estas proteínas en la represión catabólica del promotor P_N y las regiones de éste implicadas en dicha regulación serán objeto de estudios futuros.

Discusión 3. Estudio funcional y estructural de la proteína BzdR

Como se ha indicado en la Introducción, los reguladores transcripcionales encargados de controlar la expresión de promotores catabólicos de rutas de degradación aeróbica de compuestos aromáticos han sido ampliamente estudiados tanto a nivel de función como de estructura (Carmona, 2008; Tropel y van der Meer, 2004). Sin embargo, no existen estudios detallados sobre las relaciones estructura/función de ningún regulador transcripcional que controle una ruta de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos. Por ello, en esta tesis se profundizó en el estudio de la proteína BzdR, el primer represor descrito hasta el momento en el catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos, y prototipo de una nueva subfamilia de reguladores transcripcionales procariontes (Barragán *et al.*, 2005).

Se había sugerido previamente que la proteína BzdR se estructura en dos dominios, el dominio N-terminal (NBzdR; residuos 1-90), capaz de reconocer y unir DNA por medio de un motivo HTH, y el dominio C-terminal (CBzdR; residuos 131-298), capaz de reconocer a la molécula inductora benzoil-CoA, ambos unidos por una secuencia *linker* (LBzdR; residuos 91-130) (Fig. 6) (Barragán *et al.*, 2005). En esta tesis se ha podido demostrar que ambos dominios, NBzdR y CBzdR, pueden ser expresados y producidos como proteínas independientes (Fig. 29), siendo capaces de unir DNA y benzoil-CoA, respectivamente, y siendo el *linker* esencial para la transmisión de la información entre ambos dominios.

Para intentar validar los modelos propuestos sobre la estructura tridimensional de los dominios NBzdR y CBzdR se intentó inicialmente cristalizar la proteína BzdR y, mediante difracción de rayos X, obtener su estructura tridimensional por reemplazamiento molecular, usando como modelos la estructura de la SKI de *E. coli* para el dominio CBzdR y la estructura de la proteína SinR de *B. subtilis* para el dominio NBzdR. Sin embargo, la proteína BzdR demostró ser altamente insoluble e inestable y, si bien se lograron concentraciones elevadas de proteína (hasta 11 mg/ml), no se consiguió establecer unas condiciones óptimas de cristalización, las cuales requieren bajas concentraciones de sales. No obstante, se lograron obtener algunos cristales cuya estructura, al ser desordenada, impidió que difractaran adecuadamente al ser sometidos a rayos X, razón por la cual no se pudo obtener el conjunto de datos que habrían permitido la resolución de la estructura tridimensional de BzdR.

En este sentido se ha descrito que muchos reguladores transcripcionales parecen presentar una baja capacidad de cristalización por su elevada inestabilidad y su tendencia a formar agregados y precipitar a elevadas concentraciones, lo cual podría deberse a su capacidad para sufrir cambios conformacionales y poseer zonas muy flexibles, como de hecho ocurre con la mayoría de los miembros pertenecientes a la familia LysR (revisado por Maddocks y Oyston, 2008), lo que impide la determinación de su estructura mediante difracción de rayos X.

En determinados reguladores, ante la imposibilidad de obtener el cristal de la proteína debido a este tipo de problemas, se opta por intentar cristalizar por separado y de forma independiente cada uno de los dominios que conforman la proteína completa. Así, se han logrado obtener ciertas estructuras tridimensionales parciales que aportan relevante información a nivel estructural y funcional. Un ejemplo que ilustra bastante bien esta situación es el caso del represor CI del fago λ , del que se hablará más adelante, cuya estructura no pudo ser resuelta inicialmente con la proteína completa, razón por la cual se cristalizó y determinó por separado la estructura del dominio N-terminal implicado en la unión al DNA (Pabo y Lewis, 1982) y la del dominio C-terminal, responsable de la cooperatividad en la unión al DNA y de la dimerización de CI (Bell *et al.*, 2000). No obstante, la estructura de la proteína CI completa se ha conseguido resolver recientemente (Stayrook *et al.*, 2008). En cualquier caso, las estructuras de los dominios N- y C-terminal de CI dieron una información muy valiosa y útil en su momento.

En el caso de la proteína BzdR, se intentaron cristalizar tanto el dominio NBzdR/NBzdRL, como el dominio CBzdR de forma independiente. Tal y como ha quedado plasmado en el apartado 3.2 de Resultados, no se obtuvieron cristales adecuados en ninguno de los casos, a pesar de las mejores condiciones de cristalización, la mayor concentración y la mayor solubilidad obtenidas en el caso del dominio CBzdR.

Debido a la ausencia de resultados en el campo de la cristalografía, se optó por otra técnica que pudiera aportar algún tipo de información acerca de la estructura tridimensional de BzdR, por lo que se recurrió a la microscopía electrónica (ME). Con esta técnica, si bien no se obtienen resoluciones tan elevadas como las obtenidas por difracción de rayos X, sí se puede obtener información muy valiosa sobre la estructura proteica.

Tal y como se describe en el apartado 3.1.2 de Resultados, la proteína BzdR pudo ser detectada al microscopio electrónico con una resolución aceptable, lo que permitió,

tras un exhaustivo estudio de las 5.741 micrografías, llevar a cabo un análisis bidimensional el cual sugería una posible simetría bilateral. El análisis tridimensional posterior llevado a cabo con el paquete de programas EMAN (Ludtke *et al.*, 1999), también sugirió que BzdR poseía una simetría bilateral, a pesar de no asumir inicialmente dicha simetría en el análisis. Al imponer dicha simetría bilateral, se pudo obtener una estructura tridimensional con una resolución final de 25 Å, en la cual BzdR es un homodímero en el que se distinguen dos dominios, uno mayor que otro, en cada uno de los monómeros, tal y como se muestra en la Figura 28.

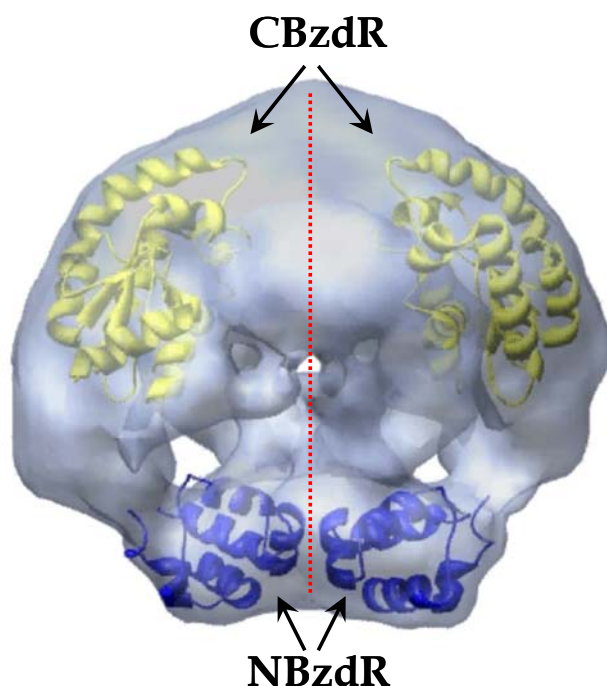


Figura 75. Ajuste de los modelos de CBzdR y NBzdR sobre la estructura de BzdR obtenida mediante microscopía electrónica. La estructura del dímero de BzdR obtenida mediante microscopía electrónica se representa mediante un volumen azul claro semi-transparente. La zona que divide cada uno de los monómeros ha sido indicada mediante una línea roja de puntos. El dominio CBzdR se muestra en un modelo de cintas de color amarillo, coincidente con la región superior de la estructura de BzdR. El dominio NBzdR se muestra en un modelo de cintas de color azul oscuro, coincidente con la región inferior de la estructura de BzdR.

Con objeto de determinar de forma aproximada cómo se ajustaban los modelos predichos para los dominios NBzdR y CBzdR a la estructura obtenida mediante microscopía electrónica, se llevó a cabo una superposición de dichos modelos sobre la estructura 3D, observándose un ajuste moderadamente aceptable entre ambas imágenes (Fig. 75). Además, la estructura obtenida sugería la posibilidad de que las interacciones existentes entre los dominios NBzdR de cada uno de los monómeros pudieran estar involucradas en la estabilización del homodímero del regulador (Fig. 75).

3.1 El dominio NBzdR interacciona específicamente con el promotor P_N

Los experimentos de retardo en gel y de protección frente a la digestión con DNasa I revelan que el dominio NBzdR es capaz de unirse correctamente al promotor P_N aunque

con una afinidad algo menor que la mostrada por la proteína parental BzdR (Fig. 30). Cuando los ensayos se realizaron con el dominio NBzdR conteniendo el *linker* (NBzdRL) se pudo observar que la afinidad por el promotor P_N en los ensayos *in vitro* fue superior a la obtenida con NBzdR y similar a la de la proteína parental BzdR (Fig. 30). Por otro lado, tanto los ensayos de expresión *in vivo* como los de transcripción *in vitro* indicaron que ambas proteínas, NBzdR y NBzdRL, eran capaces de reprimir la actividad del promotor P_N tan eficazmente como lo hacía la proteína BzdR completa (Fig. 31), lo que estaba de acuerdo con su correcto posicionamiento en las regiones operadoras tal y como se observó en los ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I (Fig. 30B). Además, los ensayos de transcripción *in vitro* en presencia de benzoil-CoA mostraron la incapacidad de las proteínas NBzdR y NBzdRL para responder a la presencia del inductor, como cabría esperar de reguladores que no poseen el dominio CBzdR supuestamente implicado en el reconocimiento de benzoil-CoA (Fig. 31B), lo que convierte al dominio NBzdR en un “super-represor” que, una vez unido al promotor P_N , es incapaz de permitir su actividad aún en presencia de la molécula inductora.

Cuando se analizó el estado de oligomerización tanto de BzdR como de NBzdR y NBzdRL, los resultados obtenidos por medio de ultracentrifugación analítica indicaron que las tres proteínas se encontraban en forma dimérica en solución (Fig. 33, Tabla 8). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el ensayo de *crosslinking* con glutaraldehído (Fig. 32) parecían indicar una capacidad de dimerización menor en el caso de NBzdR, lo cual sugería un posible papel del *linker* en la estabilización del homodímero de BzdR. Atendiendo al modelo propuesto de la estructura del dominio NBzdR, éste consta de 5 α -hélices (Barragán *et al.*, 2005). Para intentar delimitar con mayor precisión la región implicada en la dimerización y en la unión al DNA, se eliminó la quinta α -hélice ($\alpha 5$) del dominio NBzdR y se obtuvo la proteína NBzdR0 (residuos 1-76) (Fig. 6), la cual resultó ser inestable y no pudo ser detectada en extractos celulares (resultados no mostrados). Este comportamiento ya ha sido descrito previamente en el represor CI del fago λ , cuya región N-terminal (λ NcI) también presenta 5 hélices α y si se elimina la quinta hélice α , la proteína resultante pasa a ser totalmente inestable (Branden y Tooze, 1999). Por lo tanto, NBzdR y λ NcI comparten similitudes estructurales y necesitan las 5 hélices α para mantener su integridad estructural y funcional. Este tipo de dominio también es compartido con otros

reguladores transcripcionales de la familia XRE tales como la proteína Cro y el dominio N-terminal del represor del fago 434 (Mondragon *et al.*, 1989a; Mondragon *et al.*, 1989b), la proteína Cro y el dominio N-terminal del represor C2 del fago P22 (De Anda *et al.*, 1983; Sauer *et al.*, 1982) y la proteína Ner del fago Mu (Strzelecka *et al.*, 1995). La proteína Cro del fago λ también posee un elevado grado de similitud a nivel del motivo HTH, a pesar de que posee una estructura $\alpha+\beta$ (3 hélices α y 3 cadenas β), en lugar de las 5 hélices α típicas de la familia XRE (Anderson *et al.*, 1981), cuyo origen evolutivo parece encontrarse en las 5 hélices α del represor CI del fago λ (LeFevre y Cordes, 2003). De hecho, es la lámina β_3 la responsable de la interacción proteína-proteína que da lugar al dímero de la proteína Cro (Matsuo *et al.*, 1995; Ohlendorf *et al.*, 1998). Las demás proteínas parecen formar sus respectivas formas diméricas a través de la hélice α_5 . No obstante, la mayoría de estas proteínas no se encuentran en su forma dimérica en solución a concentraciones fisiológicas, sino que se encuentran en forma de monómero, como se ha descrito en el caso de la proteína Cro del fago P22 (Newlove *et al.*, 2004), la proteína Cro del fago 434 (Mondragon *et al.*, 1989b) o la proteína Ner del fago Mu (Kukolj *et al.*, 1989), o en forma de equilibrio monómero-oligómero, como se ha descrito en el caso del represor C2 del fago P22 (De Anda *et al.*, 1983). La proteína Cro del fago λ parece ser la única que se encuentra en forma de dímero en solución (Darling *et al.*, 2000; Jana *et al.*, 1997).

Curiosamente, el dominio NBzdR es un dímero no sólo en solución, sino también a concentraciones fisiológicas, como demuestran los ensayos *in vivo* llevados a cabo en *E. coli*, donde NBzdR es capaz de reprimir la expresión de la fusión traduccional $P_N::lacZ$ con la misma eficacia que la proteína BzdR parental (Fig. 31A). Estos resultados sugieren que el dominio NBzdR es capaz de dimerizar eficazmente por sí solo, a diferencia de lo que sucede con el dominio N-terminal de las proteínas presentadas previamente, excepto en el caso de Cro del fago λ , la cual, curiosamente, presenta una estructura $\alpha+\beta$ diferente y también dimeriza eficazmente en solución.

Todos estos resultados demostraban que NBzdR era efectivamente un dominio estructural y funcionalmente independiente implicado en la dimerización del represor BzdR, y en su interacción específica con las cajas operadoras del promotor P_N .

3.2 El dominio CBzdR modifica su conformación al unirse al inductor, benzoil-CoA

El dominio CBzdR posee una significativa similitud con enzimas siquimato quinasa no sólo a nivel de secuencia (Barragán *et al.*, 2005), sino también a nivel del contenido en estructura secundaria. Así, mediante dicroísmo circular del dominio CBzdR reveló un 40% de α -hélice, un 13.5% de estructura β , y un 46.5% de estructura no ordenada (Fig. 34), valores similares a los de la SKI de *E. coli* (α -hélice 46.5%, estructura β 10%, estructura no ordenada 44%), obtenidos a partir de la estructura tridimensional de la enzima (Romanowski y Burley, 2002). Además, a nivel de estructura cuaternaria, tanto el dominio CBzdR (Tabla 8) como la SKI (De Feyter, 1987) son monómeros en solución. Sin embargo, cuando se llevaron a cabo ensayos de actividad siquimato quinasa tanto con el dominio CBzdR como con la proteína BzdR completa, no pudo observarse en ninguno de los dos casos dicha actividad (Fig. 35), indicando que CBzdR no mantiene la misma función que SKI. Para confirmar experimentalmente la hipótesis de que el dominio CBzdR interacciona con el inductor benzoil-CoA (Barragán *et al.*, 2005), se llevaron a cabo estudios del espectro de emisión de fluorescencia de CBzdR en presencia o en ausencia de benzoil-CoA. La proteína CBzdR posee únicamente un residuo de Trp (W229 en BzdR) y cinco de Tyr (Y180, 185, 188, 247 y 271 en BzdR) en su secuencia. Los espectros de emisión de fluorescencia se llevaron a cabo a dos longitudes de onda de excitación: 275 nm, a la cual absorben tanto tirosinas como triptófanos, y 295 nm, a la cual absorbe únicamente el triptófano, si bien en ambos casos la emisión de fluorescencia es debida fundamentalmente a los residuos de triptófano. Debido a que la emisión debida a los triptófanos excitando a 295 nm era muy baja, las curvas de fluorescencia se llevaron a cabo excitando únicamente a 275 nm. Los espectros de emisión de fluorescencia mostraron que ésta disminuía significativamente a medida que se incrementaba la concentración de benzoil-CoA en la mezcla de reacción (Fig. 36), lo que sugería un notable cambio de conformación en el entorno del Trp229. La constante de afinidad (K_d) calculada para el benzoil-CoA, asumiendo que cada monómero de BzdR posee únicamente un sitio de interacción con el benzoil-CoA, según se deduce del modelo de estructura propuesto para CBzdR (Barragán *et al.*, 2005), fue de $203 \pm 35 \mu\text{M}$, indicando que la afinidad de CBzdR por el ligando benzoil-CoA era moderada-débil. El regulador BenM, miembro de la familia LysR que controla la ruta de degradación de benzoato en la bacteria *Acinetobacter bailyi* ADP1 (Collier *et*

al., 1998; Schell, 1993), posee una constante de disociación semejante (0.28 mM) para uno de sus efectores, el *cis,cis*-muconato, y un valor casi 5 veces superior (1.2 mM) para su otro efector, el benzoato. En este caso, cuando se llevaron a cabo estos mismos ensayos con el dominio C-terminal (BenM-EBD) implicado en el reconocimiento de los efectores y, por tanto, equivalente a CBzdR, las afinidades obtenidas fueron superiores (0.12 mM para el *cis,cis*-muconato y 1.1 mM para el benzoato) a las obtenidos con la proteína BenM parental (Clark *et al.*, 2004).

También cabe destacar la semejanza entre la constante de afinidad de CBzdR para el benzoil-CoA (203 μ M) y el valor de la K_m de la SK para el ATP (160 μ M; DeFeyter y Pittard, 1986). De hecho, CBzdR muestra aún algo de afinidad por la molécula de ATP (K_d 520 μ M), lo cual no es extraño, ya que esta molécula es muy semejante al 3P-ADP que forma parte del grupo CoA del efector benzoil-CoA. Estos datos apoyan la hipótesis acerca del origen evolutivo de BzdR propuesto más adelante.

Además, se pudo observar que el espectro de fluorescencia se desplazaba hacia mayores longitudes de onda de emisión (de 312 a 322 nm) a medida que se aumentaba la concentración de ligando añadida al medio de reacción, lo que indica un incremento en la polaridad del entorno del triptófano y, en menor medida, de alguna o todas las tirosinas. Este incremento en la polaridad sugiere que probablemente el Trp229 se encuentre en una nueva posición más cercana a la superficie de la proteína donde la polaridad es mayor que en el interior de la proteína. De hecho, en el modelo de la estructura de CBzdR se puede apreciar que la mayoría de residuos que rodean al Trp229 son de carácter apolar, i. e., Leu138, Ala274 e Ile277 (Fig. 76), con lo que muy probablemente, cualquier variación en la orientación del triptófano dará lugar a que éste se encuentre en entornos más polares, tal y como se deduce del espectro de emisión en presencia de benzoil-CoA.

Por otro lado, se pudo determinar las afinidades de CBzdR por análogos estructurales del benzoil-CoA, tales como el fenilacetil-CoA, u otras moléculas que son análogos o parte de la estructura del benzoil-CoA, tales como el CoA, el ATP o el benzoato. Tan sólo el fenilacetil-CoA, el CoA y el ATP mostraron interacción con CBzdR, aunque sus valores de K_d , $443 \pm 183 \mu$ M, $426 \pm 206 \mu$ M y $520 \pm 214 \mu$ M, respectivamente, fueron mayores que el obtenido para el benzoil-CoA. Además, en ninguno de estos casos, se pudo apreciar un desplazamiento del espectro de emisión, que siempre se mantuvo constante en 312 nm, lo que indicaba que, a pesar de estar

produciéndose un cambio conformacional que da lugar a una disminución del espectro de emisión, el entorno del Trp229 no parece verse afectado como ocurre cuando el ligando es el benzoil-CoA.

Dado que los ligandos fenilacetil-CoA, CoA y ATP también interactúan de forma específica con CBzdR y el benzoato no es capaz de inducir ningún tipo de cambio conformacional, se puede sugerir que CBzdR reconoce principalmente el CoA, concretamente el grupo 3P-ADP de éste último, en la molécula de benzoil-CoA, sin poderse descartar un posible papel en dicho cambio de conformación del grupo pantotenato de la molécula de CoA.

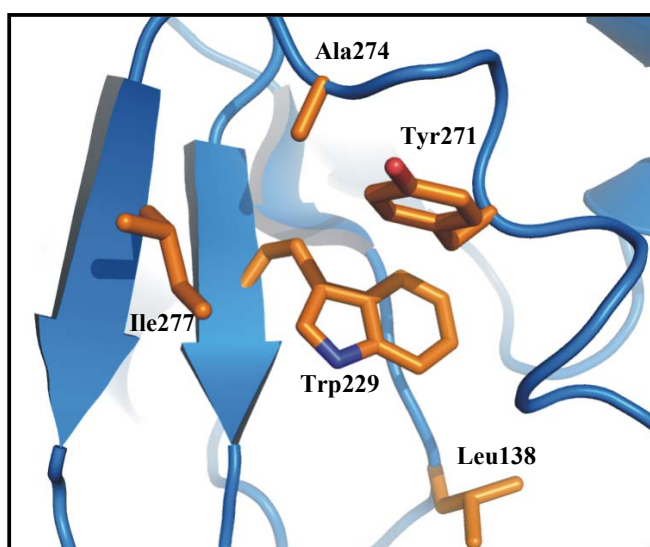


Figura 76. Entorno del Trp229 en el modelo estructural de CBzdR. La secuencia de aminoácidos ha sido representada mediante un diagrama de cintas. Únicamente se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos que rodean al Trp229.

Con el fin de aportar más evidencias experimentales sobre el cambio de conformación producido en CBzdR tras su unión al benzoil-CoA se llevaron a cabo una serie de ensayos de proteólisis parcial con tripsina, ya utilizados previamente para demostrar la interacción de moléculas inductoras con su correspondiente regulador, como en el caso de la proteína FapR y su ligando el malonil-CoA (Schujman *et al.*, 2006). En el caso de CBzdR, aunque el patrón de bandas de digestión de la proteína obtenido en presencia y ausencia de benzoil-CoA es similar (Fig. 37), el porcentaje de proteína digerida difiere significativamente. En presencia de benzoil-CoA, la proteína CBzdR se encuentra claramente más protegida frente a la acción de la tripsina, lo cual sugiere un cambio de conformación en su estructura que conlleva una menor exposición de aquellos residuos diana para la tripsina (lisinas y argininas).

En resumen, en esta tesis se ha demostrado experimentalmente que el dominio CBzdR reconoce e interacciona específicamente con el inductor benzoil-CoA, lo que conlleva un importante cambio conformacional en su estructura.

3.3 El linker de BzdR es imprescindible en la transmisión de información entre los dominios CBzdR y NBzdR

Cuando se llevó a cabo una predicción de la estructura secundaria del *linker* de BzdR (residuos 91-130) con el programa JPred 3 (Cole *et al.*, 2008), se identificaron dos posibles hélices α (Fig. 77). Además, el programa JPred 3 predijo que los residuos que forman parte de las α -hélices del *linker* presentan una elevada probabilidad de no encontrarse expuestos en la superficie de la proteína, sino que permanecerían en el interior de ésta (Fig. 77).

(A)	91	-----	101	-----	111	-----	121	-----	130		
(B)	QSP E L T L L I Q Y L S R F P P K T H E W A R R L L Q N E L E S S G R S A R R										
(C)	----	HHHHHHHH				----	HHHHHHHHHHHHHH				----
(D)	----	BBBBBBBB				--B	--B	--BB	--BB	--B	-----

Figura 77. Secuencia del linker de BzdR (LBzdR). La fila (A) indica el número de residuo en la proteína BzdR. La fila (B) indica la secuencia de aminoácidos. La fila (C) indica con la letra “H” aquellos aminoácidos para los cuales el programa JPred 3 predice su implicación en una estructura secundaria de tipo hélice α . Los guiones indican residuos en estructura no ordenada. La fila (D) indica con la letra “B” aquellos aminoácidos que, según el programa JPred 3, presentan una probabilidad inferior al 25% de hallarse en superficie.

Cuando se comparó la secuencia del *linker* de BzdR con la base de datos PDB, se encontró una significativa similitud de la segunda hélices α del *linker* con una región de la enzima formato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ de *Pseudomonas* sp. 101, cuya estructura tridimensional ya había sido resuelta (Lamzin *et al.*, 1992). Esta enzima es un homodímero implicado en la obtención de poder reductor en la célula mediante la síntesis de NADH acoplada a la oxidación de formato (Egorov *et al.*, 1979; Popov *et al.*, 1978). Curiosamente, la región de la formato deshidrogenasa (residuos 159-174) que alineaba con la región central del *linker* de BzdR formaba parte de una hélice α (α A) que parecía estar implicada en la dimerización de la enzima (Lamzin *et al.*, 1992), formando una estructura en la que las dos hélices α A de cada uno de los monómeros

quedaban enfrentadas en sentido paralelo (Lamzin *et al.*, 1994), tal y como se puede apreciar en la Figura 78.

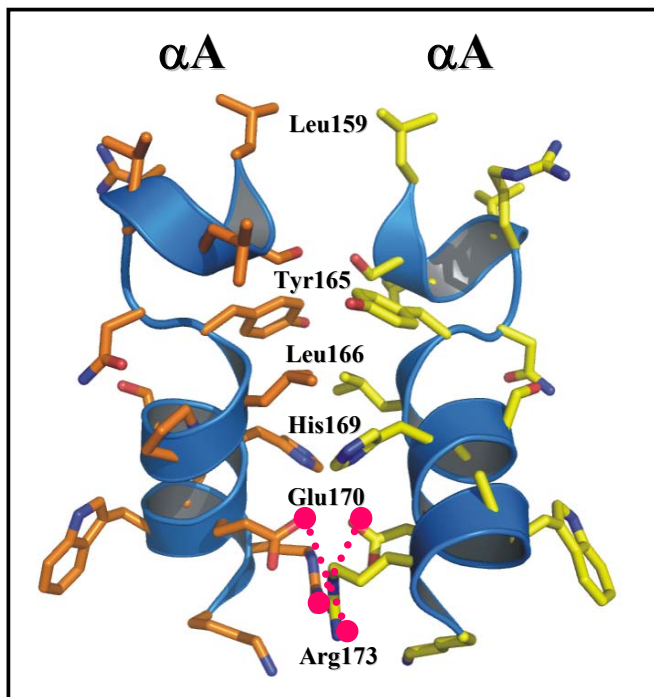


Figura 78. Estructura tridimensional de la región αA de la formato deshidrogenasa (PDB: 2NAD). Los residuos de color naranja pertenecen a la hélice αA de uno de los monómeros y los residuos amarillos a la hélice αA del otro monómero de la formato deshidrogenasa. Las líneas punteadas de color rosa indican los posibles puentes salinos entre el Glu170 y la Arg173.

Teniendo en cuenta que la hélice αA parece estar implicada en procesos de dimerización, cabía especular con la posibilidad de que la región *linker* de BzdR estuviera facilitando también la formación de un dímero en BzdR, de forma que las regiones *linker* de ambos monómeros quedasen enfrentadas paralelamente. En base a esta hipótesis, se propusieron dos residuos (Glu111 y Arg114, equivalentes a los residuos Glu170 y Arg173 de la formato deshidrogenasa) que podrían estar formando parte de sendos puentes salinos entre los monómeros del dímero BzdR (Fig. 38) interviniendo en la dimerización del regulador.

Para confirmar experimentalmente la hipótesis de los puentes salinos, se diseñaron 3 mutantes en la región *linker*, dos sencillos que deberían impedir la formación de dichos puentes y, por tanto, el proceso de dimerización, denominados BzdR3 (E111R) y BzdR4 (R114E), y un tercero denominado BzdR5 con una doble sustitución (E111R + R114E) que le permitiría recuperar dicha capacidad de dimerización al restablecerse los puentes salinos, aunque orientados en forma invertida respecto a la proteína BzdR parental. En un principio, los resultados obtenidos con el mutante BzdR4 parecían sugerir un papel ciertamente importante del *linker* en el proceso de dimerización de BzdR, ya que cuando el residuo Arg114 era sustituido por Glu la proteína mutante

disminuía drásticamente su capacidad de dimerización, tal y como mostraron los ensayos de ultracentrifugación analítica, donde se observaron mezclas heterogéneas de monómero/dímero con un elevado porcentaje de formas monoméricas (52%) (Tabla 9).

Sin embargo, los resultados obtenidos con el mutante BzdR3 reflejaron que la sustitución del residuo Glu111 por Arg, que también debería ocasionar la ruptura de los supuestos puentes salinos, no implicaba una pérdida significativa en la capacidad de dimerización de la proteína (Tabla 9). Consistente con este último resultado, el doble mutante BzdR5 no recuperó la capacidad de dimerización y los resultados de ultracentrifugación analítica indicaron un 88% de formas monoméricas (Tabla 9), un porcentaje ligeramente superior al observado para el mutante BzdR4. Del análisis de todos estos resultados parece concluirse que el *linker* de BzdR no es imprescindible para la formación del homodímero del regulador si bien la sustitución del residuo Arg114 por un residuo de Glu, y por tanto la disminución de la carga neta positiva de la región LBzdR de la proteína, podrían dificultar seriamente la estabilización del dímero del regulador.

De los estudios de interacción de los reguladores mutantes BzdR3, BzdR4 y BzdR5 con la región promotora P_N (Fig. 39) se puede concluir que dicho regulador sólo es capaz de interactuar eficazmente con su DNA diana en estado de homodímero (BzdR3), siendo las formas monoméricas (BzdR4 y BzdR5) incapaces de unirse al promotor regulado. El represor CI del fago λ comparte esta característica, siendo incapaz de unirse a su DNA diana si no es en forma de dímero (Pabo y Lewis, 1982; Weiss *et al.*, 1987). De hecho, el dominio N-terminal de CI (NTDcI) ve muy disminuida su capacidad de unión al DNA debido a que, sin el dominio C-terminal responsable de la dimerización, su capacidad de formar homodímeros se ve drásticamente reducida (Weiss *et al.*, 1987). Igualmente, cuando se lleva a cabo una mutación del residuo Ser228 en la proteína CI se ve afectada la capacidad de dimerización del represor, lo que reduce su capacidad de unirse al DNA diana (Burz *et al.*, 1994).

Con el fin de determinar el papel funcional del *linker* en el regulador BzdR y poder concluir definitivamente si está implicado en la dimerización de BzdR, se utilizó un sistema genético de mono-híbrido basado en la construcción de proteínas quiméricas con el dominio N-terminal del represor CI del fago λ (NTDcI) y en el estudio de su capacidad de reprimir el promotor P_R de dicho fago (Di Lallo *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 1990; Longo *et al.*, 1995). Dado que tanto la quimera $Q\lambda$, que incorpora el dominio

NTDcI fusionado a la región LBzdR y al dominio CBzdR (Fig. 40), como la quimera Q λ 2, que incorpora el dominio NTDcI fusionado directamente a CBzdR, mostraron capacidad de dimerizar en el ensayo de mono-híbrido, ya que reprimían eficazmente al promotor P_R del fago λ al igual que la proteína de fusión dimérica control NTD-Cat (Di Lallo *et al.*, 1999) (Fig. 40), se podía concluir que la región *linker* no parecía ser necesaria en el proceso de dimerización. Estos resultados estaban de acuerdo con el hecho de que la proteína de fusión NTD-LBzdR, que solo incluía la región *linker* de BzdR, apenas sí mostró represión del promotor P_R (Fig. 40), lo que indicaba de nuevo que la región LBzdR no confería unos niveles significativos de dimerización.

En este punto, cabe destacar que el dominio NTDcI incorpora, además del motivo HTH de unión a DNA, la región *linker* de la proteína parental CI (residuos 93-131; Fig. 40). Mediante experimentos de RMN se ha demostrado que el *linker* de CI posee una gran flexibilidad que permite a ambos dominios, N- y C-terminal, rotar independientemente uno de otro (Weiss *et al.*, 1983). Esta flexibilidad sería la responsable de que el dominio CBzdR, un monómero en solución (Tabla 8), pudiera establecer las interacciones necesarias con el dominio NTDcI para incrementar significativamente la ligera dimerización intrínseca de éste, lo que le permitiría a las quimeras Q λ 2 y Q λ dimerizar eficazmente.

Si bien la región LBzdR no parece contribuir significativamente a la dimerización del regulador BzdR, los resultados obtenidos *in vivo* con la fusión $P_R::lacZ$ (Fig. 41) sugieren que el *linker* es imprescindible en el proceso de transmisión del cambio conformacional inducido por el benzoil-CoA desde el dominio CBzdR al NBzdR. Así, mientras que la quimera Q λ , que incluye el *linker* de BzdR, es capaz de responder a la presencia de benzoil-CoA en la célula permitiendo la activación del promotor P_R , la quimera Q λ 2, que no incluye el *linker* de BzdR, es incapaz de responder a la presencia de benzoil-CoA (Fig. 41). El papel esencial del *linker* en la transmisión del cambio conformacional sufrido por un dominio de interacción con ligando (sustrato) hasta el dominio NBzdR también queda patente en el estudio de las quimeras Q4 y Q5 (Figs. 58 y 59).

Las regiones *linker* de los diversos reguladores transcripcionales descritos en la literatura no presentan una significativa similitud de secuencia. Son frecuentes las regiones *linker* con abundancia de residuos de glutamina, arginina, glutámico, serina y prolina, siendo denominados *Q-linkers* por el elevado número de residuos de glutamina

(Q) que suelen presentar (Argos, 1990; Wootton y Drummond, 1989). En algunos Q-*linkers*, como los presentes en las proteínas NtrB, NtrC, NifA y NifL implicadas en la regulación del nitrógeno (Drummond *et al.*, 1986; Drummond y Wootton, 1987), se ha sugerido que su papel consiste en unir los dos dominios de la proteína, de forma que puedan producirse las interacciones funcionales necesarias entre ambos, pero sin actuar de forma directa en la transmisión de información (Wootton y Drummond, 1989). Así, si se producían mutaciones de estos Q-*linkers* por adición, delección o sustitución de residuos, no se veían afectadas sus respectivas actividades reguladoras, y sólo si el Q-*linker* era eliminado por completo se podían observar efectos negativos en dicha actividad (Wootton y Drummond, 1989). Sin embargo, también se han descrito ciertos reguladores transcripcionales cuyos *linkers* no se ajustan a este modelo, como es el caso de OmpR ó DmsR. Ambos reguladores poseen regiones *linker* semejantes a los Q-*linkers* que, sin embargo, parecen poseer un papel más relevante en la transmisión de la información entre ambos dominios. De esta forma, cuando estos *linkers* incorporaban determinadas mutaciones puntuales, la funcionalidad de los reguladores se veía totalmente afectada, lo que sugería que ambas regiones *linker* estaban implicadas de forma directa en la transmisión de información de un dominio a otro (Aiba *et al.*, 1994; Mattison *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 1999).

Al igual que ocurre con otros Q-*linkers*, el *linker* de BzdR es abundante en residuos de glutamina (3), arginina (6), glutámico (4), serina (5) y prolina (3) (Fig. 77). El papel de la región LBzdR se asemejaría al del *linker* del regulador OmpR, ya que, el hecho de que la quimera Q λ 2 no sea capaz de desreprimir al promotor P_R en presencia de benzoil-CoA a pesar de poseer la región *linker* del regulador CI (λ LcI) (Figs. 40 y 41), sugiere que se necesita una determinada secuencia de aminoácidos (y así una determinada estructura) en la región *linker* para la correcta transmisión del cambio conformacional inducido por el benzoil-CoA en el dominio CBzdR, y que dicha transmisión no es posible por medio de cualquier otro *linker* que simplemente actúe como conector de los dos dominios de la proteína.

Todos estos datos tomados en conjunto, sugieren que el *linker* de BzdR presenta un papel crucial en la función del regulador y que, lejos de ser una simple secuencia que une dos dominios, interactúa de forma activa, transmitiendo información desde el dominio regulador al dominio efector.

3.4 Un modelo de acción para la proteína BzdR

En esta tesis se han obtenido una serie de evidencias que demuestran un cambio conformacional de la proteína BzdR cuando se encuentra unida a benzoil-CoA. En primer lugar, los experimentos de espectroscopía de fluorescencia revelan una disminución significativa del máximo del espectro de emisión cuando BzdR se encuentra en presencia de benzoil-CoA (Fig. 42) lo que implica un cambio conformacional, atribuible al dominio CBzdR como se ha discutido anteriormente, y que quizás también impliquen al Trp112 incluido en la región *linker* de BzdR. En segundo lugar, los experimentos de interferencia en ultracentrifugación analítica permitieron detectar pequeñas diferencias del coeficiente de fricción de BzdR en presencia o ausencia de benzoil-CoA (Tabla 10), lo que podría estar indicando un posible cambio conformacional hacia una estructura más compacta del regulador cuando la molécula inductora se encuentra unida. En tercer lugar, los experimentos de proteólisis parcial con tripsina revelaron, al igual que en el caso de CBzdR, una mayor resistencia a la digestión por la proteasa para la proteína BzdR en presencia de benzoil-CoA (Fig. 43), lo que suponía, de nuevo, un cambio conformacional hacia una estructura más compacta cuando el regulador interacciona con el inductor.

El cambio conformacional inducido por el benzoil-CoA en el dominio CBzdR del regulador BzdR se modeló en base a las semejanzas estructurales existentes entre dicho dominio y la enzima SKI de *E. coli*, y teniendo en cuenta el mecanismo de acción conocido para ésta última. La actividad enzimática de las siquimato quinasa tiene lugar a través de un preciso cambio conformacional inducido por la unión del sustrato (Gu *et al.*, 2002). Las siquimato quinasa se componen de 3 regiones: núcleo, LID (tapa) y NMPB (*Nucleotide Mono Phosphate Binding*; unión de nucleótidos monofosfato). El núcleo presenta una secuencia altamente conservada de regiones de unión a fosfato (P-loop o motivo Walker A). La región NMPB es la responsable del reconocimiento y la unión de una molécula de ATP. La región LID actúa como una tapa que se cierra y cubre la molécula de ATP cuando ésta se une a la siquimato quinasa por medio de una serie de residuos esenciales (Fig. 79). La región LID de las NMP quinasa es muy flexible y es capaz de sufrir cambios conformacionales drásticos tras la unión de los sustratos (ATP y siquimato). Normalmente, suele adoptar una conformación “cerrada” cuando el nucleótido trifosfato se encuentra unido al centro activo de la enzima, para evitar la hidrólisis del grupo fosfato (Gu *et al.*, 2002) (Fig. 79).

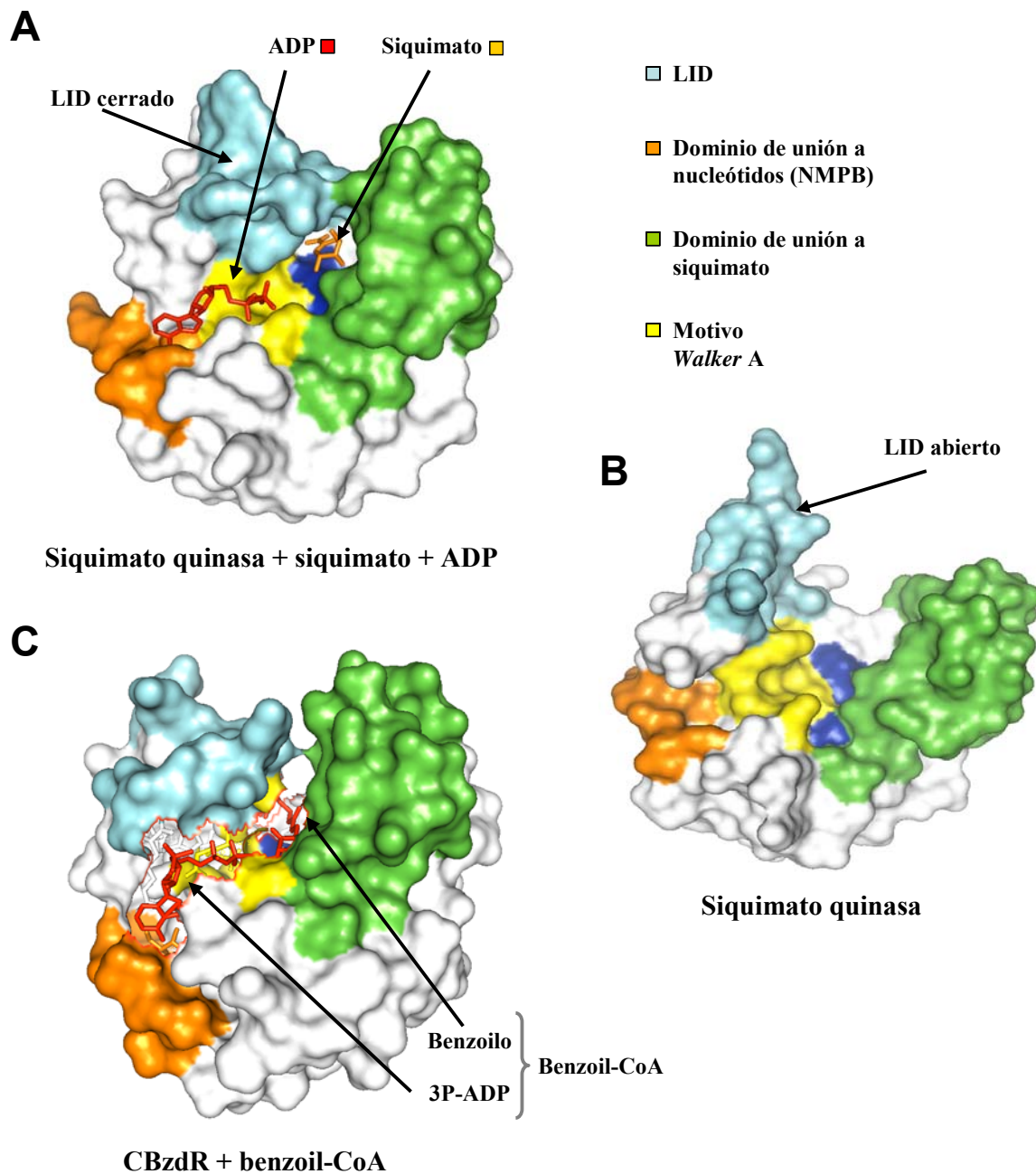


Figura 79. Estructura de la siquimato quinasa en presencia y ausencia de los sustratos siquimato y ADP, y modelo de la estructura del dominio CBzdR en presencia de benzoil-CoA. El panel A representa la estructura de la SKI en presencia de siquimato y ADP (análogo del verdadero sustrato, ATP, que permite mantener a la enzima catalíticamente inactiva), donde el LID queda cerrado (N° de acceso PDB: 2iyq). En la zona superior derecha se indica el código de colores que identifica cada una de las regiones o motivos en la estructura de la SKI. El panel B representa esta misma estructura en ausencia de sustratos, donde el LID queda abierto (N° de acceso PDB: 2iyt). El panel C representa el modelo de la estructura de CBzdR en presencia de benzoil-CoA. El modelo fue obtenido a partir de la estructura de la siquimato quinasa de *M. tuberculosis* en presencia de siquimato + ADP, sustituyendo el siquimato por el grupo benzoilo del benzoil-CoA y el ADP por el grupo 3P-ADP del inductor. La figura fue realizada con el programa PyMol.

En el modelo propuesto para el dominio CBzdR también se identifica una posible región LID contigua al motivo *Walker A* implicado en la unión de fosfato (Walker *et*

al., 1982) (Fig. 79), y cuya secuencia (GLRGAGKT) es compatible con la secuencia consenso (GXXXXGKT/S) de dicho motivo (Saraste *et al.*, 1990). En el caso de BzdR, el motivo *Walker A* se sitúa entre la lámina $\beta 1$ y la hélice $\alpha 6$, concretamente entre las posiciones 137 y 143 de la secuencia (Fig. 6).

De esta forma, se propone un modelo de acción para la proteína BzdR en el que la región LID sería capaz de mantenerse en una conformación “abierta” cuando la molécula inductora, el benzoil-CoA, no estuviera presente, y adquirir una conformación “cerrada” cuando el benzoil-CoA se encontrara unido al dominio CBzdR, de una forma semejante a cómo sucede en el caso de la siquimato quinasa (Figs. 79 y 80). Esta interacción entre proteína e inductor sería la responsable de un cambio conformacional que se transmitiría al dominio NBzdR a través de la región *linker*, logrando así que la proteína BzdR sea incapaz de unirse eficazmente al DNA (Fig. 80). El efecto específico del benzoil-CoA sobre la represión ejercida por BzdR en el promotor P_N se ha demostrado en esta tesis mediante ensayos de transcripción *in vitro* (Fig. 44). Estos ensayos confirmaron que el papel inductor se restringe al benzoil-CoA y, en menor medida, al fenilacetil-CoA y al ATP, siendo el benzoato incapaz de inducir la activación del promotor P_N , lo que coincide con los resultados obtenidos por espectroscopía de fluorescencia que revelaban la interacción de CBzdR con estos ligandos (Fig. 36).

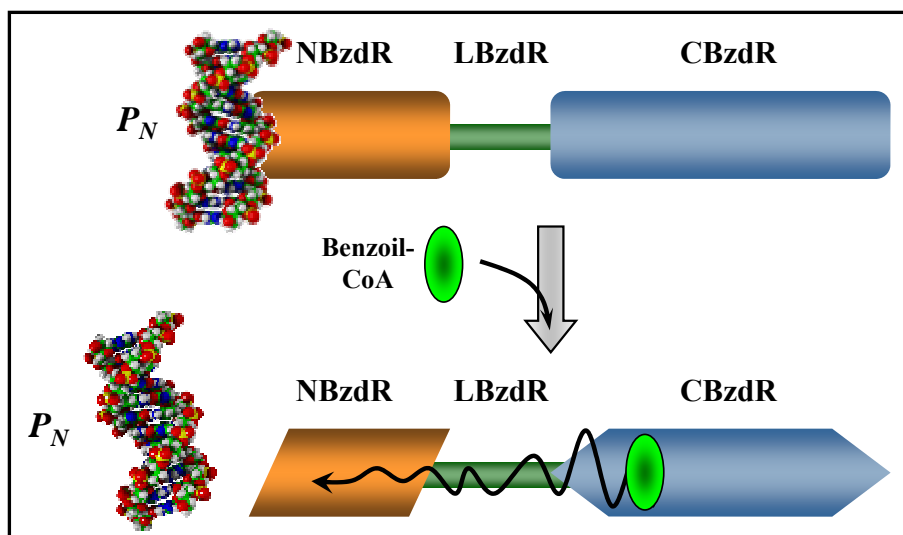


Figura 80. Modelo de acción de la proteína BzdR al interactuar con su inductor, el benzoil-CoA. La imagen superior representa la proteína BzdR (dominios NBzdR y CBzdR conectados por la región *linker* LBzdR) en ausencia de inductor y, por tanto, interactuando con el DNA diana (promotor P_N). La imagen inferior representa el cambio conformacional sufrido por el dominio CBzdR en presencia de inductor, benzoil-CoA, que es transmitido (flecha negra) al dominio NBzdR por medio de la región *linker*, lo que impide una interacción eficaz de éste con P_N .

Discusión 4. Utilización de la proteína BzdR como modelo para la generación de nuevos reguladores transcripcionales

Como se ha discutido anteriormente en esta tesis, la proteína BzdR posee una arquitectura modular consistente en dos dominios, NBzdR y CBzdR, unidos por una secuencia que actúa como *linker* y parece ser capaz de transmitir cambios de conformación del dominio CBzdR al NBzdR. Si bien se han descrito diversas proteínas con este tipo de arquitectura en organismos procariotas, como los reguladores transcripcionales de la familia LysR e IclR entre otros (Tropel y van der Meer, 2004), con ninguno de ellos se ha demostrado que dichos dominios funcionales sean independientes y capaces de generar nuevos reguladores transcripcionales (quimeras) que respondan a nuevos inductores, al ser fusionados a otras proteínas o dominios. A continuación se discutirán los resultados obtenidos al respecto con los dominios de BzdR.

4.1 La proteína quimérica Q λ es capaz de controlar el ciclo lítico del fago λ utilizando benzoil-CoA como inductor

Los resultados obtenidos y discutidos anteriormente en esta tesis han demostrado que la proteína quimérica Q λ , construida a partir de una fusión entre el dominio N-terminal del represor CI del fago λ (NTDcI) y el dominio CBzdR, es una proteína capaz de reprimir el promotor P_R del fago λ y permitir su actividad en presencia de benzoil-CoA (Fig. 41). El promotor P_R controla la expresión de los genes implicados en la entrada en el ciclo lítico del fago λ tras la infección celular (Meyer *et al.*, 1975; Ptashne y Hopkins, 1968). Por ello, la producción de la proteína Q λ en *E. coli* debería ser capaz de conferir protección a la cepa recombinante frente a la lisis inducida por el fago λ .

Cuando células de la cepa *E. coli* MV1190 que expresan la quimera Q λ y la enzima benzoato-CoA ligasa (BzdA) eran cultivadas en presencia de benzoato y posteriormente infectadas con el fago λ , se obtuvo un número de placas de lisis significativamente superior al número de placas de lisis observado con la misma cepa cultivada en ausencia de benzoato (Fig. 42). Este resultado indicaba que la quimera Q λ se comportaba como un nuevo regulador transcripcional del ciclo lítico del fago λ , el cual pasaba de ser controlado por la presencia de la proteína RecA (Roberts *et al.*, 1978), a ser controlado por los niveles de benzoil-CoA en la célula: en ausencia de este inductor, la quimera Q λ

se une al promotor P_R e impide la entrada del fago λ en ciclo lítico; en presencia del inductor, la quimera $Q\lambda$ interacciona con éste a través de su dominio CBzdR, lo que impide su interacción con el promotor P_R tras la infección de las células con el fago λ , induciéndose así el ciclo lítico.

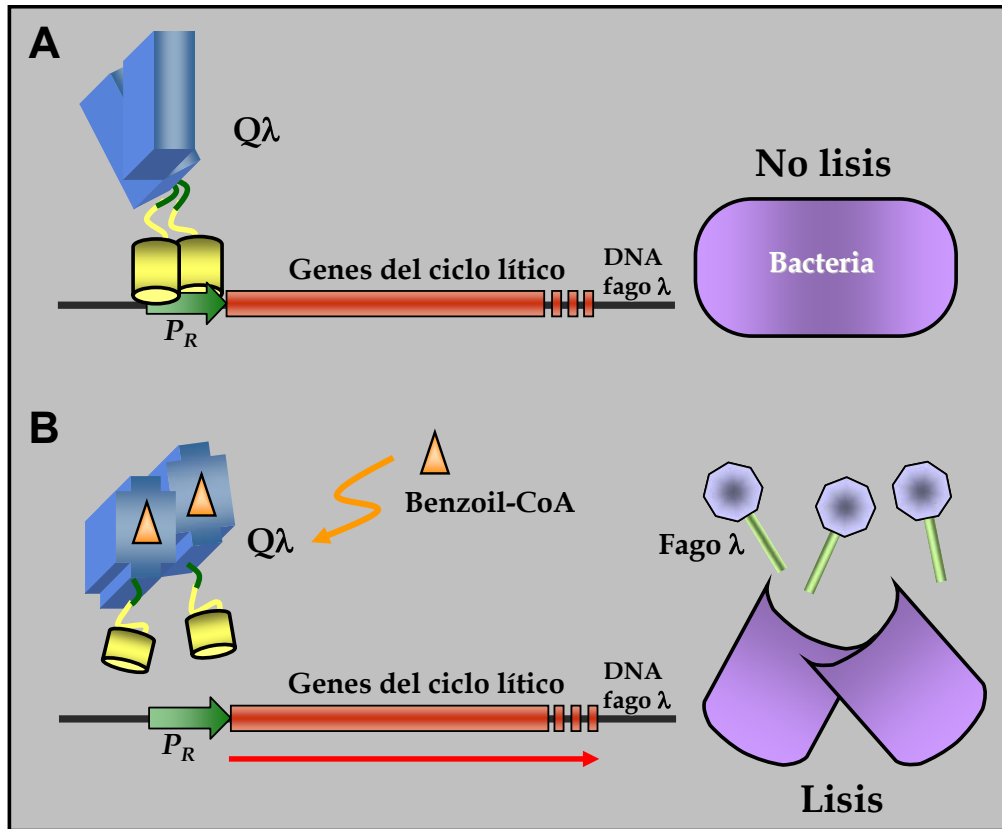


Figura 81. Modelo de acción de la quimera $Q\lambda$ sobre el ciclo lítico del fago λ . En el panel A se muestra a la quimera $Q\lambda$ (CBzdR en azul oscuro, LBzdR en verde, NTDcI en amarillo) reprimiendo al promotor P_R (verde oscuro) del fago λ e impidiendo la expresión de los genes líticos (rojo). En el panel B se muestra a la quimera $Q\lambda$ unida al benzoil-CoA (triángulo naranja) y no pudiendo interaccionar con el promotor P_R , lo que permite la expresión de los genes líticos y, por tanto, la inducción del ciclo lítico del fago λ .

En la literatura se pueden encontrar algunas otras fusiones semejantes a $Q\lambda$ capaces de conferir resistencia a la lisis por el fago λ , como es el caso de la fusión entre el dominio NTDcI y la proteína dimérica cloranfenicol acetiltransferasa o Cat (que confiere resistencia al cloranfenicol) (Di Lallo *et al.*, 1999), o la fusión del dominio NTDcI con el dominio C-terminal de la proteína transmembrana ToxR de *Vibrio cholerae* que regula la expresión de la toxina colérica (Dziejman y Mekalanos, 1994). Sin embargo, en ninguno de estos casos se ha descrito la inducción de la lisis mediante

la adición de un inductor, lo que convierte a la quimera Q λ en el primer ejemplo de regulador transcripcional diseñado artificialmente capaz de controlar el ciclo lítico del fago λ mediante la presencia o ausencia de benzoato en el medio de cultivo (benzoil-CoA en la célula), tal y como se esquematiza en la Figura 81.

4.2 La proteína quimérica Q1: un represor transcripcional con actividad enzimática

La proteína quimérica Q1 es el resultado de la fusión del dominio NBzdRL con la enzima SKI de *E. coli*. La siquimato quinasa (EC 2.7.1.71) es la quinta enzima de la ruta biosintética central de compuestos aromáticos (aminoácidos, determinados cofactores, ubiquinona y algunos otros compuestos cíclicos o aromáticos) (Bentley, 1990; Haslam, 1993). Es una ruta esencial en algas, plantas superiores, bacterias, hongos y parásitos, pero se encuentra ausente en mamíferos (Haslam, 1993; Kishore y Shah, 1988), lo que la convierte en diana potencial para el desarrollo de agentes bactericidas (Davies *et al.*, 1994), herbicidas (Coggins, 1989) y drogas antiparasitarias (Ridley, 1998), sin toxicidad para los mamíferos. La siquimato quinasa cataliza específicamente la reacción de fosforilación de un grupo 3-OH del siquimato utilizando ATP como cosustrato. En *E. coli*, la actividad siquimato quinasa es debida a dos enzimas que comparten un 30% de identidad en su secuencia, la siquimato quinasa I (SKI), codificada por el gen *aroK*, y la siquimato quinasa II (SKII), codificada por el gen *aroL* (Whipp y Pittard, 1995). La expresión del gen *aroK* parece ser constitutiva, a diferencia del gen *aroL*, que es controlado por los represores TyrR y TrpR (Ely y Pittard, 1979). Según se deduce de la literatura, la diferencia más destacable entre ambas enzimas es su afinidad por el siquimato. Así, mientras que la SKI posee una K_m para el siquimato de 5-20 mM, la SKII posee una K_m de 0.2 mM (De Feyter, 1987; DeFeyter y Pittard, 1986). Sin embargo, el valor de K_m descrito para la SKI se basa en resultados preliminares y en absoluto concluyentes, ya que en el proceso de purificación de la enzima se obtenían muestras heterogéneas de oligómeros con distinta masa molecular (De Feyter, 1987). En este trabajo, la SKI fue purificada con un *tag* de histidinas obteniéndose la enzima SKI en un único estado de agregación compatible con un monómero, y con un valor de K_m para el siquimato de 0.4 mM. Estos datos, junto con el hecho de que la SKI es suficiente para que un mutante *E. coli aroL* pueda sintetizar aminoácidos aromáticos, al contrario de lo que sucede con el doble mutante (*aroK aroL*) que se convierte en auxótrofo para los aminoácidos aromáticos (Lobner-

Olesen y Marinus, 1992), sugieren que la K_m de la SKI es incompatible con valores de 5-20 mM como se había descrito y avalan una K_m en torno a 0.4 mM, tal y como se ha descrito en este trabajo. En cualquier caso, la SKII parece ser la enzima principal de esta ruta de biosíntesis en *E. coli*, mientras que la SKI estaría jugando un papel secundario en esta ruta a la vez que podría estar implicada en algún otro proceso celular aún no descrito (DeFeyter *et al.*, 1986). De hecho, se ha descrito que la pérdida de la SKI en *E. coli* confiere resistencia al mecilinam (Romanowski y Burley, 2002; Vinella *et al.*, 1996), un antibiótico β -lactámico que se une a la proteína PBP2 (*Penicillin-Binding Protein 2*) de *E. coli* (Sougakoff y Jarlier, 2000). No obstante, la mayoría de las bacterias poseen únicamente una enzima siquimato quinasa que suele ser la codificada por el gen *aroK* (SKI), aunque en algunos organismos, como *Erwinia carotovora*, es la SKII codificada por el gen *aroL*.

Los resultados obtenidos con la quimera Q1 demostraron que ésta es capaz de unirse al promotor P_N en ensayos de retardo en gel (Fig. 47A) con una afinidad similar a la de la proteína BzdR. En el ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I se puede observar que tanto BzdR como la quimera Q1 reconocen las mismas regiones del promotor P_N con una afinidad similar (Fig. 58C). La quimera Q1 también fue capaz de reprimir *in vivo* la actividad del promotor P_N de forma tan eficiente como BzdR (Fig. 47B). Todos estos resultados indicaban que el dominio NBzdRL era funcional y, por tanto, se debía encontrar correctamente plegado y en configuración dimerica. Los resultados obtenidos mediante ultracentrifugación analítica confirmaron efectivamente que la proteína Q1 era un dímero en solución (Tabla 11), a pesar de que la enzima SKI activa es un monómero (Krell *et al.*, 1997; Millar *et al.*, 1986). Por otro lado, el dominio SKI de la quimera Q1 también mantuvo su funcionalidad, mostrando una actividad enzimática y una K_m (0.59 mM) similares a la de la enzima SKI de *E. coli* (Fig. 49). La quimera Q1 expresada en un doble mutante *aroK aroL* de *E. coli* (auxótrofo para los aminoácidos aromáticos) permitió el crecimiento de este mutante en medio mínimo sin aminoácidos aromáticos (Fig. 50), lo que demostraba que la quimera Q1 también era funcional *in vivo* y podía restituir el papel que cumplen la SKII y/o la SKI en *E. coli*.

Una vez demostrado que ambos dominios de la quimera Q1 mantenían sus respectivas actividades, se diseñaron una serie de experimentos con el fin de establecer si Q1 era capaz de actuar como un nuevo regulador transcripcional que respondiese a los niveles de siquimato y/o ATP. Los ensayos de retardo en gel demostraron que la quimera Q1 disminuía su capacidad de interacción con el promotor P_N en presencia de

siquimato, de siquimato y ATP y, en menor medida, en presencia sólo de ATP (Fig. 51). Aunque los ensayos de transcripción *in vitro* también mostraron que la represión del promotor P_N mediada por Q1 se revertía en presencia de siquimato, no se podía apreciar actividad del promotor P_N cuando la reacción de transcripción era llevada a cabo en presencia de siquimato y ATP o sólo de ATP (Fig. 48). Estos últimos resultados también estaban de acuerdo con los ensayos *in vivo* en los cuales no se pudo detectar la desrepresión del promotor P_N tras cultivar las células en presencia de siquimato 5 mM (Fig. 52). Todos estos resultados revelaban un comportamiento diferente de la quimera Q1 en presencia de siquimato y ATP en los ensayos de retardo en gel, por un lado, y en los ensayos de transcripción *in vitro* y/o control del promotor P_N *in vivo*, por otro. Con el fin de tratar de explicar esta aparente discrepancia era necesario analizar en detalle los cambios conformacionales que se han descrito asociados a la actividad catalítica de la enzima siquimato quinasa.

Como se ha descrito anteriormente, la SKI sufre un cambio de conformación que ocasiona una bajada de la región LID (tapa) cuando une cualquiera de sus dos sustratos (siquimato o ATP) (Hartmann *et al.*, 2006) (Fig. 82, conformación B₁ y B₂). La unión posterior del segundo sustrato, ATP o siquimato según el caso, no parece generar cambios conformacionales importantes en la estructura de la enzima (Hartmann *et al.*, 2006) (Fig. 82, conformación C). La región LID adquiere así una conformación “cargada” o cerrada, que únicamente durará el tiempo necesario para que tenga lugar la reacción de hidrólisis del ATP, la transferencia del grupo fosfato al siquimato y la síntesis de los productos correspondientes, ADP y 3P-siquimato, que serán liberados al medio, a la vez que la región LID adquiere de nuevo una conformación descargada o abierta (Fig. 82, conformación A). Estas dos diferentes conformaciones de la región LID indican una elevada flexibilidad en su estructura (Hartmann *et al.*, 2006). Es interesante destacar aquí que el catión Mg^{2+} actúa como cofactor indispensable en la catálisis llevada a cabo por la siquimato quinasa (DeFeyter y Pittard, 1986). En el caso de la SKI de *M. tuberculosis* se ha demostrado que los residuos Thr16 y Asp32 están coordinados con un catión Mg^{2+} , y el residuo Asp34 forma un puente de hidrógeno con una molécula de agua, la cual se coordina también con el catión Mg^{2+} (Gu *et al.*, 2002). La ausencia de cationes Mg^{2+} en el medio de reacción permite la unión de los dos sustratos al centro activo de la enzima, dando lugar al cambio de conformación correspondiente, el cual se mantendrá de forma estable al no poder proseguir la reacción enzimática.

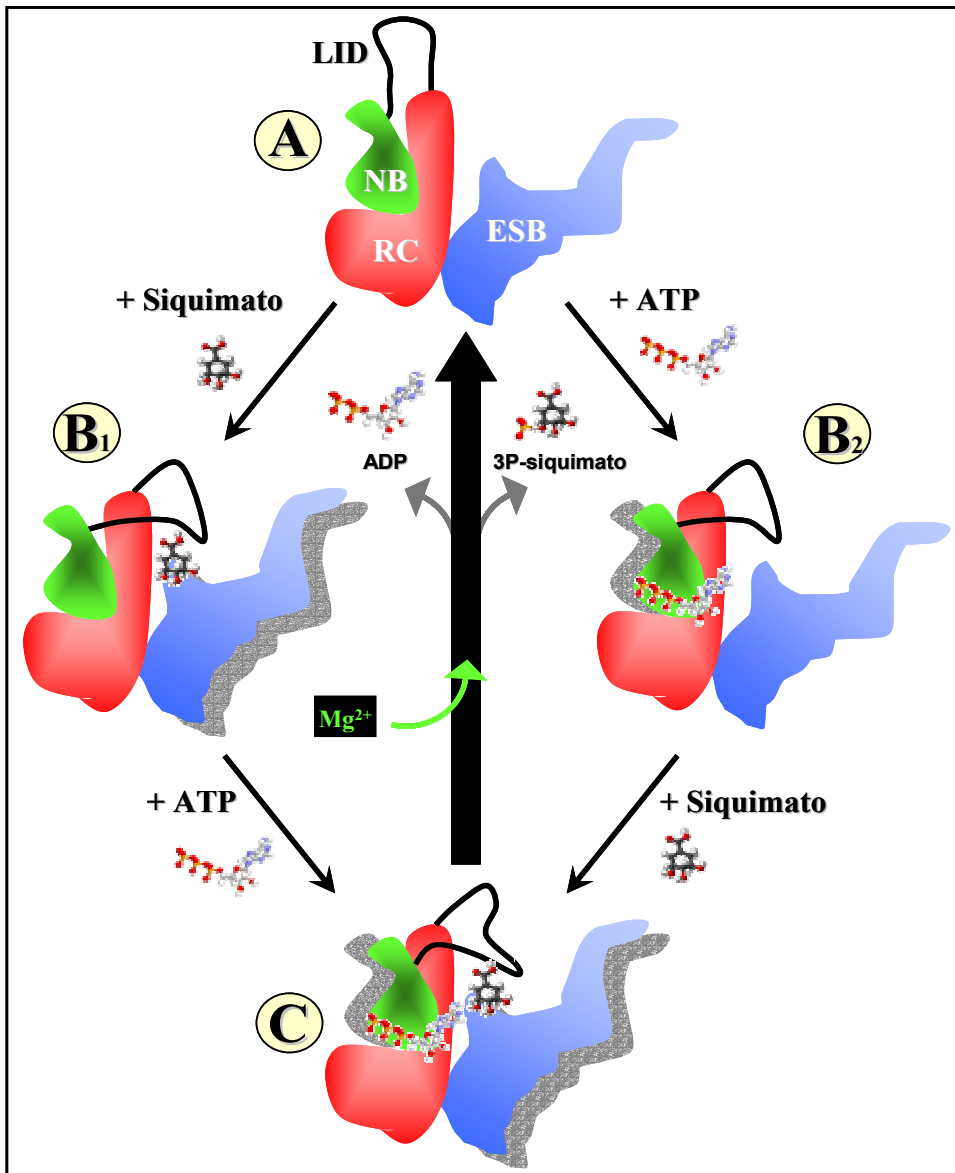


Figura 82. Esquema del cambio conformacional sufrido por la SKI de *M. tuberculosis* durante su ciclo catalítico. (A) Esquema de la conformación de la SKI en ausencia de sustratos. En negro se representa la región LID; en verde se representa la región NB, responsable del reconocimiento de nucleótidos; en azul se representa la región ESB, responsable del reconocimiento del siquimato; en rojo se representa la región RC, que se correspondería con el resto de la estructura de la SKI. (B₁) Conformación de la SKI en presencia de siquimato. (B₂) Conformación de la SKI en presencia de ATP. (C) Conformación de la SKI en presencia de siquimato y ATP. La flecha negra central representa la catálisis enzimática de la SKI, que precisa la presencia del catione Mg²⁺ y libera dos productos, ADP y 3P-siquimato. Adaptado de Hartmann *et al.* (2006).

En base a los cambios conformacionales que tienen lugar durante el ciclo catalítico de la SK, los resultados obtenidos con la quimera Q1 pueden ser explicados y reinterpretados desde una nueva perspectiva. En los ensayos de retardo en gel se utiliza un tampón que no lleva Mg²⁺, por lo que ni la quimera Q1 ni la SKI muestran actividad enzimática en dicho tampón (Fig. 53A). Esto implica que en las reacciones llevadas a cabo en presencia de siquimato y ATP, no puede catalizarse la reacción enzimática, con

lo que ambos sustratos permanecerán unidos al dominio SKI (LID “cargado”) de la quimera Q1, manteniéndose así el cambio conformacional que podrá ser transmitido al dominio NBzdRL con el consiguiente despegue del DNA. Esta hipótesis daría explicación a los resultados obtenidos en los ensayos de retardo en gel, donde la quimera Q1 se despega del promotor P_N tanto en presencia de siquimato, y en menor medida de ATP, como en presencia de ambos sustratos (Fig. 51).

En los ensayos de transcripción *in vitro* el tampón utilizado sí lleva Mg^{2+} con lo que en presencia de siquimato y ATP el dominio SKI sí puede catalizar la reacción enzimática (Fig. 53B), y no mantendrá el cambio conformacional debido a la unión de los sustratos, sino que volverá rápidamente a su conformación inicial (LID “descargado”) (Hartmann *et al.*, 2006), por lo que no habrá transmisión del cambio conformacional del dominio SKI al dominio NBzdRL, el cual se mantendrá unido al promotor P_N . Esto explica los resultados obtenidos en los ensayos de transcripción *in vitro* (Fig. 48), donde se puede apreciar que, al contrario de lo que sucede en los ensayos de retardo en gel, la quimera Q1 mantiene la represión (unión) del promotor P_N cuando las reacciones son llevadas a cabo en presencia de ATP y siquimato, ya que conserva su actividad enzimática impidiendo que se transmita el cambio de conformación al dominio NBzdRL. Por el contrario, cuando en la reacción de transcripción *in vitro* con la quimera Q1 se añade únicamente siquimato, sí se recupera la actividad del promotor P_N ya que la actividad enzimática del dominio SKI no tiene lugar sin ATP, con lo que el cambio conformacional provocado por el siquimato (LID “cargado”) se mantiene y, por tanto, puede ser transmitido al dominio NBzdRL impidiendo la interacción de la quimera Q1 con el promotor P_N .

Los resultados obtenidos en los experimentos de expresión de la fusión $P_N::lacZ$, donde la quimera Q1 mantiene los mismos niveles de represión del promotor P_N en ausencia o presencia del inductor siquimato (Fig. 52), se explican por la presencia de cationes Mg^{2+} y ATP en la célula que permiten la actividad enzimática del dominio SKI en presencia de siquimato, con lo que la enzima adquiere rápidamente su conformación original (LID “descargado”) (Fig. 82, conformación A) y no permite la transmisión del cambio conformacional al dominio NBzdRL, manteniéndose la quimera Q1 unida al promotor P_N de forma análoga a lo que sucede en los experimentos de transcripción *in vitro*.

En conclusión, la quimera Q1 es un nuevo regulador artificial bifuncional capaz de reprimir la actividad del promotor P_N a la vez que presenta actividad enzimática

siquimato quinasa. En aquellas condiciones *in vitro* en las que la actividad enzimática del dominio SKI está inhibida, la quimera Q1 es capaz de permitir la actividad del promotor P_N en presencia de siquimato.

Aunque hasta ahora no se habían descrito en la literatura proteínas artificiales bifuncionales de este tipo, sí se han descrito algunos reguladores transcripcionales naturales que presentan también actividad enzimática. Entre este tipo de proteínas cabría destacar la flavoproteína PutA (*Proline utilization A*), involucrada en el metabolismo de la prolina, que presenta la capacidad de asociarse a membrana, catalizar la reacción de oxidación que transforma la prolina en glutamato mediante dos actividades enzimáticas diferentes, y controlar la expresión de los genes *put* (Becker y Thomas, 2001; Brown y Wood, 1993; Menzel y Roth, 1981; Surber y Maloy, 1998; Vinod *et al.*, 2002; Zhu y Becker, 2003). La proteína NadR, implicada en la síntesis de NAD en la célula, presenta dos actividades enzimáticas, nucleósido quinasa y adenililtransferasa, y controla la expresión de los genes *nadB*, *nadA*, *pnuC* y *pncB* (Foster *et al.*, 1990; Grose *et al.*, 2005; Penfound y Foster, 1999). Otro ejemplo de regulador bifuncional es la proteína BirA, involucrada en la síntesis de biotina, que cataliza la síntesis de biotinil-5'-AMP y controla la expresión de los genes del operón *bio* (Cronan, 1989; Eisenberg *et al.*, 1982).

No obstante, si bien en los reguladores bifuncionales naturales hay una relación directa entre la actividad enzimática del regulador y los genes regulados, en el caso de la quimera Q1 la actividad enzimática siquimato quinasa, relacionada con la biosíntesis de corismato, no está ligada funcionalmente con la regulación transcripcional del promotor P_N , relacionado con la degradación anaeróbica de benzoato.

Este tipo de proteínas que aúnan dos funciones tan dispares como son catalizar una reacción enzimática y regular la transcripción génica es muy probable que no sean favorecidas desde el punto de vista evolutivo, ya que una única mutación de su secuencia podría dar lugar a la pérdida de ambas funciones. De hecho, esa podría ser la razón por la que se han descrito tan pocos casos de reguladores bifuncionales. Sin embargo, estas proteínas podrían ser consideradas como intermediarios evolutivos que en algún momento del transcurso de la evolución perderán alguna de sus funciones para especializarse en la otra, incrementando su efectividad. En este sentido, la quimera Q1 podría representar un modelo del ancestro evolutivo que generó los reguladores de la subfamilia BzdR (ver más adelante).

4.3 La proteína quimérica Q2: un regulador artificial de la subfamilia BzdR que responde a siquimato en la célula

Una vez estudiado el comportamiento de la quimera bifuncional Q1, la cual actuaba como un regulador transcripcional del promotor P_N en presencia de siquimato sólo cuando se anulaba la actividad enzimática del dominio SKI, se diseñó una segunda quimera (Q2) carente de actividad siquimato quinasa pero capaz de permanecer en su conformación “cargada” en presencia de siquimato.

Debido a que el Mg^{2+} es imprescindible para la catálisis, coordinándose con los residuos Thr16, Asp32 y Asp34 de la SKI de *M. tuberculosis* (Gu *et al.*, 2002), se identificaron los residuos equivalentes (Thr19, Asp34 y Asp36) en la secuencia de la SKI de *E. coli* (Fig. 83A), los cuales se corresponden con las posiciones Thr151, Asp166 y Asp168 del dominio SKI de la quimera Q1.

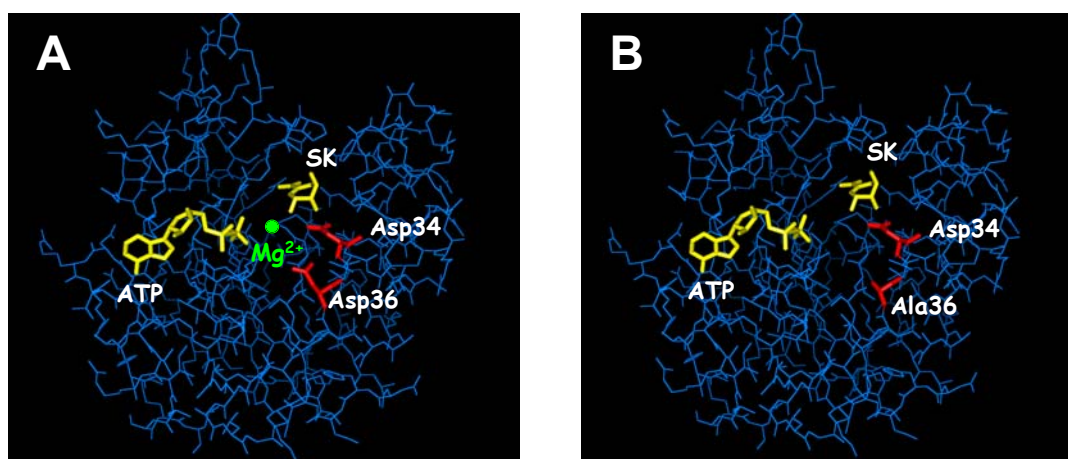


Figura 83. (A) Modelo de la SKI de *E. coli* unida a sus sustratos (siquimato y ATP) y a su cofactor Mg^{2+} . (B) Modelo de la estructura de la SKI mutante de *E. coli* unida a sus sustratos (siquimato y ATP). En ambos modelos se han representado en amarillo las estructuras moleculares de los sustratos, siquimato (SK) y ATP; en rojo los residuos de Asp34 y Asp36 en el panel A y los residuos de Asp34 y Ala36 en el panel B; en verde el catión Mg^{2+} ; en azul el resto de la estructura de la SKI. Ambos modelos se realizaron utilizando el programa LOOPP (Teodorescu *et al.*, 2004) y se representaron con el programa PyMol.

Asumiendo que los residuos Asp166 y Asp168 están también implicados en la coordinación del Mg^{2+} en el dominio SKI de la quimera Q1, la quimera mutante fue construida mediante mutagénesis dirigida sustituyendo el residuo Asp168 (Asp36 en la SKI, Fig. 83A) por Ala (Fig. 83B), generando así la quimera Q2 (Q1D168A), la cual debería ser incapaz de unir cationes Mg^{2+} y, por tanto, debería carecer de la actividad enzimática siquimato quinasa aún siendo capaz de reconocer y unir ATP y siquimato. Corroborando esta hipótesis, la quimera Q2 no mostró actividad siquimato quinasa (Fig.

54B). Con el fin de descartar que la ausencia de actividad fuera debida a algún cambio conformacional drástico causado por la mutación efectuada, se realizó una comparación entre el modelo tridimensional de la estructura de una SKI con dicha mutación y la SKI silvestre cristalizada de *E. coli* (PDB: 1kag) (Romanowski y Burley, 2002) (Fig. 83). Dicha comparación puso de manifiesto que la variación estructural entre ambas proteínas era mínima, lo cual sugería que la pérdida de actividad enzimática de la quimera Q2 no se debía a variaciones estructurales importantes sino a la pérdida de la capacidad del dominio SKI de unir cationes Mg^{2+} .

Cuando se determinó la capacidad de unión de la quimera Q2 al promotor P_N mediante ensayos de retardo en gel, se comprobó que apenas difería de la obtenida para la quimera Q1 ó BzdR (Fig. 54). De igual forma, se pudo constatar que su capacidad de interacción con el promotor P_N se inhibía en presencia de siquimato, de forma similar a lo observado con la quimera Q1. Sin embargo, tanto en los ensayos de transcripción *in vitro* como en los ensayos de control de la expresión de la fusión $P_N::lacZ$ en *E. coli* se puso de manifiesto que, a diferencia de la quimera Q1, la quimera Q2 permitía la activación del promotor P_N en presencia de siquimato y ATP (Figs. 55 y 56). Estos resultados parecían indicar que, efectivamente, el hecho de impedir que se produzca la reacción enzimática permite que el ATP y el siquimato permanezcan unidos al dominio SKI y así el cambio conformacional sufrido por este dominio (conformación “cargada”) puede ser transmitido al dominio NBzdRL de la quimera Q2, permitiendo la activación del promotor P_N .

De este modo, la quimera Q2 podría definirse como un nuevo regulador artificial similar a BzdR, capaz de controlar la activación del promotor P_N tanto *in vitro* como *in vivo* mediante una nueva molécula inductora, el siquimato. El posible papel de un ancestro evolutivo similar a la quimera Q2 en la evolución de los reguladores tipo BzdR será discutido más adelante en el apartado 4.4.

Merece la pena mencionar los experimentos llevados a cabo con las quimeras Q1 y Q2 que no poseen la región LBzdR. Estas dos nuevas quimeras, Q4 (Q1 sin *linker*) y Q5 (Q2 sin *linker*), fueron incapaces de transmitir el cambio conformacional mediado por el siquimato desde el dominio SKI hasta el dominio NBzdR, tanto en los ensayos de retardo y transcripción *in vitro* (Figs. 58A, 58B y 59A) como en los ensayos *in vivo* (Fig. 59B), lo que confirmaba que el papel del *linker* de BzdR era crucial en el proceso de transmisión de la información entre ambos dominios, como ya se había demostrado previamente con las quimeras $Q\lambda$ y $Q\lambda 2$. Además, los resultados obtenidos con las

quimeras Q λ , Q1 y Q2 revelan que el *linker* de BzdR es capaz de transmitir eficazmente la información entre dominios que no se encuentran presentes en la proteína BzdR parental, como es el caso del dominio de unión a DNA del represor CI del fago λ (quimera Q λ) o el dominio SKI de interacción con siquimato (quimeras Q1 y Q2). El papel del *linker* LBzdR en la transmisión de información entre distintos tipos de dominios de interacción con DNA y distintos dominios de interacción con distintos ligandos será objeto de futuras investigaciones, y podría revelar a la región LBzdR como una herramienta de gran interés en ingeniería de proteínas.

4.4 Modelo sobre el origen evolutivo de la proteína BzdR

Dada la similitud existente entre la enzima siquimato quinasa y el dominio CBzdR, y entre el dominio de unión a DNA de la familia de reguladores XRE (Cro/CI) y el dominio NBzdR, se puede establecer una hipótesis acerca del origen evolutivo de la proteína BzdR.

A priori, se puede especular bien con la existencia de un dominio ancestral común que dio origen tanto a la siquimato quinasa (enzima) como al dominio CBzdR (regulador), o bien con una posible evolución de la proteína siquimato quinasa hacia un dominio regulador CBzdR por pérdida de su actividad enzimática y adaptación del bolsillo de reconocimiento para el ligando benzoil-CoA. Sin embargo, dado que la enzima siquimato quinasa está ampliamente distribuida tanto en procariotas como en eucariotas y actúa en la ruta de biosíntesis de compuestos aromáticos, tales como algunos aminoácidos (Bentley, 1990; Haslam, 1993) que son moléculas básicas y esenciales en el desarrollo de la vida desde su inicio, cabría pensar que esta enzima tiene un origen evolutivo muy antiguo y anterior a la aparición de los reguladores transcripcionales de la subfamilia BzdR implicados en la regulación de una ruta de degradación sumamente compleja como la del benzoil-CoA, y que tan sólo se han identificado en proteobacterias de los subgrupos α y β . La observación de que ciertas bacterias, como por ejemplo algunas enterobacterias, posean dos siquimato quinasa de las cuales una de ellas (SKI) parece desempeñar un papel secundario en la biosíntesis de 3P-siquimato, pudiendo ejercer otro papel biológico todavía desconocido (Vinella *et al.*, 1996), también sugiere que el dominio siquimato quinasa está evolucionando y generando proteínas con nuevas funciones, e. g., el dominio CBzdR, la SKI de *E. coli*, o un dominio similar a SKI situado en el extremo N-terminal de un presunto regulador de

Legionella pneumophila (YP_122269.1) que presenta un motivo HTH de unión a DNA en el extremo C-terminal. Así, cabe sugerir que el gen *aroK* haya sufrido duplicaciones en algún punto de la evolución, de modo que cada una de las copias ha podido evolucionar de diferente forma, generando finalmente, en algunos casos, dos siquimato quinazas, y en otros, un dominio de reconocimiento de ligandos, como podría ser el caso de CBzdR.

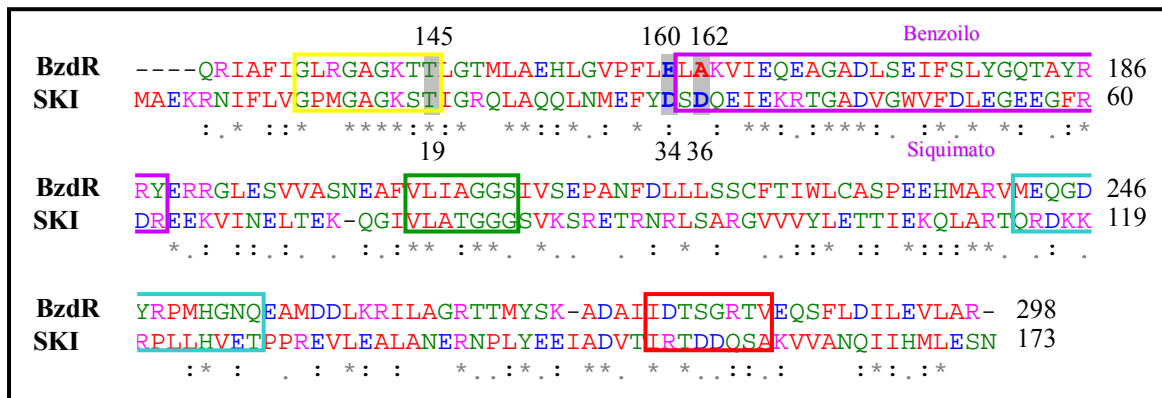


Figura 84. Alineamiento de secuencias de BzdR y la siquimato quinasa I de *E. coli* (SKI). Los residuos de cada una de las secuencias están numerados a la derecha. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa de alineamiento múltiple ClustalW2. Los aminoácidos han sido representados mediante el código de una letra y los cuatro colores en que se muestran representan el grupo de aminoácidos al que pertenecen: rojo = apolares; verde = polares sin carga; azul = ácidos; rosa = básicos. En la zona inferior del alineamiento, un asterisco (*) significa que los residuos de esa posición son idénticos en todas las secuencias; dos puntos (:) significa que existen sustituciones conservadas, acordes con el código de colores mencionado anteriormente; un punto (.) significa que existen sustituciones semi-conservadas. Se han remarcado con un rectángulo amarillo los residuos que constituyen el motivo Walker A; en violeta los residuos implicados en la unión de siquimato o del grupo benzoilo de la SKI y de BzdR, respectivamente; en verde el motivo Walker B; en azul los residuos pertenecientes a la región LID; y en rojo el motivo de unión a adenina. Por último, se han sombreado en color gris la treonina (Thr19) y los dos aspárticos (Asp34 y Asp36) de la SKI implicados en la unión del catión Mg^{2+} , así como los residuos correspondientes de BzdR (Thr145, Glu160 y Ala162).

En esta tesis se propone que la fusión de un dominio con actividad siquimato quinasa a un dominio capaz de reconocer DNA, probablemente de la familia Cro/CI, con una región *linker* capaz de transmitir los cambios conformacionales en respuesta a la presencia del ligando correspondiente, habría dado lugar a un intermediario evolutivo semejante a la quimera Q1. Este intermediario mantendría su actividad enzimática, pero ya habría adquirido la capacidad de unirse al DNA y actuar como un regulador transcripcional, todavía poco eficaz, del promotor P_N . En el transcurso de la evolución, este intermediario semejante a Q1 habría perdido la actividad enzimática convirtiéndose en un nuevo intermediario evolutivo semejante a la quimera Q2, capaz de actuar de forma más eficiente como regulador transcripcional. Curiosamente, si se realiza un

alineamiento entre BzdR y la SKI de *E. coli* (Fig. 84) se puede apreciar que de los tres residuos implicados en la unión de Mg^{2+} en la SKI (Thr19, Asp34 y Asp36) (Gu *et al.*, 2002), la proteína BzdR conserva dos de ellos (Thr145 y Glu160), siendo sustituido el Asp162 por Ala, la misma sustitución introducida en la quimera Q2. Así, una mutación similar pudo ser la responsable de la pérdida de actividad enzimática del intermediario evolutivo Q1 propuesto dando lugar al intermediario Q2.

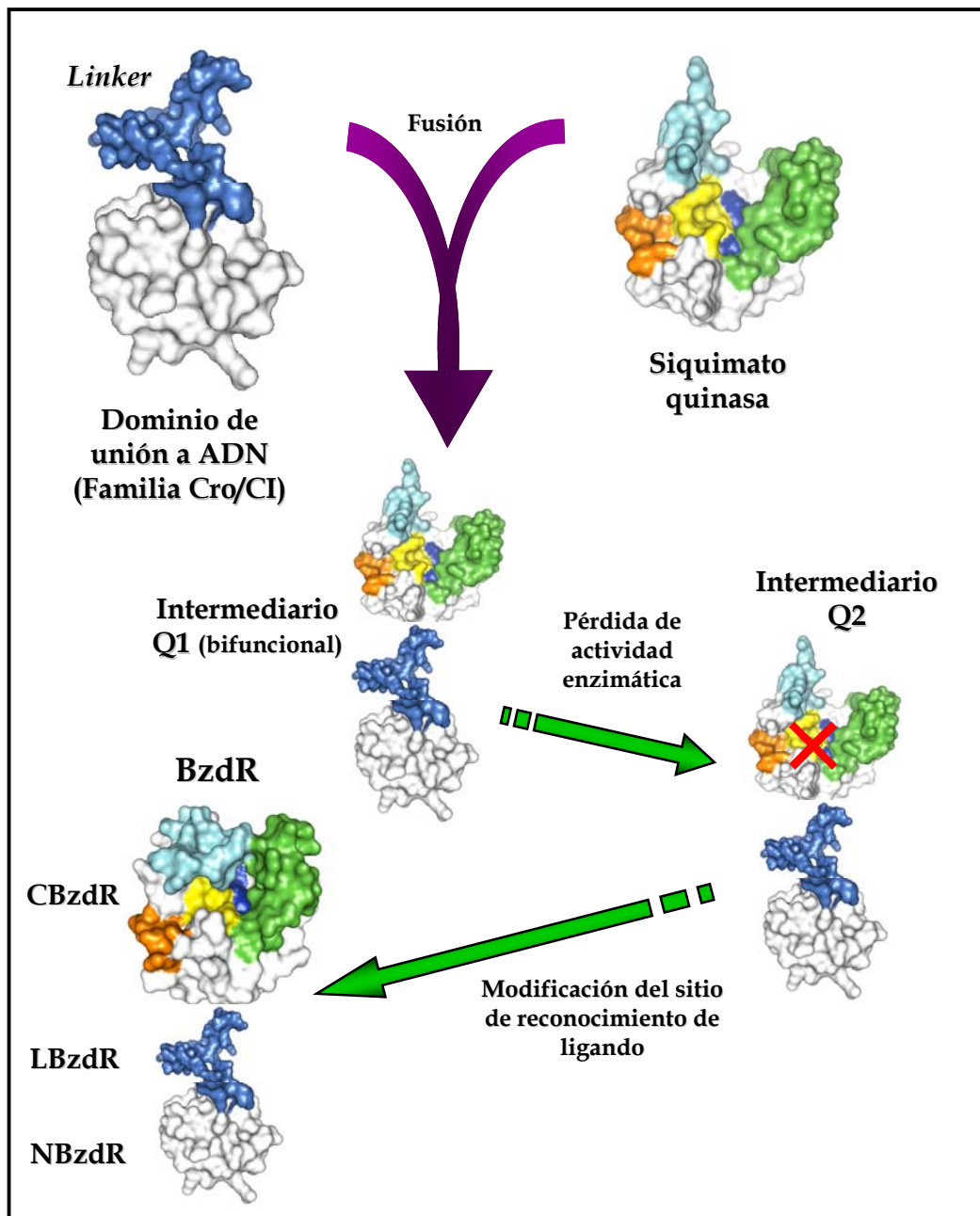


Figura 85. Modelo propuesto del origen evolutivo de la proteína BzdR. Las flechas moradas indican la fusión de la enzima siquimato quinasa con el motivo HTH de un miembro de la familia Cro/CI. Las dos estructuras representadas se corresponden con la SKI de *M. tuberculosis* (PDB: 2iyt) y con el modelo del dominio NBzdR. La región *linker* se indica en azul y la estructura presentada es hipotética. Las flechas verdes indican mutaciones sufridas en el proceso evolutivo de los intermediarios Q1 y Q2.

Posteriormente, el intermediario evolutivo semejante a Q2 habría sufrido una serie de cambios en el sitio de reconocimiento de sustrato, perdiendo la capacidad de reconocer eficazmente siquimato y ATP para reconocer de forma específica benzoil-CoA, dando lugar finalmente a la proteína BzdR actual (Fig. 85). En este sentido, cabe destacar la semejanza estructural que presentan las estructuras del benzoil-CoA por un lado, y del ATP y siquimato, por otro. Como se puede apreciar en la Figura 86, los extremos de la molécula de benzoil-CoA se encuentran formados por un grupo 3P-ADP, un análogo de la molécula de ATP, y por un grupo benzoilo, que presenta cierta similitud con la molécula de siquimato, a pesar de que este último no posee un anillo bencénico en su estructura y, por tanto, no es una estructura plana. Los resultados obtenidos en los ensayos de fluorescencia con CBzdR en presencia de ATP (Fig. 36) y en los ensayos de transcripción *in vitro* con BzdR en presencia de ATP (Fig. 44) han demostrado que el dominio CBzdR aún mantiene la capacidad de reconocer, con una baja afinidad, la molécula de ATP.

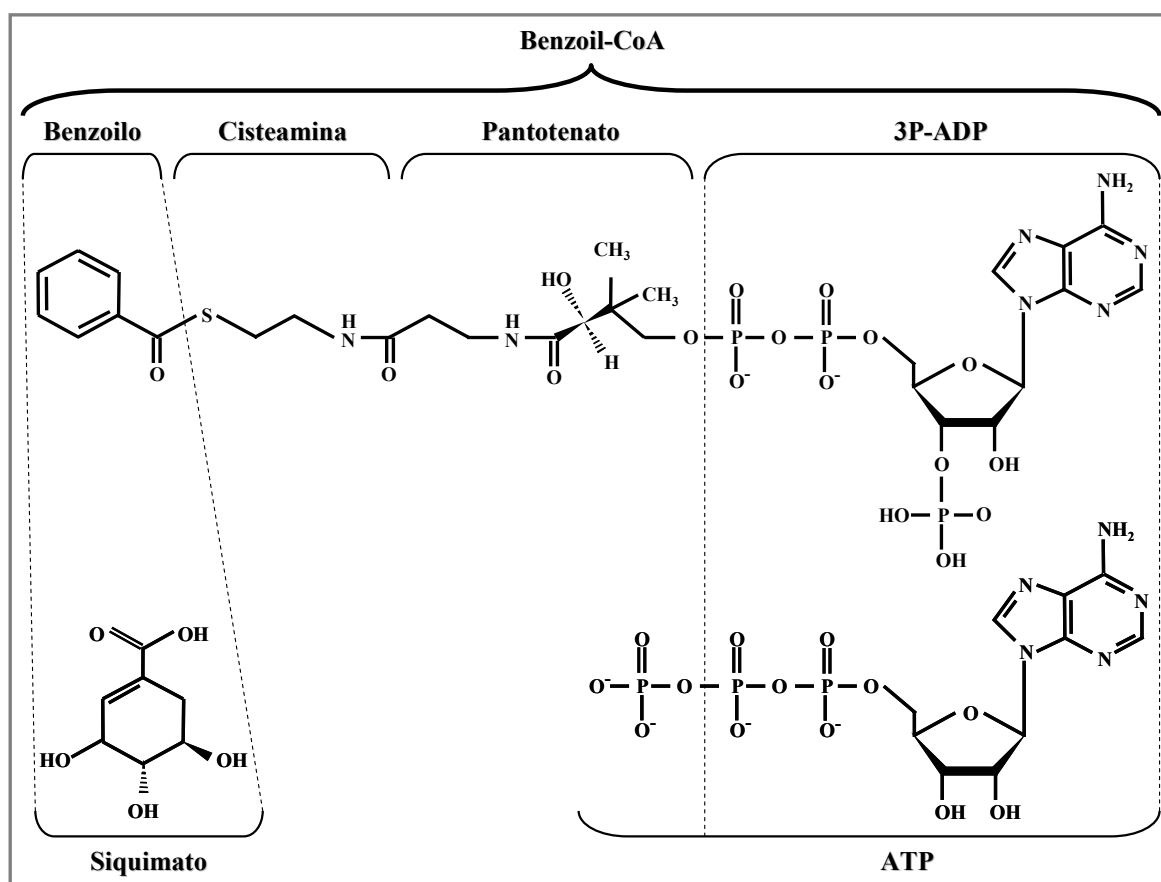


Figura 86. Estructura molecular del benzoil-CoA, del siquimato y del ATP. En la parte superior se han indicado cada uno de los grupos que componen la molécula de benzoil-CoA, i. e., benzoilo, cisteamina, pantotenato y 3P-ADP, y en la parte inferior de la figura se detallan la molécula de siquimato y de ATP. Las líneas punteadas agrupan a aquellas estructuras moleculares semejantes.

El hecho de que la molécula reconocida por BzdR sea benzoil-CoA, y no el propio benzoato, está de acuerdo con el hecho de que el benzoil-CoA (y no el benzoato) es un intermediario central en el que convergen diferentes rutas periféricas del catabolismo anaeróbico de un gran número de compuestos aromáticos (Harwood *et al.*, 1999; Fuchs, 2008; Carmona *et al.*, 2009), lo que permite que la activación de la ruta central (*cluster bzd*) necesaria para el metabolismo de todos estos compuestos sea compartida y responda al mismo mecanismo, lo que supone un evidente ahorro energético para la célula.

En la literatura se han descrito sólo unos pocos ejemplos, la mayoría en organismos eucariotas, de reguladores transcripcionales cuyo origen evolutivo podría residir en dominios enzimáticos que ya han perdido su actividad enzimática y únicamente poseen una actividad reguladora. Uno de estos reguladores transcripcionales es Gal80, un represor que interacciona directamente con Gal4, el activador transcripcional de los genes del catabolismo de la galactosa (*GAL*) en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Kluyveromyces lactis* (Lohr y López, 1995; Zenke *et al.*, 1996). La secuencia del represor Gal80 indica que posee un elevado grado de identidad con la familia de oxidorreductasas GFOR (*Glucose Fructose OxidoReductases*) (Aravind y Koonin, 1998). De hecho, la proteína Gal80 conserva un motivo Rossmann (*Rossmann fold*) típico de la familia GFOR, implicado en la unión de dinucleótidos. Sin embargo, la familia GFOR posee un motivo Glu-Lys-Pro conservado en su centro catalítico, que ya no aparece en la secuencia de Gal80, lo que sugiere que Gal80 no posee actividad enzimática oxidorreductasa (Aravind y Koonin, 1998), aunque sí mantiene su capacidad de unir nucleótidos, lo cual probablemente esté relacionado con que la reacción de activación dependa, no sólo de galactosa, sino también de ATP (Yano y Fukasawa, 1997). No obstante, si bien Gal80 es un represor de la transcripción, no lo hace directamente uniéndose al DNA, ni ha adquirido la capacidad de reconocer un nuevo sustrato, por lo que las modificaciones que haya sufrido, suponiendo que provenga de un miembro de la familia GFOR, no han sido muy drásticas.

Otro caso destacable es el de la proteína TAF_{II}150 de *Drosophila melanogaster*, uno de los componentes del complejo TFIID, que se une al DNA en regiones cercanas a los promotores (Verrijzer *et al.*, 1995), controlando la activación de la transcripción mediada por la RNAP-II en células eucariotas (Verrijzer *et al.*, 1994). La proteína TAF_{II}150 posee una elevada similitud con la familia de aminopeptidasas N (AMPN) (Aravind y Koonin, 1998), que incluye diversas enzimas implicadas en la degradación

de gran variedad de péptidos y leucotrienos, conservando prácticamente todos los residuos esenciales excepto las dos histidinas encargadas de unir los cofactores metálicos fundamentales en la actividad enzimática de los miembros de esta familia (Aravind y Koonin, 1998). De esta forma, la proteína TAF_{II}150 probablemente no posea actividad enzimática, aunque podría mantener la capacidad de unir alguno de los sustratos reconocidos por las aminopeptidasas (Aravind y Koonin, 1998). En este caso, TAF_{II}150 sí está directamente involucrado en la unión al DNA, pero no parece que reconozca nuevos ligandos, y, de ser así, nada indica que pudiera tener relación con su actividad de regulador transcripcional. Cabría mencionar un caso similar al de la proteína TAF_{II}150, el del regulador Cdc68/Spt16, una proteína asociada a cromatina que actúa como activadora de la transcripción en *Saccharomyces cerevisiae* (Aravind y Koonin, 1998).

Por último, cabe mencionar un caso descrito en procariotas, el de los factores de transcripción de la subfamilia HutC, pertenecientes a la familia de reguladores GntR. Entre las proteínas de esta subfamilia se encuentran la proteína HutC de *P. putida*, implicada en la represión de los genes de utilización de histidina e inactivada por la unión de uroconato (Allison y Phillips, 1990), o la proteína FarR de *E. coli*, que controla la expresión de los genes del ciclo del ácido cítrico y responde a ácidos grasos (Quail *et al.*, 1994). Todos los miembros de esta subfamilia poseen dos dominios, el N-terminal implicado en el reconocimiento de DNA y el C-terminal implicado en el reconocimiento de la molécula efectora (Gorelik *et al.*, 2006; Haydon y Guest, 1991) y que contiene un motivo similar al motivo de unión a sustrato que posee la enzima corismato liasa, implicada en la ruta de biosíntesis de compuestos aromáticos (Aravind y Anantharaman, 2003). Esta relación sugiere que el dominio C-terminal de la subfamilia HutC une moléculas de pequeño tamaño, tales como uroconato (HutC) (Allison y Phillips, 1990), ácidos grasos (FarR) (Quail *et al.*, 1994), azúcares (TreR) (Schock y Dahl, 1996) o alquilfosfonato (PhnF) (Metcalf y Wanner, 1993), en un motivo similar al sitio de unión de sustrato de la enzima corismato liasa, aunque ninguno de estos reguladores transcripcionales ha conservado los residuos catalíticos de la corismato liasa (Aravind y Anantharaman, 2003). Además, se ha podido comprobar que la corismato liasa se encuentra tanto en organismos procariotas como eucariotas y arqueas, a diferencia de los reguladores de la subfamilia HutC, que sólo han sido descritos en bacterias. De esta forma, se ha sugerido la existencia de un dominio ancestral de reconocimiento de moléculas pequeñas que evolucionó dando lugar a una variante enzimática (corismato

liasa) y a otra variante no enzimática (subfamilia de reguladores HutC) por medio de diferentes presiones selectivas a lo largo de la evolución (Aravind y Anantharaman, 2003). Aunque en el modelo del origen evolutivo de la proteína BzdR se hipotetiza que el dominio no catalítico CBzdR procede de un dominio con actividad siquimato quinasa (Fig. 85), tampoco puede descartarse que ambos dominios deriven de un ancestro común sin actividad catalítica, el cual habría evolucionado posteriormente en una dirección para originar las enzimas siquimato quinasas y, en otra dirección, para fusionarse a un dominio de unión a DNA y originar así los reguladores de la subfamilia BzdR, de forma análoga a lo que se ha propuesto para la evolución de los reguladores de la subfamilia HutC.

En conclusión, y hasta donde se ha podido saber, la proteína BzdR y las quimeras Q1 y Q2 constituyen el primer y único modelo descrito hasta la fecha sobre el origen evolutivo de un regulador transcripcional procariota, a partir de una actividad enzimática original y mediante la adquisición de un dominio de unión a DNA, dando lugar a la aparición de una nueva función reguladora de la transcripción.

Discusión 5. Estudio de la arquitectura del promotor P_N y su interacción con la proteína BzdR

La proteína BzdR reconoce a través de su dominio NBzdR tres regiones operadoras del promotor P_N que presentan secuencias palindrómicas del tipo TGCA (Barragán *et al.*, 2005). En la región operadora I se localizan dos secuencias palindrómicas, y al menos una secuencia palindrómica más en cada una de las regiones II y III (Barragán *et al.*, 2005) (Fig. 60).

El dominio NBzdR (residuos 1-90) muestra un elevado porcentaje de similitud (34% de identidad con la proteína SinR de *B. subtilis*) con los dominios de unión a DNA de los reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia HTH-XRE (Barragán *et al.*, 2005), que incluye a más de 1300 proteínas de diversos organismos eucariotas, procariontas, arqueas e incluso bacteriófagos, como la proteína Cro y el represor CI del fago λ , dos de los reguladores HTH-XRE mejor caracterizados hasta el momento (Pabo y Lewis, 1982; Roberts *et al.*, 1977; Sauer *et al.*, 1982). La secuencia reconocida por estos dos represores fágicos en sus correspondientes promotores consta de 3 regiones de 17 pb cada una, denominadas OR3, OR2 y OR1, y dispuestas entre los genes divergentes que codifican el represor CI y la proteína Cro. Los operadores OR son similares, pero no idénticos, y contienen secuencias palindrómicas en sus extremos (Ptashne y Hopkins, 1968; Ptashne *et al.*, 1976). Este tipo de estructuras palindrómicas es muy común en promotores no constitutivos que se ven sometidos a algún tipo de regulación mediada tanto por activadores como por represores transcripcionales. Concretamente, las secuencias palindrómicas del tipo TGCA reconocidas por la proteína BzdR ya han sido descritas en otras regiones operadoras como las que interaccionan con la proteína CopG, un homodímero de 45 aa codificado en los plásmidos de la familia pMV158 que controla la expresión de los genes *copG* y *repB* (implicados en la replicación del plásmido) mediante la represión del promotor P_{cr} (del Solar *et al.*, 1990). CopG presenta un motivo RHH (*Ribbon-Helix-Helix*) de unión a DNA y la región operadora del promotor P_{cr} que reconoce se extiende a lo largo de unos 50 pb que incluyen una secuencia palindrómica central del tipo TGCA que solapa con la caja -35 de unión de la RNAP (del Solar *et al.*, 1990; Gomis-Ruth *et al.*, 1998). Otro ejemplo de proteína reguladora que reconoce cajas operadoras que incluyen la secuencia TGCA es el regulador XylS, que controla la expresión del operón *meta* del catabolismo

de xilenos y otros hidrocarburos en *P. putida*. La proteína XylS actúa como un activador uniéndose a una región del promotor P_m que incluye dos palíndromos imperfectos del tipo TGCA-N₆-GGNTA (González-Pérez *et al.*, 1999). La proteína reguladora BenR, implicada en la regulación del catabolismo de benzoato y otros análogos en *P. putida*, también parece reconocer este tipo de palíndromo imperfecto (Cowles *et al.*, 2000). Estudios llevados a cabo sobre las secuencias de los promotores implicadas en la interacción con los reguladores transcripcionales han determinado que la secuencia TGCA debe presentar algún tipo de estructura que se ha visto relativamente favorecida a lo largo de la evolución como zona de reconocimiento de proteínas, como pone de manifiesto el hecho de que aparezca con el doble de frecuencia que su secuencia recíproca CATG (Ohno, 1990).

Con el fin de profundizar en la estructura del promotor P_N y su interacción con el represor BzdR, se purificaron por separado las tres regiones operadoras I, II y III (Fig. 60). Los ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I mostraron que las secuencias de reconocimiento de la proteína BzdR en las regiones I, II y III (Fig. 62) coinciden con las secuencias previamente establecidas con la sonda P_N completa (Barragán *et al.*, 2005), indicando una interacción correcta de la proteína BzdR con las regiones operadoras independientes. Sin embargo, los ensayos de retardo en gel pusieron de manifiesto una significativa mayor afinidad de BzdR por la región operadora I ($K_d \sim 10$ nM) que por las regiones II ($K_d \sim 250$ nM) y III ($K_d \sim 50$ nM) (Fig. 61). Desde el punto de vista mecanístico, este dato es consistente con el hecho de que la región operadora I posea dos secuencias palindrómicas TGCA mientras que las regiones II y III sólo poseen una (Fig. 60). Además, dado que el promotor P_N completo se retarda a concentraciones de regulador BzdR del orden de 50 nM (Fig. 30A), los resultados obtenidos con las regiones operadoras independientes sugieren la existencia de cooperatividad en la unión del regulador BzdR al promotor P_N . De este modo, el represor BzdR interaccionaría inicialmente con la región operadora I (primera banda de retardo en el segundo panel de la Fig. 30A; ver también Fig. 58A) y el complejo formado serviría para facilitar la interacción con las regiones II y III (segunda y tercera bandas de retardo en el segundo panel de la Fig. 30A; ver también Fig. 58A).

Para estudiar el posible papel de las regiones operadoras I, II y III en el promotor P_N , se llevaron a cabo una serie de ensayos en los que se comparó la actividad del promotor P_N (que incluye las tres regiones I, II y III) con la actividad promotora de la región I (P_{NI}) y de la región I+II (P_{NI+II}), utilizando fusiones de estos promotores con

el gen reportero *lacZ*. Tal y como muestran los resultados obtenidos en *E. coli* (Fig. 63), la actividad promotora en todos los casos fue prácticamente la misma. Además, la proteína BzdR expresada en multicopia fue capaz de reprimir eficazmente la actividad de los 3 promotores. Estos datos sugerían que el promotor P_{NI} permitía tanto la activación de la transcripción, lo que está de acuerdo con el hecho de que la región de interacción con el activador AcpR está localizada en el promotor P_{NI} (Fig. 60), como su represión en presencia de la proteína BzdR, lo que está de acuerdo con el hecho de que la región operadora I solape con el sitio de inicio de la transcripción (+1) del gen *bzdN* y con la caja -10 de reconocimiento de la RNAP, impidiendo así la correcta interacción de ésta con el promotor.

Cuando los ensayos de actividad promotora se realizaron en *Azoarcus* sp. CIB donde el gen regulador *bzdR* se localiza en monocopia en el cromosoma de la bacteria, sí se pudo apreciar una diferencia entre los niveles de represión de los promotores, siendo mayores en el promotor P_N completo y en P_{NI+II} que en P_{NI} (Fig. 64). Este resultado sugiere que el papel de las regiones operadoras II y III es incrementar la represión ejercida por BzdR sobre la región I y así reducir el nivel basal de actividad del promotor P_N en ausencia del inductor benzoil-CoA en *Azoarcus* sp. CIB. No obstante, la función de las 3 regiones operadoras del promotor P_N en el mecanismo de represión por BzdR y en la activación por benzoil-CoA necesita ser estudiado con más detalle en el futuro.

Los resultados mostrados hasta el momento revelan la interacción de la proteína BzdR con las tres regiones operadoras del promotor P_N , las cuales abarcan en total una secuencia de 177 pb (Fig. 60). Con el fin de elucidar el número de moléculas de represor BzdR que interaccionan con dichas regiones del promotor P_N , se llevaron a cabo ensayos de ultracentrifugación analítica.

Los ensayos de interacción proteína-DNA llevados a cabo mediante ultracentrifugación analítica demostraron que el dominio NBzdRL se une al promotor P_N con una relación molar 8:1, cuando la concentración de proteína utilizada (2 μ M) era 10 veces superior a la de DNA (0.2 μ M). Puesto que ya había sido demostrado que el dominio NBzdRL era un dímero en solución (Tabla 8), todo indicaba que se unen 4 dímeros (8 moléculas) del regulador al promotor P_N . Además, los datos indicaban que esta unión se producía de un modo cooperativo, ya que al incrementar la concentración de NBzdRL de 1 a 2 μ M, el número de moléculas de proteína unidas a P_N pasaba de 1 a

4 dímeros, y no seguía aumentando aunque se incrementase la concentración de NBzdRL hasta 8 μM (Fig. 65). Sin embargo, estos estudios no pudieron llevarse a cabo con tanta precisión con la proteína completa BzdR, debido a su tendencia a agregar. No obstante, los datos obtenidos permitieron estimar que a una concentración de proteína BzdR de 1 μM se unía un dímero, y que a una concentración de 2 μM se unían entre 8 y 10 moléculas, es decir, entre 4 y 5 dímeros de BzdR, lo que indica un comportamiento similar al de NBzdRL. Dado que se localizan dos regiones palindrómicas TGCA en la caja operadora I, y dos más en las cajas operadoras II y III, respectivamente (Fig. 60), parece lógico asumir que dos dímeros de BzdR se unan a la región I, y los otros dos dímeros a las regiones II y III del promotor P_N (Fig. 87). Esta hipótesis estaba de acuerdo con los ensayos de interacción entre NBzdRL y la región operadora I, que indicaban la unión de dos dímeros (4 moléculas) del regulador de forma cooperativa, ya que al incrementar la concentración de NBzdRL de 1 a 2 μM , el número de moléculas de proteína unidas a la región I pasaba de 1 a 2 dímeros, y no aumentaba aunque se incrementase la concentración de la proteína hasta 8 μM (Fig. 66).

Este tipo de unión cooperativa del regulador al promotor regulado ya se ha descrito para otros reguladores de la familia XRE, como es el caso de los represores Cro (Jana *et al.*, 1997) y CI (Bell *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 1981) del fago λ , o del represor CI del colifago 186 (Dodd y Egan, 1996), y es coherente con el papel biológico desempeñado por este regulador, de forma que en ausencia de benzoil-CoA en el medio, BzdR debe ser capaz de reprimir eficiente y rápidamente la expresión de los genes *bzd*, ya que de lo contrario su expresión supondría un gran gasto energético inútil para la célula.

Con el objetivo de confirmar y visualizar la interacción entre la proteína BzdR y el promotor P_N se utilizó la técnica de la microscopía de fuerzas atómicas (AFM). Esta técnica permitió la obtención de una serie de imágenes que, si bien no permitieron determinar el número exacto de moléculas de BzdR que se unen al promotor P_N (entre 4 y 5 dímeros), sí permitieron caracterizar qué tipo de complejos se forman entre la proteína BzdR y las regiones operadoras I, II y III del promotor P_N . Entre la diversidad de complejos observados (Fig. 68) cabe destacar la existencia de una superestructura que implicaba a las tres regiones operadoras (Fig. 69). El análisis de varias superestructuras permitió establecer un modelo de unión tipo lazo, en el cual el DNA abrazaba a las moléculas de proteína dando un giro sobre sí mismo (Fig. 69A). Este tipo de unión también ha sido descrito para otros complejos DNA-proteína como es el caso

del complejo formado por la proteína MutS con el DNA (Jia *et al.*, 2008), si bien otros reguladores transcripcionales, como por ejemplo la proteína TodT que controla la ruta *tod* de degradación aeróbica de tolueno en *P. putida*, interaccionan con el DNA diana siguiendo un modelo tipo horquilla (Lacal *et al.*, 2008). Merece la pena destacar que los estudios de AFM revelaron que el complejo formado entre BzdR y la región operadora I (Fig. 68) era compatible con la unión de dos dímeros de BzdR (Fig. 68C), lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por ultracentrifugación analítica y con la existencia de dos secuencias palindrómicas en dicha región operadora I, cada una de las cuales uniría un dímero de BzdR. Por otro lado, la adición de benzoil-CoA en los experimentos de AFM reveló una disminución notable del número de complejos DNA-proteína observados (Fig. 70), lo que estaba de acuerdo con el papel inductor del benzoil-CoA desfavoreciendo la interacción BzdR/ P_N y facilitando el despegue del represor de sus cajas operadoras en el promotor P_N .

5.1 Modelo del mecanismo de interacción BzdR/ P_N

En base a todos los datos presentados en esta tesis, se propone un modelo de regulación del promotor P_N que se esquematiza en la Figura 87. Según este modelo, la proteína dimérica BzdR se une al promotor P_N en forma de 4 dímeros que podrían establecer interacciones proteína-proteína entre ellos con el fin de estabilizar el complejo. Dos dímeros se unen inicialmente a la región operadora I y el complejo formado favorece la interacción de otros dos dímeros en las regiones operadoras II y III. En el complejo BzdR/ P_N formado la hebra de DNA rodearía a los cuatro dímeros de BzdR, que permanecerían en el interior de esta superestructura, manteniendo el sitio +1 y la caja -10 inaccesibles para la RNAP, razón por la cual en esta conformación el promotor P_N se mantendría reprimido.

En el modelo propuesto, el activador AcpR podría estar unido también en el complejo nucleoproteico, ya que su región de reconocimiento no solapa con ninguna región operadora de BzdR, entre el dímero de BzdR de la región II y uno de los dímeros de la región I (Fig 87) o podría unirse a su región operadora en alguna fase posterior de la activación del promotor.

La presencia de benzoil-CoA generado por la benzoato-CoA ligasa cuando *Azoarcus* sp. CIB encuentra benzoato en su medio de cultivo, permitiría la interacción de este ligando con el dominio CBzdR del represor, lo cual se traduciría finalmente en un cambio conformacional conducente al despegue de los dímeros de BzdR de sus regiones

operadoras en el promotor P_N , permitiendo así que la proteína AcpR reclute a la RNAP de modo que pueda interactuar con dicho promotor e iniciar su transcripción (Fig. 87).

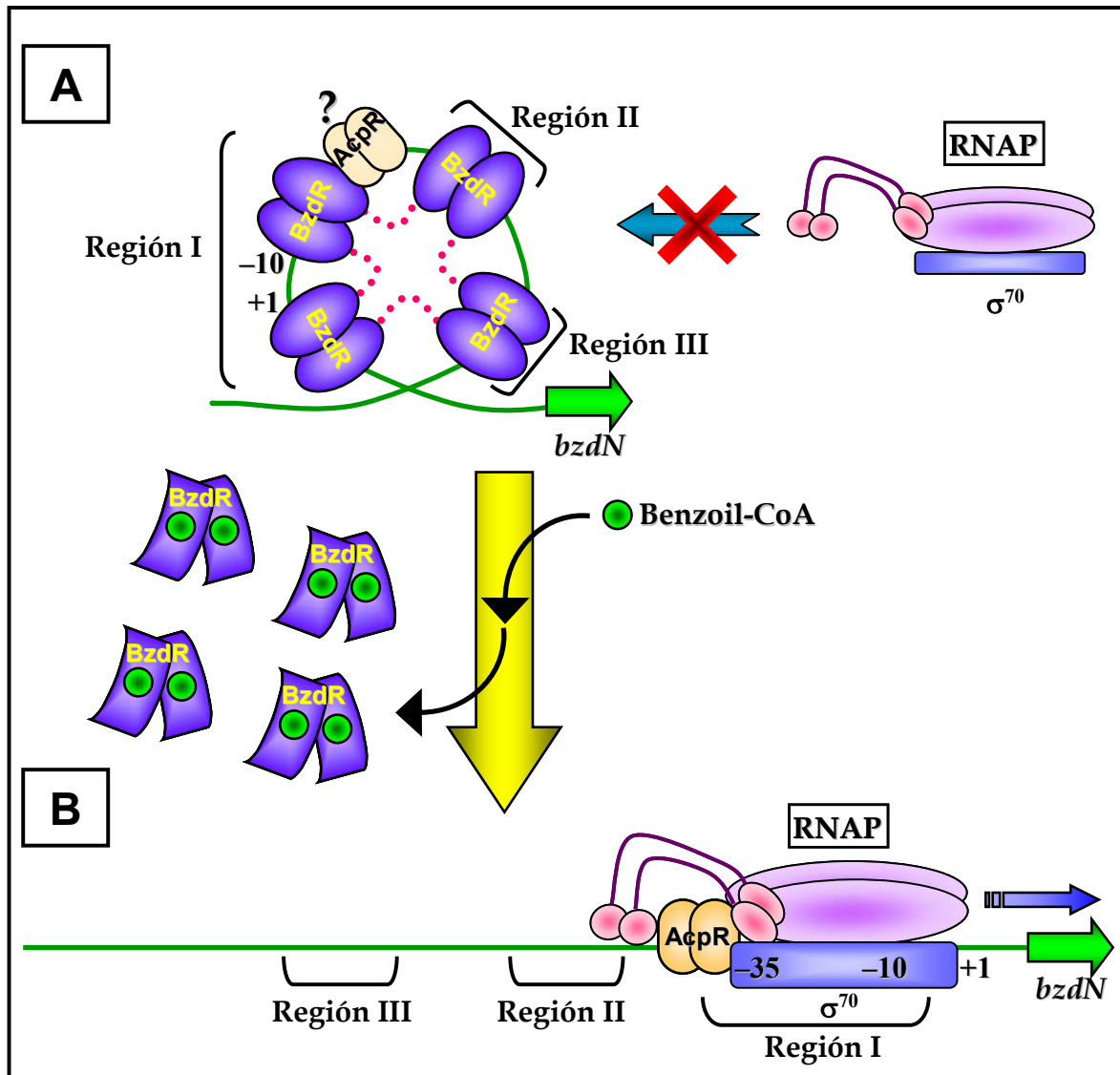


Figura 87. Esquema del modelo de regulación del promotor P_N . (A) Esquema de la "superestructura" del complejo BzdR/ P_N en ausencia de inductor no permitiendo la interacción con la RNAP. (B) Esquema del promotor P_N en presencia de inductor, benzoil-CoA, con AcpR y la RNAP en disposición de comenzar la transcripción. Las líneas rosas punteadas indican posibles interacciones proteína-proteína.

De esta forma, queda modelada la interacción y el mecanismo molecular subyacente entre el promotor P_N , las proteínas implicadas en su regulación y el inductor, mostrando un sistema complejo, sutil y robusto, dada la eficacia de la represión y la eficiente respuesta ante la aparición del efector. No obstante, quedan todavía numerosos interrogantes sobre el mecanismo de regulación específica del promotor P_N , como por

ejemplo el papel de las cajas operadoras II y III, el mecanismo de competición con la RNAP, etc. Además, a esta regulación específica mediada por BzdR se superpone una regulación que depende de las condiciones existentes en el medio como la disponibilidad de oxígeno, mediada, como se ha visto, por el activador AcpR, o la disponibilidad de diferentes fuentes de carbono simultáneamente, que da lugar a una represión catabólica mediada por factores desconocidos por el momento.

En conclusión, con los resultados presentados en esta tesis, el sistema regulador BzdR/ P_N se constituye como el modelo de estudio de mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos mejor caracterizado hasta la fecha.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A continuación se exponen las conclusiones extraídas a lo largo de este trabajo:

1. Se ha caracterizado la regulación sobreimpuesta mediada por oxígeno del *cluster bzd* implicado en la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB. La actividad del promotor catabólico P_N es estrictamente dependiente de la ausencia de oxígeno y requiere una proteína activadora, e. g., Fnr de *E. coli*, que se une a una región operadora centrada en la posición -42.5, indicando que se trata de un promotor de clase II.
2. La proteína Fnr está implicada tanto en el reclutamiento de la RNAP en el promotor P_N como en la formación del complejo abierto en el inicio de la transcripción.
3. Se ha identificado un nuevo gen regulador, denominado *acpR*, en *Azoarcus* sp. CIB que codifica un homólogo de la proteína Fnr de *E. coli*, cuyo papel es crucial en la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos ya que es imprescindible para la activación del promotor P_N en ausencia de oxígeno.
4. Se ha caracterizado la regulación del gen *bzdR*, cuya expresión a partir del promotor P_R está reprimida por la proteína BzdR y se activa débilmente en presencia del inductor benzoil-CoA.
5. La región operadora de la proteína BzdR en el promotor P_R solapa con las cajas -10 y -35 de interacción con la RNAP, así como con el sitio de inicio de la transcripción (+1), lo que está de acuerdo con la función represora observada para esta proteína.
6. Mientras que el promotor catabólico P_N se encuentra sometido a represión catabólica mediada por ácidos orgánicos no aromáticos, tales como succinato, piruvato o acetato, el promotor P_R no. Además, el promotor P_R tampoco está sometido al control dependiente de los niveles de oxígeno y mediado por la proteína AcpR.

7. La proteína BzdR, un homodímero con simetría bilateral, posee una arquitectura modular constituida por dos dominios, N-terminal (NBzdR) o efector y C-terminal (CBzdR) o regulador, conectados por una región *linker* (LBzdR). Ambos dominios son estructural y funcionalmente independientes. El dominio N-terminal purificado, tanto con *linker* (NBzdRL) como sin *linker* (NBzdR), es un dímero que interacciona específicamente con el DNA diana, convirtiéndose en un “super-represor” del promotor P_N *in vivo*. El dominio CBzdR purificado es un monómero que interacciona específicamente con la molécula efectora, benzoil-CoA, lo que se traduce en un cambio conformacional.

8. La región LBzdR está implicada en la transmisión de información desde el dominio CBzdR, que sufre un cambio conformacional al unir el benzoil-CoA, al dominio NBzdR, que detecta dicho cambio conformacional y modifica su interacción con el promotor P_N permitiendo su activación. Determinadas mutaciones en la región LBzdR impiden la conformación dimérica de BzdR y su interacción efectiva con el promotor P_N .

9. Se ha podido establecer un modelo de acción para la proteína BzdR basado en la similitud estructural del dominio CBzdR con la enzima siquimato quinasa, y del dominio NBzdR con la región de unión al DNA de reguladores de la familia HTH-XRE.

10. La naturaleza modular de la proteína BzdR ha permitido la construcción de quimeras artificiales con nuevas funciones reguladoras y que confirman la función asignada a cada uno de los dominios de BzdR. El dominio LCBzdR fusionado al dominio N-terminal del represor CI del fago λ dio lugar a una quimera ($Q\lambda$) capaz de controlar el ciclo lítico del fago, utilizando benzoil-CoA como molécula efectora. Por su parte, el dominio NBzdRL fusionado a la enzima SKI de *E. coli* dio lugar a una quimera (Q1) bifuncional, con actividad enzimática siquimato quinasa y capaz de controlar la actividad del promotor P_N *in vitro* utilizando siquimato como inductor. La eliminación selectiva de la actividad siquimato quinasa de la quimera Q1 mediante una mutación dirigida que impedía la unión del cofactor, Mg^{2+} , generó una nueva quimera (Q2) que actuaba en la célula como un regulador análogo a

BzdR pero que responde a siquimato, en lugar de a benzoil-CoA, para la activación del promotor P_N .

11. Los resultados obtenidos con las quimeras funcionales Q1 y Q2 han permitido la elaboración de un modelo sobre el origen evolutivo de la proteína BzdR basado en la fusión de un dominio siquimato quinasa con un dominio HTH de unión a DNA, y su posterior evolución al reconocimiento del benzoil-CoA como efector.
12. La proteína BzdR posee una mayor afinidad por la región operadora I del promotor P_N que por las regiones operadoras II y III. Aunque la región operadora I es suficiente para generar un promotor P_{NI} activo y sometido al control de BzdR, la presencia de las regiones operadoras II y III en el promotor P_N incrementa ligeramente los niveles de represión dependientes de BzdR.
13. La unión de la proteína BzdR a las tres regiones operadoras del promotor P_N es cooperativa. La estequiometría de la interacción es de 4 dímeros (8 moléculas) de BzdR por molécula de promotor P_N , uniéndose 2 dímeros a la región operadora I.
14. La interacción de la proteína BzdR con el promotor P_N se ha visualizado mediante la técnica de AFM, confirmando la unión de 4 dímeros de proteína en un complejo rodeado por el DNA a modo de lazo, así como el efecto del benzoil-CoA impidiendo dicha interacción.
15. En los resultados presentados en esta tesis, el modelo de control propuesto para el sistema regulador BzdR/ P_N es el más completo y mejor estudiado hasta la fecha en el catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abraham, W. R., Nogales, B., Golyshin, P. N., Pieper, D. H. y Timmis, K. N. (2002).** Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr Opin Microbiol* **5**, 246-253.
2. **Achong, G. R., Rodríguez, A. M. y Spormann, A. M. (2001).** Benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T: cloning, sequencing, transcriptional organization, and its role in anaerobic toluene and *m*-xylene mineralization. *J Bacteriol* **183**, 6763-6770.
3. **Aiba, H., Kato, N., Tsuzuki, M. y Mizuno, T. (1994).** Mechanism of gene activation by the *Escherichia coli* positive regulator, OmpR: a mutant defective in transcriptional activation. *FEBS Lett* **351**, 303-307.
4. **Alder, E. (1977).** Lignin chemistry past, present and future. pp. 169-218: Wood Sci. Technol. Berlin / Heidelberg: Springer.
5. **Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. y Lipman, D. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
6. **Allison, S. L. y Phillips, A. T. (1990).** Nucleotide sequence of the gene encoding the repressor for the histidine utilization genes of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **172**, 5470-5476.
7. **Anders, H. J., Kaetzke, A., Kampfer, P., Ludwig, W. y Fuchs, G. (1995).** Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying *pseudomonad* strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the β subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 327-333.
8. **Anderson, W. F., Ohlendorf, D. H., Takeda, Y. y Matthews, B. W. (1981).** Structure of the Cro repressor from bacteriophage λ and its interaction with DNA. *Nature* **290**, 754-758.
9. **Aranda-Olmedo, I., Ramos, J. L. y Marqués, S. (2005).** Integration of signals through Crc and PtsN in catabolite repression of *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4191-4198.
10. **Aranda-Olmedo, I., Marín, P., Ramos, J. L. y Marqués, S. (2006).** Role of the ptsN gene product in catabolite repression of the *Pseudomonas putida* TOL toluene degradation pathway in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol* **72**, 7418-7421.
11. **Aravind, L. y Koonin, E. V. (1998).** Eukaryotic transcription regulators derive from ancient enzymatic domains. *Curr Biol* **8**, R111-113.

12. **Aravind, L. y Anantharaman, V. (2003).** HutC/FarR-like bacterial transcription factors of the GntR family contain a small molecule-binding domain of the chorismate lyase fold. *FEMS Microbiol Lett* **222**, 17-23.
13. **Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M. y Iyer, L. M. (2005).** The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 231-262.
14. **Argos, P. (1990).** An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J Mol Biol* **211**, 943-958.
15. **Attey, A., Belyaeva, T., Savery, N., Hoggett, J., Fujita, N., Ishihama, A. y Busby, S. (1994).** Interactions between the cyclic AMP receptor protein and the alpha subunit of RNA polymerase at the *Escherichia coli* galactose operon P1 promoter. *Nucleic Acids Res* **22**, 4375-4380.
16. **Auburger, G. y Winter, J. (1996).** Activation and degradation of benzoate, 3-phenylpropionate and crotonate by *Syntrophus buswellii* strain GA. Evidence for electron-transport phosphorylation during crotonate respiration. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**, 807-815.
17. **Barragán, M. J., Blázquez, B., Zamarro, M. T., Mancheño, J. M., García, J. L., Díaz, E. y Carmona, M. (2005).** BzdR, a repressor that controls the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB, is the first member of a new subfamily of transcriptional regulators. *J Biol Chem* **280**, 10683-10694.
18. **Becker, D. F. y Thomas, E. A. (2001).** Redox properties of the PutA protein from *Escherichia coli* and the influence of the flavin redox state on PutA-DNA interactions. *Biochemistry* **40**, 4714-4721.
19. **Bell, A. y Busby, S. (1994).** Location and orientation of an activating region in the *Escherichia coli* transcription factor, FNR. *Mol Microbiol* **11**, 383-390.
20. **Bell, A. I., Cole, J. A. y Busby, S. J. (1990).** Molecular genetic analysis of an FNR-dependent anaerobically inducible *Escherichia coli* promoter. *Mol Microbiol* **4**, 1753-1763.
21. **Bell, C. E., Frescura, P., Hochschild, A. y Lewis, M. (2000).** Crystal structure of the λ repressor C-terminal domain provides a model for cooperative operator binding. *Cell* **101**, 801-811.
22. **Bentley, R. (1990).** The shikimate pathway - a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**, 307-384.
23. **Biegert, T., Altenschmidt, U., Eckerskorn, C. y Fuchs, G. (1993).** Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-Hydroxybenzoate-CoA ligase from a denitrifying *Pseudomonas* species. *Eur J Biochem* **213**, 555-561.

24. **Blázquez, B., Carmona, M., García, J. L. y Díaz, E. (2008).** Identification and analysis of a glutaryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp. CIB. *Environ Microbiol* **10**, 474-482.
25. **Bohm, G., Muhr, R. y Jaenicke, R. (1992).** Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* **5**, 191-195.
26. **Boll, M. y Fuchs, G. (1995).** Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur J Biochem / FEBS* **234**, 921-933.
27. **Boll, M., Fuchs, G. y Heider, J. (2002).** Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 604-611.
28. **Boll, M. (2005a).** Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. *Biochim Biophys Acta* **1707**, 34-50.
29. **Boll, M. (2005b).** Dearomatizing benzene ring reductases. *J Mol Microbiol Biotechnol* **10**, 132-142.
30. **Branden, C. y Tooze, J. (1999).** DNA Recognition in Procaryotes by Helix-Turn-Helix Motifs. In *Introduction to Protein Structure*, pp. 129-149. New York: Garland Publishing, Inc.
31. **Breese, K., Boll, M., Alt-Morbe, J., Schagger, H. y Fuchs, G. (1998).** Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* **256**, 148-154.
32. **Brodskii, L. I., Ivanov, V. V., Kalaïdzidis, Ia. L., Leontovich, A. M., Nikolaev, V. K., Feranchuk, S. I. y Drachev, V. A. (1995).** [GeneBee-NET: An Internet based server for biopolymer structure analysis]. *Biokhimiia* **60**(8):1221-1230.
33. **Brown, E. D. y Wood, J. M. (1992).** Redesigned purification yields a fully functional PutA protein dimer from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 13086-13092.
34. **Brown, E. D. y Wood, J. M. (1993).** Conformational change and membrane association of the PutA protein are coincident with reduction of its FAD cofactor by proline. *J Biol Chem* **268**, 8972-8979.
35. **Burz, D. S., Beckett, D., Benson, N. y Ackers, G. K. (1994).** Self-assembly of bacteriophage λ cI repressor: effects of single-site mutations on the monomer-dimer equilibrium. *Biochemistry* **33**, 8399-8405.
36. **Busby, S. y Ebright, R. H. (1999).** Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**, 199-213.

37. **Busch, A., Lacal, J., Martos, A., Ramos, J. L. y Krell, T. (2007).** Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13774-13779.
38. **Butler, J. E., He, Q., Nevin, K. P., He, Z., Zhou, J. y Lovley, D. R. (2007).** Genomic and microarray analysis of aromatics degradation in *Geobacter metallireducens* and comparison to a *Geobacter* isolate from a contaminated field site. *BMC Genomics* **8**, 180.
39. **Canosa, I., Sánchez-Romero, J. M., Yuste, L. y Rojo, F. (2000).** A positive feedback mechanism controls expression of AlkS, the transcriptional regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *Mol Microbiol* **35**, 791-799.
40. **Carmona, M. y Díaz, E. (2005).** Iron-reducing bacteria unravel novel strategies for the anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Mol Microbiol* **58**, 1210-1215.
41. **Carmona, M., Prieto, M. A., Galán, B., García, J. L. y Díaz, E. (2008).** Signaling networks and design of pollutants biosensors. In *Microbial Biodegradation: genomics and molecular biology*, pp. 97-143. Edited by E. Díaz. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
42. **Carmona, M., Zamarro, M. T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J. F., Valderrama, J. A., Barragán, M. J., García, J. L. y Díaz, E. (2009).** Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 71-133.
43. **Casadaban, M. J. (1976).** Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage λ and Mu. *J Mol Biol* **104**, 541-555.
44. **Cases, I., Ussery, D. W. y de Lorenzo, V. (2003).** The sigma54 regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **5**, 1281-1293.
45. **Cases, I. y de Lorenzo, V. (2005).** Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Microbiol* **3**, 105-118.
46. **Cervin, M. A., Lewis, R. J., Brannigan, J. A. y Spiegelman, G. B. (1998).** The *Bacillus subtilis* regulator SinR inhibits spoIIG promoter transcription in vitro without displacing RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **26**, 3806-3812.
47. **Chakraborty, R. y Coates, J. D. (2004).** Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 437-446.
48. **Chapman-Smith, A., Mulhern, T. D., Whelan, F., Cronan, J. E., Jr. y Wallace, J. C. (2001).** The C-terminal domain of biotin protein ligase from *E. coli* is required for catalytic activity. *Protein Sci* **10**, 2608-2617.

49. **Chee-Sanford, J. C., Frost, J. W., Fries, M. R., Zhou, J. y Tiedje, J. M. (1996).** Evidence for acetyl coenzyme A and cinnamoyl coenzyme A in the anaerobic toluene mineralization pathway in *Azoarcus toluolyticus* Tol-4. *Appl Environ Microbiol* **62**, 964-973.
50. **Clark, T. J., Phillips, R. S., Bundy, B. M., Momany, C. y Neidle, E. L. (2004).** Benzoate decreases the binding of *cis,cis*-muconate to the BenM regulator despite the synergistic effect of both compounds on transcriptional activation. *J Bacteriol* **186**, 1200-1204.
51. **Coates, J. D., Chakraborty, R. y McInerney, M. J. (2002).** Anaerobic benzene biodegradation - a new era. *Res Microbiol* **153**, 621-628.
52. **Coggins, J. R. (1989).** The shikimate pathway as a target for herbicides. In *Herbicides and Plant Metabolism*, pp. 97-112. Edited by A. D. Dodge. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
53. **Cole, C., Barber, J. D. y Barton, G. J. (2008).** The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* **36**, W197-201.
54. **Collier, D. N., Hager, P. W. y Phibbs, P. V., Jr. (1996).** Catabolite repression control in the *Pseudomonads*. *Res Microbiol* **147**, 551-561.
55. **Collier, L. S., Gaines, G. L. 3rd y Neidle, E. L. (1998).** Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J Bacteriol* **180**, 2493-2501.
56. **Coschigano, P. W. (2000).** Transcriptional analysis of the *tutE tutFDGH* gene cluster from *Thauera aromatica* strain T1. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1147-1151.
57. **Coschigano, P. W. y Bishop, B. J. (2004).** Role of benzylsuccinate in the induction of the *tutE tutFDGH* gene complex of *T. aromatica* strain T1. *FEMS Microbiol Lett* **231**, 261-266.
58. **Cowles, C. E., Nichols, N. N. y Harwood, C. S. (2000).** BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **182**, 6339-6346.
59. **Cronan, J. E., Jr. (1989).** The *E. coli bio* operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell* **58**, 427-429.
60. **Dagley, S. (1978).** Determinants of biodegradability. *Q Rev Biophys* **11**, 577-602.
61. **Darling, P. J., Holt, J. M. y Ackers, G. K. (2000).** Coupled energetics of λ cro repressor self-assembly and site-specific DNA operator binding I: analysis of cro dimerization from nanomolar to micromolar concentrations. *Biochemistry* **39**, 11500-11507.

62. **Davies, G. M., Barrett-Bee, K. J., Jude, D. A., Lehan, M., Nichols, W. W., Pinder, P. E., Thain, J. L., Watkins, W. J. y Wilson, R. G. (1994).** (6S)-6-fluoroshikimic acid, an antibacterial agent acting on the aromatic biosynthetic pathway. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 403-406.
63. **De Anda, J., Poteete, A. R. y Sauer, R. T. (1983).** P22 c2 repressor. Domain structure and function. *J Biol Chem* **258**, 10536-10542.
64. **De Feyter, R. (1987).** Shikimate kinases from *Escherichia coli* K12. *Methods Enzymol* **142**, 355-361.
65. **de Lorenzo, V. y Timmis, K. N. (1994).** Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**, 386-405.
66. **de Lorenzo, V. y Pérez-Martín, J. (1996).** Regulatory noise in prokaryotic promoters: how bacteria learn to respond to novel environmental signals. *Mol Microbiol* **19**, 1177-1184.
67. **DeFeyter, R. C., Davidson, B. E. y Pittard, J. (1986).** Nucleotide sequence of the transcription unit containing the *aroL* and *aroM* genes from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **165**, 233-239.
68. **DeFeyter, R. C. y Pittard, J. (1986).** Purification and properties of shikimate kinase II from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **165**, 331-333.
69. **del Solar, G. H., Pérez-Martín, J. y Espinosa, M. (1990).** Plasmid pLS1-encoded RepA protein regulates transcription from *repAB* promoter by binding to a DNA sequence containing a 13-base pair symmetric element. *J Biol Chem* **265**, 12569-12575.
70. **Deneb, V. J., Klappenbach, J. A., Patrauchan., M. A., Florizone, C., Rodrigues, J. L., Tsoi, T. V., Verstraete, W., Eltis, L. D., Tiedje, J. M. (2006).** Genetic and genomic insights into the role of benzoate-catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl Environ Microbiol* **72**, 585-95.
71. **Di Lallo, G., Ghelardini, P. y Paolozzi, L. (1999).** Two-hybrid assay: construction of an *Escherichia coli* system to quantify homodimerization ability in vivo. *Microbiology* **145**, 1485-1490.
72. **Díaz, E. y Prieto, M. A. (2000).** Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 467-475.
73. **Díaz, E. (2004).** Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* **7**, 173-180.
74. **Dimroth, P. y Schink, B. (1998).** Energy conservation in the decarboxylation of dicarboxylic acids by fermenting bacteria. *Arch Microbiol* **170**, 69-77.

75. **Dispensa, M., Thomas, C. T., Kim, M. K., Perrotta, J. A., Gibson, J. y Harwood, C. S. (1992).** Anaerobic growth of *Rhodopseudomonas palustris* on 4-hydroxybenzoate is dependent on AadR, a member of the cyclic AMP receptor protein family of transcriptional regulators. *J Bacteriol* **174**, 5803-5813.
76. **Dodd, I. B. y Egan, J. B. (1996).** DNA binding by the coliphage 186 repressor protein CI. *J Biol Chem* **271**, 11532-11540.
77. **Dorner, E. y Boll, M. (2002).** Properties of 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase from *Thauera aromatica* and its role in enzymatic reduction of the aromatic ring. *J Bacteriol* **184**, 3975-3983.
78. **Drummond, M., Whitty, P. y Wootton, J. (1986).** Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. *EMBO J* **5**, 441-447.
79. **Drummond, M. H. y Wootton, J. C. (1987).** Sequence of *nifL* from *Klebsiella pneumoniae*: mode of action and relationship to two families of regulatory proteins. *Mol Microbiol* **1**, 37-44.
80. **Dziejman, M. y Mekalanos, J. J. (1994).** Analysis of membrane protein interaction: ToxR can dimerize the amino terminus of phage λ repressor. *Mol Microbiol* **13**, 485-494.
81. **Egland, P. G., Pelletier, D. A., Dispensa, M., Gibson, J. y Harwood, C. S. (1997).** A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6484-6489.
82. **Egland, P. G. y Harwood, C. S. (1999).** BadR, a new MarR family member, regulates anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in concert with AadR, an Fnr family member. *J Bacteriol* **181**, 2102-2109.
83. **Egland, P. G. y Harwood, C. S. (2000).** HbaR, a 4-hydroxybenzoate sensor and FNR-CRP superfamily member, regulates anaerobic 4-hydroxybenzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* **182**, 100-106.
84. **Egorov, A. M., Avilova, T. V., Dikov, M. M., Popov, V. O., Rodionov, Y. V. y Berezin, I. V. (1979).** NAD-dependent formate dehydrogenase from *Methylophilic bacterium*, strain 1. Purification and characterization. *Eur J Biochem* **99**, 569-576.
85. **Eisenberg, M. A., Prakash, O. y Hsiung, S. C. (1982).** Purification and properties of the biotin repressor. A bifunctional protein. *J Biol Chem* **257**, 15167-15173.
86. **Elshahed, M. S., Bhupathiraju, V. K., Wofford, N. Q., Nanny, M. A. y McInerney, M. J. (2001).** Metabolism of benzoate, cyclohex-1-ene carboxylate, and cyclohexane carboxylate by "*Syntrophus aciditrophicus*" strain SB in syntrophic association with H₂-using microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1728-1738.

87. **Elshahed, M. S. y McInerney, M. J. (2001).** Benzoate fermentation by the anaerobic bacterium *Syntrophus aciditrophicus* in the absence of hydrogen-using microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5520-5525.
88. **Ely, B. y Pittard, J. (1979).** Aromatic amino acid biosynthesis: regulation of shikimate kinase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **138**, 933-943.
89. **Evans, W. C. y Fuchs, G. (1988).** Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* **42**, 289-317.
90. **Felsenstein, J. (1993).** PHYLIP (Phylogenetic Interface Package), versión 3.5.1. University of Washington, Seattle.
91. **Fernández, S., de Lorenzo, V. y Pérez-Martín, J. (1995).** Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol Microbiol* **16**, 205-213.
92. **Ferrández, A., Miñambres, B., García, B., Olivera, E. R., Luengo, J. M., García, J. L. y Díaz, E. (1998).** Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *J Biol Chem* **273**, 25974-25986.
93. **Ferrández, A., García, J. L. y Díaz, E. (2000).** Transcriptional regulation of the divergent *paa* catabolic operons for phenylacetic acid degradation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 12214-12222.
94. **Foster, J. W., Park, Y. K., Penfound, T., Fenger, T. y Spector, M. P. (1990).** Regulation of NAD metabolism in *Salmonella typhimurium*: molecular sequence analysis of the bifunctional *nadR* regulator and the *nadA-pnuC* operon. *J Bacteriol* **172**, 4187-4196.
95. **Fries, M. R., Zhou, J., Chee-Sanford, J. y Tiedje, J. M. (1994).** Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2802-2810.
96. **Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poustka, A. y Murray, N. (1983).** λ replacement vectors carrying polylinker sequences. *J Mol Biol* **170**, 827-842.
97. **Fu, Z., Wang, M., Paschke, R., Rao, K. S., Frerman, F. E. y Kim, J. J. (2004).** Crystal structures of human glutaryl-CoA dehydrogenase with and without an alternate substrate: structural bases of dehydrogenation and decarboxylation reactions. *Biochemistry* **43**, 9674-9684.
98. **Fuchs, G. (2008).** Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Ann N Y Acad Sci* **1125**, 82-99.
99. **Gallus, C. y Schink, B. (1994).** Anaerobic degradation of pimelate by newly isolated denitrifying bacteria. *Microbiology* **140**, 409-416.

100. Gerhardt, P., Morroy, R. G. E., Woody, W. A. y Krieg, N. R. (1994). *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington DC: American Society for Microbiology.
101. Gescher, J., Ismail, W., Olgeschläger, E., Eisenreich, W., Wörth, J., Fuchs, G. (2006). Aerobic benzoyl-coenzyme A (CoA) catabolic pathway in *Azoarcus evansii*: conversion of ring cleavage product by 3,4-dehydroadipyl-CoA semialdehyde dehydrogenase. *J Bacteriol* **188**, 2919-27.
102. Gescher, J., Zaar, A., Mohamed, M., Schägger, H., Fuchs, G. (2002). Genes coding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *J Bacteriol* **184**, 6301-15.
103. Gibson, J., Dispensa, M., Fogg, G. C., Evans, D. T. y Harwood, C. S. (1994). 4-Hydroxybenzoate-coenzyme A ligase from *Rhodopseudomonas palustris*: purification, gene sequence, and role in anaerobic degradation. *J Bacteriol* **176**, 634-641.
104. Gibson, J. y Harwood, C. S. (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu Rev Microbiol* **56**, 345-369.
105. Giel, J. L., Rodionov, D., Liu, M., Blattner, F. R., Kiley, P. J. (2006). IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O₂-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **60**, 1058-75.
106. Gomes, B., Fendrich, G. y Abeles, R. H. (1981). Mechanism of action of glutaryl-CoA and butyryl-CoA dehydrogenases. Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry* **20**, 1481-1490.
107. Gomis-Ruth, F. X., Sola, M., Acebo, P., Parraga, A., Guasch, A., Eritja, R., González, A., Espinosa, M., del Solar, G. y Coll, M. (1998). The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *EMBO J* **17**, 7404-7415.
108. González-Pérez, M. M., Ramos, J. L., Gallegos, M. T. y Marqués, S. (1999). Critical nucleotides in the upstream region of the XylS-dependent TOL meta-cleavage pathway operon promoter as deduced from analysis of mutants. *J Biol Chem* **274**, 2286-2290.
109. Gorelik, M., Lunin, V. V., Skarina, T. y Savchenko, A. (2006). Structural characterization of GntR/HutC family signaling domain. *Protein Sci* **15**, 1506-1511.
110. Green, J., Irvine, A. S., Meng, W. y Guest, J. R. (1996). FNR-DNA interactions at natural and semi-synthetic promoters. *Mol Microbiol* **19**, 125-137.
111. Grose, J. H., Bergthorsson, U. y Roth, J. R. (2005). Regulation of NAD synthesis by the trifunctional NadR protein of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **187**, 2774-2782.

112. **Gu, D., Zhou, Y., Kallhoff, V., Baban, B., Tanner, J. J. y Becker, D. F. (2004).** Identification and characterization of the DNA-binding domain of the multifunctional PutA flavoenzyme. *J Biol Chem* **279**, 31171-31176.
113. **Gu, Y., Reshetnikova, L., Li, Y., Wu, Y., Yan, H., Singh, S. y Ji, X. (2002).** Crystal structure of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the dynamic role of the LID domain in catalysis. *J Mol Biol* **319**, 779-789.
114. **Guest, J. R., J. Green, A. S. Irvine and S. Spiro (1996).** The FNR modulation and FNR-regulated gene expression. In *Regulation of gene expression in Escherichia coli*, pp. 317-342. Edited by C. C. Austin, Tex.: R. G. Landes Company.
115. **Guidi-Rontani, C., Danchin, A. y Ullmann, A. (1980).** Catabolite repression in *Escherichia coli* mutants lacking cyclic AMP receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 5799-5801.
116. **Hagblom, M. M., Knight, V. K. y Kerkhof, L. J. (2000).** Anaerobic decomposition of halogenated aromatic compounds. *Environ Pollut* **107**, 199-207.
117. **Hall, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95-98.
118. **Harrison, F. H. y Harwood, C. S. (2005).** The *pimFABCDE* operon from *Rhodopseudomonas palustris* mediates dicarboxylic acid degradation and participates in anaerobic benzoate degradation. *Microbiology* **151**, 727-736.
119. **Hartmann, M. D., Bourenkov, G. P., Oberschall, A., Strizhov, N. y Bartunik, H. D. (2006).** Mechanism of phosphoryl transfer catalyzed by shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol* **364**, 411-423.
120. **Harwood, C. S., Burchhardt, H., Herrmann, H. y Fuchs, G. (1999).** Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 439-458.
121. **Haslam, E. (1993).** *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*. New York: Wiley: Chichester.
122. **Haydon, D. J. y Guest, J. R. (1991).** A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiol Lett* **63**, 291-295.
123. **Heider, J. y Fuchs, G. (1997).** Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem* **243**, 577-596.
124. **Heider, J., Boll, M., Breese, K., Breinig, S., Ebenau-Jehle, C., Feil, U., Gad'on, N., Laempe, D., Leuthner, B., Mohamed, M. E.-S., Schneider, S., Burchhardt, G. y Fuchs, G. (1998).** Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch Microbiol* **170**, 120-131.

125. **Herrero, M., de Lorenzo, V. y Timmis, K. N. (1990).** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**, 6557-6567.
126. **Herskowitz, I. (1973).** Control of gene expression in bacteriophage λ . *Annu Rev Genet* **7**, 289-324.
127. **Hess, A., Zarda, B., Hahn, D., Haner, A., Stax, D., Hohener, P. y Zeyer, J. (1997).** In situ analysis of denitrifying toluene- and *m*-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2136-2141.
128. **Heymann, J. B. y Belnap, D. M. (2007).** Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy. *J Struct Biol* **157**, 3-18.
129. **Horcas, I., Fernández, R., Gómez-Rodríguez, J. M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. y Baro, A. M. (2007).** WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum* **78**, 013705.
130. **Hu, J. C., O'Shea, E. K., Kim, P. S. y Sauer, R. T. (1990).** Sequence requirements for coiled-coils: analysis with λ repressor-GCN4 leucine zipper fusions. *Science* **250**, 1400-1403.
131. **Jaenecke, S., de Lorenzo, V., Timmis, K. N. y Díaz, E. (1996).** A stringently controlled expression system for analysing lateral gene transfer between bacteria. *Mol Microbiol* **21**, 293-300.
132. **Jana, R., Hazbun, T. R., Mollah, A. K. y Mossing, M. C. (1997).** A folded monomeric intermediate in the formation of λ Cro dimer-DNA complexes. *J Mol Biol* **273**, 402-416.
133. **Jia, Y., Bi, L., Li, F., Chen, Y., Zhang, C. y Zhang, X. (2008).** Alpha-shaped DNA loops induced by MutS. *Biochem Biophys Res Commun* **372**, 618-622.
134. **Johnson, A. D., Poteete, A. R., Lauer, G., Sauer, R. T., Ackers, G. K. y Ptashne, M. (1981).** λ repressor and cro - components of an efficient molecular switch. *Nature* **294**, 217-223.
135. **Kawaguchi, K., Shinoda, Y., Yurimoto, H., Sakai, Y. y Kato, N. (2006).** Purification and characterization of benzoate-CoA ligase from *Magnetospirillum* sp. strain TS-6 capable of aerobic and anaerobic degradation of aromatic compounds. *FEMS Microbiol Lett* **257**, 208-213.
136. **Khoroshilova, N., Popescu, C., Munck, E., Beinert, H. y Kiley, P. J. (1997).** Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6087-6092.

137. **Kiley, P. J. y Reznikoff, W. S. (1991).** Fnr mutants that activate gene expression in the presence of oxygen. *J Bacteriol* **173**, 16-22.
138. **Kishore, G. M. y Shah, D. M. (1988).** Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu Rev Biochem* **57**, 627-663.
139. **Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. y Adhya, S. (1993).** Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* **62**, 749-795.
140. **Korner, H., Sofia, H. J. y Zumft, W. G. (2003).** Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 559-592.
141. **Koudelka, G. B. y Lam, C. Y. (1993).** Differential recognition of OR1 and OR3 by bacteriophage 434 repressor and Cro. *J Biol Chem* **268**, 23812-23817.
142. **Kovach, M., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. I. y Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-176.
143. **Krell, T., Coyle, J. E., Horsburgh, M. J., Coggins, J. R. y Laphorn, A. J. (1997).** Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of shikimate kinase from *Erwinia chrysanthemi*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 612-614.
144. **Krell, T., Coggins, J. R. y Laphorn, A. J. (1998).** The three-dimensional structure of shikimate kinase. *J Mol Biol* **278**, 983-997.
145. **Kukolj, G., Toliás, P. P. y DuBow, M. S. (1989).** Purification and characterization of the Ner repressor of bacteriophage Mu. *FEBS Lett* **244**, 369-375.
146. **Kurnasov, O. V., Polanuyev, B. M., Ananta, S., Sloutsky, R., Tam, A., Gerdes, S. Y. y Osterman, A. L. (2002).** Ribosylnicotinamide kinase domain of NadR protein: identification and implications in NAD biosynthesis. *J Bacteriol* **184**, 6906-6917.
147. **Lacal, J., Guazzaroni, M. E., Gutiérrez-del-Arroyo, P., Busch, A., Vélez, M., Krell, T. y Ramos, J. L. (2008).** Two levels of cooperativeness in the binding of TodT to the *tod* operon promoter. *J Mol Biol* **384**, 1037-1047.
148. **Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
149. **Laempe, D., Eisenreich, W., Bacher, A., Fuchs, G. (1998).** Cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-CoA hydratase [corrected], an enzyme involved in anaerobic metabolism of benzoyl-CoA in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* **255**, 618-27.

150. **Laempe, D., Jahn, M., Fuchs, G. (1999).** 6-Hydroxycyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA dehydrogenase and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, enzymes of the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* **263**, 420-9.
151. **Lamberg, K. E., Luther, C., Weber, K. D. y Kiley, P. J. (2002).** Characterization of activating region 3 from *Escherichia coli* FNR. *J Mol Biol* **315**, 275-283.
152. **Lamzin, V. S., Aleshin, A. E., Strokopytov, B. V., Yuhnevich, M. G., Popov, V. O., Harutyunyan, E. H. y Wilson, K. S. (1992).** Crystal structure of NAD-dependent formate dehydrogenase. *Eur J Biochem* **206**, 441-452.
153. **Lamzin, V. S., Dauter, Z., Popov, V. O., Harutyunyan, E. H. y Wilson, K. S. (1994).** High resolution structures of holo and apo formate dehydrogenase. *J Mol Biol* **236**, 759-785.
154. **Larimer, F. W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M. L., Pelletier, D. A., Beatty, J. T., Lang, A. S., Tabita, F. R., Gibson, J. L., Hanson, T. E., Bobst, C., Torres, J. L., Peres, C., Harrison, F. H., Gibson, J. y Harwood, C. S. (2004).** Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nat Biotechnol* **22**, 55-61.
155. **Larson, J. D., Jenkins, J. L., Schuermann, J. P., Zhou, Y., Becker, D. F. y Tanner, J. J. (2006).** Crystal structures of the DNA-binding domain of *Escherichia coli* proline utilization A flavoprotein and analysis of the role of Lys9 in DNA recognition. *Protein Sci* **15**, 2630-2641.
156. **Lau, P. C., Wang, Y., Patel, A., Labbé, D., Bergeron, H., Brousseau, R., Konishi, Y. y Rawlings, M. (1997).** A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1453-1458.
157. **Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M. and Pelletier, S. L. (1992).** *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*. Cambridge, UK. Royal Society of Chemistry.
158. **Lazazzera, B. A., Bates, D. M. y Kiley, P. J. (1993).** The activity of the *Escherichia coli* transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state. *Genes Dev* **7**, 1993-2005.
159. **Lee, Y. H., Nadaraia, S., Gu, D., Becker, D. F. y Tanner, J. J. (2003).** Structure of the proline dehydrogenase domain of the multifunctional PutA flavoprotein. *Nat Struct Biol* **10**, 109-114.
160. **LeFevre, K. R. y Cordes, M. H. (2003).** Retroevolution of λ Cro toward a stable monomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2345-2350.

161. **Leslie, A. G. (1990).** Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* **213**, 167-186.
162. **Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Hörth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schägger, H., Heider, J. (1998).** Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol Microbiol* **28**, 615-28.
163. **Lin, B., Van Verseveld, H. W. y Roling, W. F. (2002).** Microbial aspects of anaerobic BTEX degradation. *Biomed Environ Sci* **15**, 130-144.
164. **Ling, M., Allen, S. W. y Wood, J. M. (1994).** Sequence analysis identifies the proline dehydrogenase and delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase domains of the multifunctional *Escherichia coli* PutA protein. *J Mol Biol* **243**, 950-956.
165. **Lobner-Olesen, A. y Marinus, M. G. (1992).** Identification of the gene (*aroK*) encoding shikimic acid kinase I of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 525-529.
166. **Lohr, D. y López, J. (1995).** GAL4/GAL80-dependent nucleosome disruption/deposition on the upstream regions of the yeast GAL1-10 and GAL80 genes. *J Biol Chem* **270**, 27671-27678.
167. **Lonetto, M. A., Rhodius, V., Lamberg, K., Kiley, P., Busby, S. y Gross, C. (1998).** Identification of a contact site for different transcription activators in region 4 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit. *J Mol Biol* **284**, 1353-1365.
168. **Longo, F., Marchetti, M. A., Castagnoli, L., Battaglia, P. A. y Gigliani, F. (1995).** A novel approach to protein-protein interaction: complex formation between the p53 tumor suppressor and the HIV Tat proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **206**, 326-334.
169. **López Barragán, M. J., Carmona, M., Zamarro, M. T., Thiele, B., Boll, M., Fuchs, G., García, J. L. y Díaz, E. (2004a).** The *bzd* gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. *J Bacteriol* **186**, 5762-5774.
170. **López Barragán, M. J., Díaz, E., García, J. L. y Carmona, M. (2004b).** Genetic clues on the evolution of anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Microbiology* **150**, 2018-2021.
171. **Lovley, D. R. (2001).** Bioremediation. Anaerobes to the rescue. *Science* **293**, 1444-1446.
172. **Lovley, D. R. (2003).** Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Microbiol* **1**, 35-44.

173. **Ludtke, S. J., Baldwin, P. R. y Chiu, W. (1999).** EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* **128**, 82-97.
174. **Maddocks, S. E. y Oyston, P. C. (2008).** Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**, 3609-3623.
175. **Mandic-Mulec, I., Doukhan, L. y Smith, I. (1995).** The *Bacillus subtilis* SinR protein is a repressor of the key sporulation gene *spo0A*. *J Bacteriol* **177**, 4619-4627.
176. **Marqués, S., Aranda-Olmedo, I. y Ramos, J. L. (2006).** Controlling bacterial physiology for optimal expression of gene reporter constructs. *Curr Opin Biotech* **17**, 50-56.
177. **Marschall, C., Labrousse, V., Kreimer, M., Weichart, D., Kolb, A. y Hengge-Aronis, R. (1998).** Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on σ^S and requires activation by cAMP-CRP. *J Mol Biol* **276**, 339-353.
178. **Martín, A. C., López, R. y García, P. (1995).** Nucleotide sequence and transcription of the left early region of *Streptococcus pneumoniae* Cp-1 coding for the terminal protein and the DNA polymerase. *Virology* **211**, 21-32.
179. **Martin, R. G. y Rosner, J. L. (1995).** Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5456-5460.
180. **Matsunaga, T., Okamura, Y., Fukuda, Y., Wahyudi, A. T., Murase, Y. y Takeyama, H. (2005).** Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *DNA Res* **12**, 157-166.
181. **Matsuo, H., Shirakawa, M. y Kyogoku, Y. (1995).** Three-dimensional dimer structure of the λ -Cro repressor in solution as determined by heteronuclear multidimensional NMR. *J Mol Biol* **254**, 668-680.
182. **Mattison, K., Oropeza, R. y Kenney, L. J. (2002).** The linker region plays an important role in the interdomain communication of the response regulator OmpR. *J Biol Chem* **277**, 32714-32721.
183. **Maxam, A. M. y Gilbert, W. (1980).** Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* **65**, 499-560.
184. **Mazoch, J. y Kucera, I. (2002).** Control of gene expression by FNR-like proteins in facultatively anaerobic bacteria. *Folia Microbiol (Praha)* **47**, 95-103.

185. **McInerney, M. J., Rohlin, L., Mouttaki, H., Kim, U., Krupp, R. S., Ríos-Hernández, L., Sieber, J., Struchtemeyer, C. G., Bhattacharyya, A., Campbell, J. W. y Gunsalus, R. P. (2007).** The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7600-7605.
186. **McLeod, M. P. y Eltis, L. D. (2008).** Genomic Insights Into the Aerobic Pathways for Degradation of Organic Pollutants. In *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology*, pp. 1-23. E. Díaz. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
187. **McPherson, A. (1982).** *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. New York: Elsevier Inc.
188. **Mechichi, T., Stackebrandt, E., Gad'on, N. y Fuchs, G. (2002).** Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromaticasp.* nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Arch Microbiol* **178**, 26-35.
189. **Menzel, R. y Roth, J. (1981).** Enzymatic properties of the purified PutA protein from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **256**, 9762-9766.
190. **Metcalf, W. W. y Wanner, B. L. (1993).** Mutational analysis of an *Escherichia coli* fourteen-gene operon for phosphonate degradation, using TnphoA' elements. *J Bacteriol* **175**, 3430-3442.
191. **Meyer, B. J., Kleid, D. G. y Ptashne, M. (1975).** λ repressor turns off transcription of its own gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4785-4789.
192. **Millar, G., Lewendon, A., Hunter, M. G. y Coggins, J. R. (1986).** The cloning and expression of the *aroL* gene from *Escherichia coli* K12. Purification and complete amino acid sequence of shikimate kinase II, the *aroL*-gene product. *Biochem J* **237**, 427-437.
193. **Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbord Laboratory, Cold Sprin Harbor, NY*.
194. **Mindell, J. A. y Grigorieff, N. (2003).** Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J Struct Biol* **142**, 334-347.
195. **Mohamed, M. E., Fuchs, G. (1993).** Purification and characterization of phenylacetate-coenzyme A ligase from a denitrifying *Pseudomonas* sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of phenylacetate. *Arch Microbiol* **159**, 554-562.
196. **Mondragon, A., Subbiah, S., Almo, S. C., Drottar, M. y Harrison, S. C. (1989a).** Structure of the amino-terminal domain of phage 434 repressor at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **205**, 189-200.

197. **Mondragon, A., Wolberger, C. y Harrison, S. C. (1989b).** Structure of phage 434 Cro protein at 2.35 Å resolution. *J Mol Biol* **205**, 179-188.
198. **Morales, G., Linares, J. F., Beloso, A., Albar, J. P., Martínez, J. L. y Rojo, F. (2004).** The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J Bacteriol* **186**, 1337-1344.
199. **Morales, G., Ugidos, A. y Rojo, F. (2006).** Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome *o* ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and *cbb3-1* terminal oxidases. *Environ Microbiol* **8**, 1764-1774.
200. **Morasch, B., Schink, B., Tebbe, C. C. y Meckenstock, R. U. (2004).** Degradation of *o*-xylene and *m*-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Arch Microbiol* **181**, 407-417.
201. **Moreno-Ruiz, E., Hernáez, M. J., Martínez-Pérez, O. y Santero, E. (2003).** Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogolitabida* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. *J Bacteriol* **185**, 2026-2030.
202. **Moreno, R. y Rojo, F. (2008).** The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *J Bacteriol* **190**, 1539-1545.
203. **Muller, C., Petruschka, L., Cuypers, H., Burchhardt, G. y Herrmann, H. (1996).** Carbon catabolite repression of phenol degradation in *Pseudomonas putida* is mediated by the inhibition of the activator protein PhlR. *J Bacteriol* **178**, 2030-2036.
204. **Mushegian, A. (1999).** The Purloined Letter: bacterial orthologs of archaeal NMN adenylyltransferase are domains within multifunctional transcription regulator NadR. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 127-128.
205. **Newlove, T., Konieczka, J. H. y Cordes, M. H. (2004).** Secondary structure switching in Cro protein evolution. *Structure* **12**, 569-581.
206. **Ohlendorf, D. H., Tronrud, D. E. y Matthews, B. W. (1998).** Refined structure of Cro repressor protein from bacteriophage λ suggests both flexibility and plasticity. *J Mol Biol* **280**, 129-136.
207. **Ohno, S. (1990).** Grammatical analysis of DNA sequences provides a rationale for the regulatory control of an entire chromosome. *Genet Res* **56**, 115-120.
208. **Ohtsubo, Y., Goto, H., Nagata, Y., Kudo, T. y Tsuda, M. (2006).** Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading β -proteobacteria, *Acidovorax* sp. KKS102. *Mol Microbiol* **60**, 1563-1575.

209. **Oliveira, J. S., Pinto, C. A., Basso, L. A. y Santos, D. S. (2001).** Cloning and overexpression in soluble form of functional shikimate kinase and 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif* **22**, 430-435.
210. **Pabo, C. O., Sauer, R. T., Sturtevant, J. M. y Ptashne, M. (1979).** The λ repressor contains two domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1608-1612.
211. **Pabo, C. O. y Lewis, M. (1982).** The operator-binding domain of λ repressor: structure and DNA recognition. *Nature* **298**, 443-447.
212. **Pan, C., Oda, Y., Lankford, P. K., Zhang, B., Samatova, N. F., Pelletier, D. A., Harwood, C. S., Hettich, R. L. (2008).** Characterization of anaerobic catabolism of *p*-coumarate in *Rhodopseudomonas palustris* by integrating transcriptomics and quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* **7**, 938-48.
213. **Parales, R. E. a. S. M. R. (2006).** *Aromatic ring hydroxylating dioxygenases*. The Netherlands: Springer.
214. **Pelletier, D. A., Harwood, C. S. (1998).** 2-Ketocyclohexanecarboxyl coenzyme A hydrolase, the ring cleavage enzyme required for anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* **180**, 2330-6.
215. **Pelletier, D. A., Harwood, C. S. (2000).** 2-Hydroxycyclohexanecarboxyl coenzyme A dehydrogenase, an enzyme characteristic of the anaerobic benzoate degradation pathway used by *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* **182**, 2753-60.
216. **Penfound, T. y Foster, J. W. (1999).** NAD-dependent DNA-binding activity of the bifunctional NadR regulator of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**, 648-655.
217. **Peres, C. M. y Harwood, C. S. (2006).** BadM is a transcriptional repressor and one of three regulators that control benzoyl coenzyme A reductase gene expression in *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* **188**, 8662-8665.
218. **Peters, F., Rother, M. y Boll, M. (2004).** Selenocysteine-containing proteins in anaerobic benzoate metabolism of *Desulfococcus multivorans*. *J Bacteriol* **186**, 2156-2163.
219. **Peters, F., Shinoda, Y., McInerney, M. J. y Boll, M. (2007).** Cyclohexa-1,5-diene-1-carboxyl-coenzyme A (CoA) hydratases of *Geobacter metallireducens* and *Syntrophus aciditrophicus*: Evidence for a common benzoyl-CoA degradation pathway in facultative and strict anaerobes. *J Bacteriol* **189**, 1055-1060.
220. **Petruschka, L., Burchhardt, G., Müller, C., Weihe, C. y Herrmann, H. (2001).** The *cyo* operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation. *Mol Genet Genomics* **266**, 199-206.

221. **Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. y Ferrin, T. E. (2004).** UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612.
222. **Pflüger, K. y de Lorenzo, V. (2008).** Evidence of *in vivo* cross talk between the nitrogen-related and fructose-related branches of the carbohydrate phosphotransferase system of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **190**, 3374-3380.
223. **Pieper, D. H. y Reineke, W. (2000).** Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotech* **11**, 262-270.
224. **Pittard, J. (1987).** Biosynthesis of the aromatic amino acids. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology, pp. 368-394. Edited by J. L. I. Frederick C Neidhardt, Brooks K Low, Boris Magasanik, Moselio Schaechter, Edwin Umbarger. Washington DC: American Society for Microbiology.
225. **Popov, V. O., Rodionov Ku, V., Egorov, A. M. y Berezin, I. V. (1978).** The role of histidine residues of formate dehydrogenase from *Bacterium* sp. 1. *Biokhimiia* **43**, 1212-1221.
226. **Prieto, M. A., Galán, B., Torres, B., Ferrández, A., Fernández, C., Miñambres, B., García, J. L. y Díaz, E. (2004).** Aromatic metabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism of less-preferred carbon sources in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 503-518.
227. **Provencher, S. W. y Glockner, J. (1981).** Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**, 33-37.
228. **Ptashne, M. y Hopkins, N. (1968).** The operators controlled by the λ phage repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **60**, 1282-1287.
229. **Ptashne, M., Backman, K., Humayun, M. Z., Jeffrey, A., Maurer, R., Meyer, B. y Sauer, R. T. (1976).** Autoregulation and function of a repressor in bacteriophage λ . *Science* **194**, 156-161.
230. **Quail, M. A., Dempsey, C. E. y Guest, J. R. (1994).** Identification of a fatty acyl responsive regulator (FarR) in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **356**, 183-187.
231. **Rabus, R. (2005).** Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 580-587.
232. **Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F. y Reinhardt, R. (2005).** The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* **183**, 27-36.
233. **Raffaelli, N., Lorenzi, T., Mariani, P. L., Emanuelli, M., Amici, A., Ruggieri, S. y Magni, G. (1999).** The *Escherichia coli* NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity. *J Bacteriol* **181**, 5509-5511.

234. **Ramos, J. L., Marqués, S. y Timmis, K. N. (1997).** Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu Rev Microbiol* **51**, 341 - 373.
235. **Reichardt, L. F. (1975a).** Control of bacteriophage λ repressor synthesis: regulation of the maintenance pathway of the cro and cI products. *J Mol Biol* **93**, 289-309.
236. **Reichardt, L. F. (1975b).** Control of bacteriophage λ repressor synthesis after phage infection: the role of the N, cII, cIII and cro products. *J Mol Biol* **93**, 267-288.
237. **Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Claeysens, M. y van Montagu, M. (1993).** Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. *J Bacteriol* **175**, 7056-7065.
238. **Rhodijs, V. A. y Busby, S. J. (1998).** Positive activation of gene expression. *Curr Opin Microbiol* **1**, 152-159.
239. **Ridley, R. G. (1998).** Planting new targets for antiparasitic drugs. *Nat Med* **4**, 894-895.
240. **Roberts, J. W., Roberts, C. W. y Craig, N. L. (1978).** *Escherichia coli* *recA* gene product inactivates phage λ repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 4714-4718.
241. **Roberts, T. M., Shimatake, H., Brady, C. y Rosenberg, M. (1977).** Sequence of *cro* gene of bacteriophage λ . *Nature* **270**, 274-275.
242. **Rojo, F. y Dinamarca, M. A. (2004).** Catabolite repression and physiological control. In *Pseudomonas, vol 2 Virulence and gene regulation*, pp. 365-387. Edited by J. L. Ramos. New York, NY: Kluwer Academic Press.
243. **Romanowski, M. J. y Burley, S. K. (2002).** Crystal structure of the *Escherichia coli* shikimate kinase I (AroK) that confers sensitivity to mecillinam. *Proteins* **47**, 558-562.
244. **Russell, A. D. y Hopwood, D. (1976).** The biological uses and importance of glutaraldehyde. *Prog Med Chem* **13**, 271-301.
245. **Sambrook, J. y Rusell, D. W. (2001).** Molecular cloning: A laboratory manual. Volume 1-3. *Joseph Sambrook and David W Russell 3rd Edition New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
246. **Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.

247. **Saraste, M., Sibbald, P. R. y Wittinghofer, A. (1990).** The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**, 430-434.
248. **Sasse-Dwight, S. y Gralla, J. D. (1989).** KMnO₄ as a probe for *lac* promoter DNA melting and mechanism in vivo. *J Biol Chem* **264**, 8074-8081.
249. **Sauer, R. T., Yocum, R. R., Doolittle, R. F., Lewis, M. y Pabo, C. O. (1982).** Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. *Nature* **298**, 447-451.
250. **Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. y Pühler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.
251. **Schell, M. A. (1993).** Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**, 597-626.
252. **Schink, B., Philipp, B. y Muller, J. (2000).** Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften* **87**, 12-23.
253. **Schock, F. y Dahl, M. K. (1996).** Analysis of DNA flanking the *treA* gene of *Bacillus subtilis* reveals genes encoding a putative specific enzyme IITre and a potential regulator of the trehalose operon. *Gene* **175**, 59-63.
254. **Schuck, P. y Rossmanith, P. (2000).** Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers* **54**, 328-341.
255. **Schuck, P., Perugini, M. A., Gonzales, N. R., Howlett, G. J. y Schubert, D. (2002).** Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys J* **82**, 1096-1111.
256. **Schuhle, K., Gescher, J., Feil, U., Paul, M., Jahn, M., Schagger, H. y Fuchs, G. (2003).** Benzoate-coenzyme A ligase from *Thauera aromatica*: an enzyme acting in anaerobic and aerobic pathways. *J Bacteriol* **185**, 4920-4929.
257. **Schuhle, K. y Fuchs, G. (2004).** Phenylphosphate carboxylase: a new C-C lyase involved in anaerobic phenol metabolism in *Thauera aromatica*. *J Bacteriol* **186**, 4556-4567.
258. **Schujman, G. E., Guerin, M., Buschiazzi, A., Schaeffer, F., Llarrull, L. I., Reh, G., Vila, A. J., Alzari, P. M. y de Mendoza, D. (2006).** Structural basis of lipid biosynthesis regulation in Gram-positive bacteria. *EMBO J* **25**, 4074-4083.
259. **Shingler, V. (2003).** Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environ Microbiol* **5**, 1226-1241.

260. **Shinoda, Y., Sakai, Y., Uenishi, H., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H. y Kato, N. (2004).** Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1385-1392.
261. **Shinoda, Y., Akagi, J., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H., Sakai, Y. y Kato, N. (2005).** Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 1483-1491.
262. **Smith, D. B. y Johnson, K. S. (1988).** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
263. **Song, B., Haggblom, M. M., Zhou, J., Tiedje, J. M. y Palleroni, N. J. (1999).** Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 1129-1140.
264. **Sougakoff, W. y Jarlier, V. (2000).** Comparative potency of mecillinam and other β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing different β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* **46**, 9-14.
265. **Spiro, S. y Guest, J. R. (1988).** Inactivation of the FNR protein of *Escherichia coli* by targeted mutagenesis in the N-terminal region. *Mol Microbiol* **2**, 701-707.
266. **Spiro, S. y Guest, J. R. (1990).** FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**, 399-428.
267. **Spormann, A. M. y Widdel, F. (2000).** Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**, 85-105.
268. **Springer, N., Ludwig, W., Philipp, B. y Schink, B. (1998).** *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 953-956.
269. **Sreerama, N. y Woody, R. W. (2000).** Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**, 252-260.
270. **Stayrook, S., Jaru-Ampornpan, P., Ni, J., Hochschild, A. y Lewis, M. (2008).** Crystal structure of the λ repressor and a model for pairwise cooperative operator binding. *Nature* **452**, 1022-1025.
271. **Strzelecka, T. E., Clore, G. M. y Gronenborn, A. M. (1995).** The solution structure of the Mu Ner protein reveals a helix-turn-helix DNA recognition motif. *Structure* **3**, 1087-1095.

272. **Suh, S. J., Runyen-Janecky, L. J., Maleniak, T. C., Hager, P., MacGregor, C. H., Zielinski-Mozny, N. A., Phibbs, P. V. Jr. y West, S. E. (2002).** Effect of *vfr* mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **148**, 1561-1569.
273. **Surber, M. W. y Maloy, S. (1998).** The PutA protein of *Salmonella typhimurium* catalyzes the two steps of proline degradation via a leaky channel. *Arch Biochem Biophys* **354**, 281-287.
274. **Swank, R. T. y Munkres, K. D. (1971).** Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* **39**, 462-477.
275. **Tagami, H. y Aiba, H. (1998).** A common role of CRP in transcription activation: CRP acts transiently to stimulate events leading to open complex formation at a diverse set of promoters. *EMBO J* **17**, 1759-1767.
276. **Teodorescu, O., Galor, T., Pillardy, J. y Elber, R. (2004).** Enriching the sequence substitution matrix by structural information. *Proteins* **54**, 41-48.
277. **Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* **22**, 4673-4680.
278. **Tishkov, V. I., Galkin, A. G. y Egorov, A. M. (1991).** NAD-dependent formate dehydrogenase of methylotrophic bacteria *Pseudomonas* sp. 101: cloning, expression, and study of the genetic structure. *Dokl Akad Nauk SSSR* **317**, 745-748.
279. **Tropel, D. y van der Meer, J. R. (2004).** Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 474-500.
280. **Unden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Holighaus, G., Schirawski, J. y Six, S. (1995).** O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch Microbiol* **164**, 81-90.
281. **Unden, G., Achebach, S., Holighaus, G., Tran, H. G., Wackwitz, B., Zeuner, Y. (2002).** Control of FNR function of *Escherichia coli* by O₂ and reducing conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 263-8.
282. **Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T. y Eltis, L. D. (2006).** The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**, 241-267.
283. **Velasco, A., Alonso, S., García, J. L., Perera, J. y Díaz, E. (1998).** Genetic and Functional Analysis of the Styrene Catabolic Cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *J Bacteriol* **180**, 1063-1071.

284. VerBerkmoes, N. C., Shah, M. B., Lankford, P. K., Pelletier, D. A., Strader, M. B., Tabb, D. L., McDonald, W. H., Barton, J. W., Hurst, G. B., Hauser, L., Davison, B. H., Beatty, J. T., Harwood, C. S., Tabita, F. R., Hettich, R. L. y Larimer, F. W. (2006). Determination and comparison of the baseline proteomes of the versatile microbe *Rhodospseudomonas palustris* under its major metabolic states. *J Proteome Res* **5**, 287-298.
285. Verrijzer, C. P., Yokomori, K., Chen, J. L. y Tjian, R. (1994). *Drosophila* TAFII150: similarity to yeast gene *TSM-1* and specific binding to core promoter DNA. *Science* **264**, 933-941.
286. Verrijzer, C. P., Chen, J. L., Yokomori, K. y Tjian, R. (1995). Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell* **81**, 1115-1125.
287. Vinella, D., Gagny, B., Joseleau-Petit, D., D'Ari, R. y Cashel, M. (1996). Mecillinam resistance in *Escherichia coli* is conferred by loss of a second activity of the AroK protein. *J Bacteriol* **178**, 3818-3828.
288. Vinod, M. P., Bellur, P. y Becker, D. F. (2002). Electrochemical and functional characterization of the proline dehydrogenase domain of the PutA flavoprotein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **41**, 6525-6532.
289. Vogels, G. D. y Van der Drift, C. (1976). Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriol Rev* **40**, 403-468.
290. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. y Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**, 945-951.
291. Weber, K. D., Vincent, O. D. y Kiley, P. J. (2005). Additional determinants within *Escherichia coli* FNR activating region 1 and RNA polymerase α subunit required for transcription activation. *J Bacteriol* **187**, 1724-1731.
292. Weickert, M. J. y Adhya, S. (1992). A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J Biol Chem* **267**, 15869-15874.
293. Weiss, M. A., Karplus, M., Patel, D. J. y Sauer, R. T. (1983). Solution NMR studies of intact λ repressor. *J Biomol Struct Dyn* **1**, 151-157.
294. Weiss, M. A., Pabo, C. O., Karplus, M. y Sauer, R. T. (1987). Dimerization of the operator binding domain of phage λ repressor. *Biochemistry* **26**, 897-904.
295. West, D., Williams, R., Rhodius, V., Bell, A., Sharma, N., Zou, C., Fujita, N., Ishihama, A. y Busby, S. (1993). Interactions between the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein and RNA polymerase at class II promoters. *Mol Microbiol* **10**, 789-797.

-
296. **Whipp, M. J. y Pittard, A. J. (1995).** A reassessment of the relationship between *aroK*- and *aroL*-encoded shikimate kinase enzymes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 1627-1629.
297. **Wilbur, W. J. y Lipman, D. J. (1983).** Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 726-730.
298. **Wilson, K. (1997).** *Current Protocols in Molecular Biology*. Ed. Frederick M. Ausubel. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
299. **Williams, S. M., Savery, N. J., Busby, S. J. y Wing, H. J. (1997).** Transcription activation at class I FNR-dependent promoters: identification of the activating surface of FNR and the corresponding contact site in the C-terminal domain of the RNA polymerase α subunit. *Nucleic Acids Res* **25**, 4028-4034.
300. **Wing, H. J., Green, J., Guest, J. R. y Busby, S. J. (2000).** Role of activating region 1 of *Escherichia coli* FNR protein in transcription activation at class II promoters. *J Biol Chem* **275**, 29061-29065.
301. **Wirth, R., Friesenegger, A. y Fiedler, S. (1989).** Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet* **216**, 175-177.
302. **Wischgoll, S., Heintz, D., Peters, F., Erxleben, A., Sarnighausen, E., Reski, R., Van Dorsselaer, A. y Boll, M. (2005).** Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. *Mol Microbiol* **58**, 1238-1252.
303. **Wischgoll, S., Taubert, M., Peters, F., Jehmlich, N., von Bergen, M. y Boll, M. (2009).** Decarboxylating and non-decarboxylating glutaryl-CoA dehydrogenases in the aromatic metabolism of obligately anaerobic bacteria. *J Bacteriol*.
304. **Wohlbrand, L., Kallerhoff, B., Lange, D., Hufnagel, P., Thiermann, J., Reinhardt, R. y Rabus, R. (2007).** Functional proteomic view of metabolic regulation in "*Aromatoleum aromaticum*" strain EbN1. *Proteomics* **7**, 2222-2239.
305. **Wootton, J. C. y Drummond, M. H. (1989).** The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. *Protein Eng* **2**, 535-543.
306. **Yamamoto, I., Takamatsu, K., Ohshima, Y., Ujiye, T. y Satoh, T. (1999).** Site-directed mutagenesis of the response regulator DmsR for the *dmsCBA* operon expression in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*: An essential residue of proline-130 in the linker. *Biochim Biophys Acta* **1447**, 57-63.

307. **Yano, K. y Fukasawa, T. (1997).** Galactose-dependent reversible interaction of Gal3p with Gal80p in the induction pathway of Gal4p-activated genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1721-1726.
308. **Zenke, F. T., Engles, R., Vollenbroich, V., Meyer, J., Hollenberg, C. P. y Breunig, K. D. (1996).** Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science* **272**, 1662-1665.
309. **Zhang, M., White, T. A., Schuermann, J. P., Baban, B. A., Becker, D. F. y Tanner, J. J. (2004).** Structures of the *Escherichia coli* PutA proline dehydrogenase domain in complex with competitive inhibitors. *Biochemistry* **43**, 12539-12548.
310. **Zhou, J., Fries, M. R., Chee-Sanford, J. C. y Tiedje, J. M. (1995).** Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth of toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 500-506.
311. **Zhu, W. y Becker, D. F. (2003).** Flavin redox state triggers conformational changes in the PutA protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **42**, 5469-5477.
312. **Ziegelhoffer, E. C. y Kiley, P. J. (1995).** In vitro analysis of a constitutively active mutant form of the *Escherichia coli* global transcription factor FNR. *J Mol Biol* **245**, 351-361.
313. **Ziegler, K., Buder, R., Winter, J., y Fuchs, G. (1989).** Activation of aromatic acids and aerobic 2-aminobenzoate metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Arch Microbiol*, 171-176.