

Departamento de Microbiología R. 5.874

Facultad de Biología

Universidad de Sevilla

TJ  
353



## Estructura del operón de la nitrito-nitrato reductasa (*nasAB*) y transporte de nitrato en *Azotobacter vinelandii*

Memoria para optar al grado de **Doctor en Biología**, presenta y firma el licenciado:

H.A.C.

DPTO. MICROBIOLOGIA  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
16-V-97

4-VI-97

5 JUNIO 1997

Hassane Abdellatifi

DPTO. MICROBIOLOGIA Sevilla, 1997

Directora:

Dra María Tortolero García  
Profesora Titular de Biología

2

19

13 MAYO 1997



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

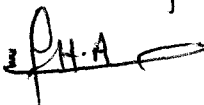
FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

TD. 373

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral ESTRUCTURA DEL OPERON DE LA NITRITO-NITRATO REDUCTASA (NIRAB) Y TRANSPORTE DE NITRATO EN AZOTOBACTER vinelandii sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- + Consulta en depósito.
- + Préstamo interbibliotecario.
- + Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Abdelstifi Hassane

Firmado: 

Sevilla, a 21 de Octubre de 1997

A la memoria de mi padre  
A mi madre  
A mi familia

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, que dirige el catedrático Antonio Torres Rueda, a quien agradezco el haberme acogido en su Departamento.

A Maria Tortolero, directora de esta tesis, le agradezco el darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo, así como su constante dedicación e aportación de sugerencias e ideas.

También deseo expresar mis agradecimientos a todos los miembros del grupo de investigación de *Azotobacter vinelandii*, Gonzalo, Paco y Juan carlos por haberme "dibujado" el camino de esta tesis, a Ludwig por su amistad, su interés por la discusión de los resultados y realización de los experimentos.

A los miembros del L2, Rosa, la maestra y Carlos por su ayuda en realizar algunos experimentos en su laboratorio.

A Charo, Ramón, Javier y Antonio Baena por su simpatía y cordialidad de que he sido objeto en todo momento.

A mis amigos Jose mari, er Nani y Ahmed por el buen ambiente del que he podido disfrutar.

A las tres hermosas, Corin, Pilar y Nuria por su amistad y alegría que más de una vez, me han hecho olvidar los problemas.

A Iréne y Habibi por su apoyo y cariño inestimables.

A todos los miembros de los departamentos de genética y bioquímica que me han ofrecido ayuda cada vez que la he necesitado, especialmente a María de la Cruz por abrirme los ojos al "mundo del transporte de nitrato" y darme los cultivos de *Azotobacter chroococcum*.

A todos los miembros del departamento por facilitarme la entrada al "agradable jardín del castellano" y por su generosa ayuda en numerosas frases de esta tesis.

A mis padres adoptivos Helena y Pepe por su amor y cariño con que me han tratado a lo largo de mi estancia en Sevilla.

A mi M.A.H.A.M, amigos de toda la vida.

A toda mi familia, hermanos y hermanas, y en especial a mi hermano mayor que ha sido un verdadero padre para mi.

A mi Helenita por su gran corazón, su comprensión y su ayuda más allá de los límites.

Por último a mi madre que, la palabra gracias queda muchísimo por debajo de lo que quisiera decirle.

## **INDICE**







2. 7. Análisis de proteínas .....	53
2. 7. 1. Preparación de extractos para electroforesis .....	53
2. 7. 2. Precipitación de las proteínas del sobrenadante .....	53
2. 7. 3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes .....	53
2. 7. 4. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante tinción.....	53
2. 8. Métodos genéticos y de biología molecular.....	55
2. 8. 1. Mutagénesis dirigida.....	55
2. 8. 2. Preparación de células competentes y transformación de <i>E.</i> <i>coli</i> y <i>A. vinelandii</i> .....	55
2. 8. 2. 1. <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	55
2. 8. 2. 2. <i>Escherichia coli</i> .....	55
2. 8. 3. Preparación de células electrocompetentes y electroporación de <i>E. coli</i> .....	56
2. 8. 4. Aislamiento de ADN.....	57
2. 8. 4. 1. Aislamiento de ADN plasmídico.....	57
2. 8. 4. 2. Aislamiento de ADN cromosómico de <i>A.</i> <i>vinelandii</i> .....	58
2. 8. 4. 2. 1. Aislamiento de ADN purificado.....	58
2. 8. 4. 2. 2. Aislamiento de ADN cromosómico para transformación .....	58
2. 8. 5. Restricción de ADN .....	59
2. 8. 6. Desfosforilación de los extremos 5' del ADN .....	59
2. 8. 7. Relleno de extremos cohesivos .....	59
2. 8. 8. Tratamiento del extremo 3' colgante .....	59
2. 8. 9. Ligamiento de ADN .....	59
2. 8. 10. Electroforesis de ADN en gel de agarosa .....	60
2. 8. 11. Purificación de fragmentos de restricción mediante la técnica de "geneclean" .....	61
2. 8. 12. Análisis de ADN mediante hibridación .....	61
2. 8. 12. 1. Transferencia de ADN a filtros de nailon .....	61
2. 8. 12. 2. Marcaje de la sonda .....	61
2. 8. 12. 3. Hibridación de ADN con sondas marcadas con	

digoxigenina-dUTP .....	62
2. 8. 13. Secuenciación de ADN .....	62
2. 8. 13. 1. Construcción de plásmidos conteniendo deleciones seriadas de fragmentos de ADN a secuenciar .....	62
2. 8. 13. 2. Aislamiento de ADN y secuenciación.....	63
2. 8. 14. Comparación de secuencias de aminoácidos .....	63

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

3. 1. ESTRUCTURA DEL OPERON <i>nasAB</i> .....	67
3. 1. 1. Secuenciación de la región <i>nasAB</i> .....	67
3. 1. 2. Análisis de la proteína NASA .....	76
3. 1. 3. Análisis de la proteína NASB .....	81
3. 1. 4. Análisis de la cuarta ORF .....	85
3. 2. Función del gen <i>nasH</i> de <i>A. vinelandii</i> .....	89
3. 3. Mutagénesis dirigida en el gen <i>nasB</i> : Cambio de las cisteínas por alanina.....	92
3. 4. Discusión.....	98
3. 5. Caracterización del transporte de nitrato en <i>A. vinelandii</i> .....	106
3. 5. 1. Consumo de nitrato en <i>A. vinelandii</i> .....	106
3. 5. 2. Consumo de nitrato en las estirpes UW136 de <i>A.</i> <i>vinelandii</i> y ATCC4412 de <i>A. chroococcum</i> .....	108
3. 5. 3. Efecto del lavado sobre el consumo de nitrato en <i>A.</i> <i>vinelandii</i> .....	109
3. 5. 4. Efecto del sobrenadante sobre el consumo de nitrato en <i>A.</i> <i>vinelandii</i> .....	110
3. 5. 5. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el consumo de nitrato en <i>A. vinelandii</i> .....	112
3. 5. 5. 1. Consumo de nitrato en la estirpe UW136 cultivada en distintas fuentes de nitrógeno.....	112
3. 5. 5. 2. Consumo de nitrato en la estirpe AS270 cultivada	

en distintas fuentes de nitrógeno.....	114
3. 5. 5. 3. Efecto inhibitor del amonio sobre el transporte de nitrato en <i>A. vinelandii</i> .....	116
3. 5. 6. El papel del operón <i>nasST</i> de <i>A. vinelandii</i> en el transporte de nitrato.....	117
3. 5. 6. 1. El papel del gen <i>nasS</i> en el transporte de nitrato....	117
3. 5. 6. 2. Efecto de la mutación en <i>nasT</i> sobre el transporte de nitrato <i>A. vinelandii</i> .....	118
3. 5. 7. Efecto de las mutaciones en <i>ntrA</i> y en <i>ntrC</i> sobre el transporte de nitrato en <i>A. vinelandii</i> .....	119
3. 5. 8. Consumo de nitrato en los mutantes AS433 y AS513.....	121
3. 5. 9. Efecto del choque osmótico sobre el transporte de nitrato en <i>A. vinelandii</i> .....	123
3. 5. 10. Efecto del DCCD sobre el consumo de nitrato en <i>A. vinelandii</i> .....	124
3. 5. 11. Efecto del producto extracelular implicado en el transporte de nitrato en <i>A. vinelandii</i> sobre el consumo de nitrato en la bacteria <i>A. chroococcum</i> sometida a choque osmótico.....	125
3. 5. 12. Papel de los genes <i>nasT</i> y <i>ntrC</i> en la síntesis de los componentes del sistema de transporte en <i>A. vinelandii</i> ..	127
3. 5. 13. Precipitación del producto extracelular implicado en el transporte de nitrato en <i>A. vinelandii</i> .....	129
<b>4. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>134</b>
<b>5. ABREVIATURAS .....</b>	<b>164</b>

## **1. INTRODUCCION**

## 1. 1. AZOTOBACTER: UN PROTOTIPO DE FIJADOR DE NITROGENO

El nitrógeno, tras el carbono, el hidrógeno y el oxígeno, es el elemento más abundante de la materia viva. Constituye alrededor del 12% y forma parte de moléculas tan importantes como las proteínas y los ácidos nucleicos. Este elemento se puede encontrar en la Naturaleza en distintos estados de oxidación, desde la forma más oxidada como el nitrato, hasta la forma más reducida como el amonio, pasando por una forma neutra, el nitrógeno atmosférico,  $N_2$ . La conversión de unas formas redox en otras se realiza en distintos pasos organizados en un ciclo de gran importancia, el ciclo del nitrógeno. El gas nitrógeno,  $N_2$ , es, termodinámicamente, la forma más estable del nitrógeno, lo que explica el hecho de que, en contraste con el carbono, el mayor reservorio de la Tierra sea la atmósfera. Esto hace que la capacidad para utilizar el  $N_2$  sea de gran importancia ecológica, ya que el aporte de nitrógeno combinado suele ser un factor limitante de la productividad en muchos ecosistemas.

La reducción de  $N_2$  puede ocurrir de tres maneras distintas. En primer lugar, las descargas eléctricas de las tormentas, las radiaciones ultravioletas, los rayos cósmicos o la fricción de los meteoritos con la atmósfera pueden proporcionar la energía requerida para producir óxidos de nitrógeno e incluso amoniaco a partir de nitrógeno atmosférico. En segundo lugar, el  $N_2$  del aire puede ser reducido químicamente hasta amoniaco con hidrógeno gaseoso por el procedimiento de Haber-Bosch. En tercer lugar, puede ser reducido por algunos microorganismos hasta amonio, mediante un proceso que se denomina "fijación biológica del nitrógeno", gracias a la acción de un complejo enzimático, la nitrogenasa.

Ni las plantas, ni ningún otro eucariota, son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. Sólo algunos procariotas, que reciben el nombre de diazotrofos o fijadores de nitrógeno pueden hacerlo. Estos microorganismos se encuentran en diversos grupos taxonómicos. En las familias *Azotobacteraceae*, *Cyanobacteraceae*, *Enterobacteraceae* y *Rhizobiaceae* se encuentran los miembros más significativos.

La familia *Azotobacteraceae* agrupa bacterias Gram negativas, quimioheterótrofas, aerobias estrictas y capaces por sí solas, de fijar nitrógeno atmosférico. Comprende dos géneros: *Azotobacter*, capaz de formar quistes y

con un contenido en el ADN de G+C del 65%, y *Azomonas*, que no forma quistes y cuyo contenido en G+C es del 55% (Tchan, 1984). Los miembros de estos géneros son frecuentes en aguas y suelos neutros o alcalinos de regiones templadas, aunque pueden encontrarse en la rizosfera como ocurre en la asociación *Azotobacter paspali* y la gramínea tropical *Paspalum notatum* (Barea *et al.*, 1974).

El género *Azotobacter* fue descrito por Beijerinck (1901) y en la actualidad incluye seis especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. armeniacus* y *A. paspali*. Algunas características comunes son: morfologías celulares que van desde oval a bacilar, diámetro celular de unos 2  $\mu\text{m}$ , no producen endosporas pero sí quistes de resistencia a drogas, desecación, sonicación, luz ultravioleta y radiaciones g. La formación de quistes ha sido muy estudiada. Es un fenómeno que se produce ante condiciones ambientales adversas y en el laboratorio puede inducirse pasando el cultivo de un medio con glucosa a uno con  $\beta$ -hidroxibutirato como única fuente de carbono (Lin y Sadoff, 1968). Las proteínas específicas del enquistamiento se producen a expensas de proteínas no esenciales (Ruppen *et al.*, 1983), en un proceso secuencial (Su *et al.*, 1987).

*Azotobacter* contiene más ADN por célula que la mayoría de las bacterias, sin embargo, el tamaño de su cromosoma es típico de los procariotas. Experimentos de renaturalización y de digestión de ADN con restrictasas indican que el tamaño del cromosoma es de unas 2000 kb, es decir, la mitad del cromosoma de *E. coli* (Robson *et al.*, 1984). El número de cromosomas por célula durante la fase exponencial de crecimiento se estimó entre 40-80 para *A. vinelandii* (Sadoff *et al.*, 1979; Nagpal *et al.*, 1989) y 20-40 para *A. chroococcum* (Robson *et al.*, 1984). Se desconoce la razón por la que poseen esta alta cantidad de ADN pero se cree que puede estar relacionada con el gran tamaño de las células de *Azotobacter*, 10 veces superior al de otras bacterias. No obstante, cuando el estudio de la poliploidía de *Azotobacter* se abordó mediante el análisis de la segregación de los heterocigotos, los resultados fueron difíciles de compaginar con el supuesto elevado grado de ploidía. Maldonado *et al.* (1992) comprobaron que los heterocigotos no eran tan comunes y estables como se podía pensar, y concluyeron que *Azotobacter vinelandii* es una bacteria haploide o mederadamente poliploide. Investigaciones recientes de los mismos autores (Maldonado *et al.*, 1994) aclararon esta contradicción, mediante citometría de flujo, se ha comprobado

que el número de cromosomas de *A. vinelandii* varía desde unos pocos a más de 80, dependiendo del medio de cultivo y de la fase de crecimiento. En medio mínimo y en fase exponencial el número de cromosomas es bajo y aumenta espectacularmente cuando se cultiva en medio rico y alcanza la fase exponencial tardía.

Las bacterias del género *Azotobacter* son aerobias estrictas, quimioorganotrofas, su pH óptimo es de 7.0 a 7.5 y su temperatura óptima de crecimiento ronda los 32°C. Son fijadoras no simbióticas de nitrógeno, característica que comparten con géneros como *Klebsiella* y *Clostridium*, si bien sólo los géneros *Azomonas*, *Derrxia* y *Beijerinckia*, junto con *Azotobacter*, lo hacen en aerobiosis (Tchan, 1984). Una característica peculiar del género *Azotobacter* es que fija nitrógeno a tensiones atmosféricas de oxígeno, para lo que ha desarrollado dos sistemas que le permiten proteger a la nitrogenasa de la inactivación irreversible por oxígeno. Por un lado, cuando está fijando N<sub>2</sub> tiene una tasa de respiración muy alta, que le permite eliminar rápidamente el oxígeno, lo que se conoce como "protección respiratoria" (Robson y Postgate, 1980). Asociada a la protección respiratoria, se encuentra la formación de membranas intracitoplásmicas que aumentan la actividad respiratoria. Cuando esta protección no es suficiente, la nitrogenasa forma un complejo con una proteína que contiene 2Fe-2S, llamada Fe/S I o proteína de Shethna. Esta proteína protege los puntos del enzima sensibles a la oxidación (Shethna, 1970; Yates, 1977; Robson, 1979; Sherings *et al.*, 1983; Maier y Moshiri, 1992; Moshiri *et al.*, 1992), dando lugar a una nitrogenasa inactiva, pero evitando su degradación. Esta situación es reversible y normalmente transitoria puesto que la tasa de respiración aumenta paralelamente al incremento de oxígeno.

Del género *Azotobacter*, la especie más conocida desde el punto de vista genético es *Azotobacter vinelandii*, descrita por Lipman en 1903. Sus células son móviles por flagelos peritricos, producen gran cantidad de polisacárido extracelular y excretan un pigmento fluorescente amarillo verdoso en medios deficientes en hierro. Es capaz de usar gran variedad de fuentes de carbono. Puede utilizar nitrógeno molecular, sales de amonio, nitrato, nitrito, urea y algunos aminoácidos como única fuente de nitrógeno. Posee una resistencia natural a ciertos agentes antimicrobianos como el cloranfenicol (25 µg/ml) o el ácido nalidíxico (40 µg/ml).

*A. vinelandii* está especialmente adaptado a crecer a expensas del N<sub>2</sub> atmosférico. Además de la nitrogenasa convencional (nitrogenasa 1) que contiene un cofactor de Fe y Mo, FeMo-co, tiene otras dos nitrogenasas alternativas (Bishop *et al.*, 1980; Bishop *et al.*, 1986). Una de ellas contiene vanadio en el cofactor en lugar de molibdeno (nitrogenasa 2), y se expresa en ausencia de Mo y presencia de vanadio (Hales *et al.*, 1986). La tercera nitrogenasa (nitrogenasa 3) tiene un cofactor que no contiene ni Mo ni V (Chisnell *et al.*, 1988) y se expresa en ausencia de estos metales (Pau *et al.*, 1989).

Diversas especies del género *Azotobacter* producen una serie de sustancias de interés biotecnológico: alginatos (Horan *et al.*, 1983), poli-b-hidroxibutirato (Reusch *et al.*, 1983), pigmentos y hormonas vegetales (González-Lopez *et al.*, 1986). La utilidad de este género como fertilizante se ha discutido ampliamente y parece haber dado resultados positivos en algunos tipos de cultivos. Según los estudios realizados en la URSS y otros países del este de Europa produce aumentos del rendimiento en diversos cultivos, especialmente en la patata (Rubenchick, 1960). También en determinados suelos de Egipto (Hegazi *et al.*, 1974), y de la India (Karunakar y Rajgopalan, 1936) se ha descrito un incremento muy notable del rendimiento de cultivos de caña de azúcar, maíz, sorgo, el tomate y otros, tras la inoculación con *Azotobacter*. Sin embargo, en otros países como Suiza, Francia, Dinamarca, Finlandia y EE.UU, no ha tenido incidencia en los cultivos (Hamdi, 1985). En general, se cree que los fijadores libres de nitrógeno como *Azotobacter* contribuyen poco a la entrada de nitrógeno en la biosfera e incluso las observaciones de estimulación del crecimiento en plantas, como las mencionadas, se deben más a la producción de determinados factores de crecimiento como las giberelinas, citoquininas y ácido indolacético que al aporte de nitrógeno fijado (Vancura, 1961; Postgate, 1982; González-López *et al.*, 1986; Taller y Wong, 1989). No obstante, los estudios realizados con cultivos mezclados de *A. vinelandii* y *Rhodobacter capsulatus* indican que *A. vinelandii* es capaz de proporcionar una fuente de nitrógeno orgánico para el crecimiento de *R. capsulatus* (Oelze, 1991).



## 1. 2. METABOLISMO DEL NITRATO

El nitrato es la forma de nitrógeno inorgánico más abundante en los suelos y es asimilado tanto por plantas, algas y hongos como por numerosos microorganismos. En microorganismos no vacuolados, se pueden distinguir tres etapas fundamentales en la asimilación del nitrato: (i) entrada del ión al interior celular, (ii) reducción hasta amonio por la acción secuencial de las reductasas del nitrato y del nitrito y (iii) incorporación del amonio a esqueletos carbonados. En organismos vacuolados, como las plantas superiores y muchos microorganismos eucarióticos, también hay que tener en cuenta los procesos de entrada y salida del anión de la vacuola (Marigo *et al.*, 1989).

### 1. 2. 1. Transporte de nitrato al interior celular

Esta es quizás la etapa de asimilación del nitrato de la que se sabe menos, debido fundamentalmente a la dificultad técnica para estudiar este proceso aisladamente y diferenciarlo de la rápida reducción del anión una vez que se encuentra en el interior celular. Por esta razón la mayor parte de las investigaciones se han llevado a cabo observando la desaparición de nitrato del medio extracelular (consumo), lo cual no permite, en principio, separar el transporte de las etapas posteriores de reducción. No obstante en los últimos años se han desarrollado métodos que permiten determinar la concentración intracelular de este anión y, mediante la utilización de mutantes, estudiar el proceso de transporte independientemente de la reducción (Lara *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1992).

En casi todos los organismos estudiados, el transporte de nitrato se reprime en presencia de amonio, a excepción de *Neurospora crassa* (Schloemer y Garret, 1974a), en la cual el catión no reprime el sistema de transporte, aunque sí lo hacen los aminoácidos. En algunos casos, como las plantas superiores (Goyal y Huffaker, 1986; McClure *et al.*, 1986), los hongos ascomicetos (Goldsmith *et al.*, 1973; Schloemer y Garret, 1974a), algunas cianobacterias (Zevenboom y Mur, 1981) y varias especies de bacterias (Betlach *et al.*, 1981; Jackson *et al.*, 1981; Thayer y Huffaker, 1982; Revilla *et al.*, 1985; Muñoz-Centeno *et al.*, 1993), es necesaria la presencia de nitrato como inductor, además de la ausencia de amonio, aunque puede actuar como inductor el nitrito o, en ciertos casos, el clorato y el cianato.

Otra característica general de los sistemas de transporte de nitrato es que dependen de energía metabólica, es decir, son transportes activos (Rao y Rains, 1976; Florencio y Vega, 1983; Schloemer y Garret, 1984a; Ali y Hipkin, 1985; Revilla *et al.*, 1986). En algunos organismos como las plantas superiores, *Arabidopsis thaliana*, (Doddena y Telkamp, 1979), *Triticum aestivum* (Goyal y Huffaker, 1986) y *Hordeum vulgare* (Ibarlucea *et al.*, 1981), el alga *Cyanidium caldarium* (Fuggi, 1985 y 1989) y bacterias como *Klebsiella pneumoniae* (Thayer y Huffaker, 1982), se ha propuesto la existencia de dos componentes en el sistema de transporte de nitrato, uno de alta afinidad, con  $K_m$  del orden de  $\mu\text{M}$ , y otro de baja afinidad, con  $K_m$  del orden de  $\text{mM}$ . El componente de baja afinidad se considera como difusión pasiva a través de la membrana plasmática y se postula que pueda tener un papel en la regulación de la concentración intracelular de nitrato, ya que funciona en ambos sentidos (Fuggi, 1989).

El transporte de nitrato en *A. chroococcum* es un proceso activo. El consumo del anión sigue una cinética hiperbólica respecto a la concentración del sustrato. Se estimó una  $K_m$  para la utilización de nitrato inferior a  $42 \mu\text{M}$ , menor que la  $K_m$  de la nitrato reductasa ( $250 \mu\text{M}$ ), lo que implica la existencia de un mecanismo adicional a la reducción y de mayor afinidad (Revilla, 1983). La existencia de un transporte activo de nitrato en esta bacteria se puso de manifiesto por su dependencia de energía metabólica, ya que se inhibe por agentes desacoplantes e inhibidores de ATPasas a concentraciones a las que no se inhibe el sistema reductor de nitrato (Revilla *et al.*, 1986a, Ruiz *et al.*, 1992), y también por la presencia de análogos estructurales del nitrato, como el nitrito y el cianato que inhiben el consumo de nitrato sin afectar al sistema de reducción de éste (Revilla *et al.*, 1985). Por último, y como prueba directa, el aislamiento de un mutante afectado específicamente en el transporte de nitrato, con un sistema reductor funcional *in vivo* e *in vitro*, demostró la participación de al menos un componente polipeptídico en dicho transporte, quedando así perfectamente delimitados los procesos de transporte activo y reducción de nitrato (Ruiz *et al.*, 1990).

En otros organismos se han identificado proteínas de la membrana plasmática, implicadas en el transporte de nitrato, así como los genes que las codifican. Este es el caso de la proteína de 47 kDa en la cianobacteria *Synechococcus* (Madueño *et al.*, 1988; Sivak *et al.*, 1989). El gen *nrtA* que la codifica fue posteriormente clonado, caracterizado y mutagenizado (Omata *et*

*al.*, 1989; Omata, 1991). En el hongo *Aspergillus nidulans* se ha identificado el gen *crnA* cuyo producto es requerido para el transporte de nitrato (Johnstone *et al.*, 1990). El análisis de su secuencia predice como producto una proteína de 51 KDa que tiene los dominios hidrofóbicos típicos de las proteínas transmembranales implicadas en transporte (Unkles *et al.*, 1991). En *E. coli*, también se ha identificado el gen *narK* que codifica una proteína integral de membrana de 49 KDa, que en anaerobiosis, interviene en el transporte de nitrato, dicho ión se utiliza de forma no asimilatoria, como aceptor de electrones en la respiración anaerobia (Noji *et al.*, 1989).

Para analizar los resultados más recientes sobre el transporte del nitrato es conveniente resumir las características más relevantes de los dos sistemas de transporte activo de procariotas: (i) Sistemas de transporte resistentes a choque osmótico y (ii) Sistemas de transporte sensibles a choque osmótico. Esta clasificación se basa en la estructura y en los mecanismos de energización. Como consecuencia de dichas características estructurales, ambos tipos se comportan de una manera o de otra frente a tratamiento de choque osmótico, de ahí la nomenclatura utilizada (Ames, 1986)

Para abordar estos sistemas, es importante destacar la complejidad estructural de la superficie de las bacterias Gram negativas, donde se distinguen tres envueltas: (1) la membrana externa, fácilmente atravesada por numerosos solutos pequeños gracias a las porinas, proteínas capaces de formar canales, que a veces son específicos, (2) la capa rígida de peptidoglicano, completamente permeable, y (3) la membrana plasmática o membrana interna que constituye la verdadera barrera de permeabilidad. El espacio delimitado por las membranas externa e interna se denomina espacio periplásmico (Nikaido y Vaara, 1985).

### **(i) Sistemas de transporte resistentes a choque osmótico**

Estructuralmente están constituidos por una sola proteína integral de membrana, generalmente muy hidrófoba (Ames y Joshi, 1990). La actividad transportadora de estos sistemas se conserva completamente tras tratamientos de choque osmótico, en los cuales las células se someten a una plasmolisis en presencia de EDTA, que provoca una ligera rotura de la membrana externa, liberándose las proteínas periplásmicas (Neu y Heppel, 1965). El mantenimiento de la actividad de transporte en células sometidas a este

tratamiento, se debe a que dicha actividad está mediada únicamente por una proteína localizada en la membrana plasmática que no se afecta por el choque osmótico. Estos sistemas se caracterizan por obtener la energía necesaria del gradiente electroquímico (Kaback, 1983; Overath y Wright, 1983), por lo que son dependientes, de forma directa, de dicho gradiente, pero no de la hidrólisis de ATP. Son los típicos sistemas de cotransporte (simporte o antiporte) que se acoplan al gradiente de protones o de otro ión (Ames y Joshi, 1990).

Uno de los aspectos menos conocidos del transporte de nitrato en estos sistemas, es el mecanismo por el cual la permeasa transloca el anión al interior celular. En *Cyanidium caldarium* (Fuggi, 1985) se ha propuesto un cotransporte de dos protones por cada molécula de nitrato. El transportador, en el exterior de la membrana, capta secuencialmente una molécula de nitrato y dos protones, por este orden, y éste es el complejo que atraviesa la membrana liberándose el nitrato y los dos protones en el interior celular y volviendo el transportador descargado a la zona externa. En *Skeletonema costatum*, se ha postulado que es una ATP-asa unida a membrana y activada por nitrato la encargada de transportar dicho anión al interior celular (Falkowski, 1975)

#### **(ii) Sistemas de transporte sensibles a choque osmótico.**

Estos sistemas se denominan también sistemas periplásmicos o sistemas multicomponentes, y como indica su denominación, son estructuralmente complejos. Generalmente están constituidos por 2-4 proteínas de membrana (Kerppola *et al.*, 1991) y una proteína periplásmica que capta con gran afinidad el sustrato. Estos sistemas son sensibles a choque osmótico ya que dicho tratamiento provoca la pérdida de la proteína periplásmica y, por tanto, se pierde la actividad de transporte (Ames, 1988).

El sistema multicomponente mejor estudiado hasta el momento es el responsable del transporte de histidina en *Salmonella typhimurium* (Higgins *et al.*, 1982). Generalmente son tres las proteínas que constituyen el complejo de membrana, de las cuales, normalmente dos presentan dominios hidrofóbicos, capaces de atravesar la membrana, formando un heterodímero (Ames, 1985). En los casos en los que sólo está presente una proteína hidrofóbica se forma un homodímero. La tercera proteína del complejo de

membrana, suele presentar dominios hidrofílicos y carecer de las regiones típicas que atraviesan la membrana. En todos los sistemas periplásmicos conocidos, el componente hidrofílico pertenece a una familia de proteínas entre las que existe una gran homología, presentando un dominio de unión al ATP con dos secuencias consenso enormemente conservadas (Ames, 1986; Higgins *et al.*, 1986). Su composición es la misma, y no depende del sustrato que transporten (azúcares, péptidos, aminoácidos, iones o vitaminas), ya que se trata de sistemas conservados evolutivamente (Ames y Joshi, 1990).

Los sistemas sensibles a choque osmótico necesitan la hidrólisis de ATP para transportar el sustrato en cuestión (Berger 1973; Berger y Heppel, 1974), en la que está implicado el componente hidrófilo del complejo de membrana (Ames y Joshi, 1990). Los estudios hechos sobre estos sistemas de transporte, indican que el sustrato, en una primera etapa, se une a la proteína periplásmica formando probablemente el verdadero sustrato que podría ser reconocido por el complejo multiproteico de membrana (Prossnitz *et al.*, 1989). El complejo sustrato-proteína periplásmica alcanza una concentración muy elevada en el espacio periplásmico, lo que facilita las etapas posteriores del transporte.

El funcionamiento de estos sistemas periplásmicos no se conoce. Se han propuesto dos modelos para explicar la función de los distintos componentes durante el transporte. En el primero, el compuesto sustrato-proteína desencadena una serie de cambios conformacionales en el complejo de membrana, formándose canales que permitirían la entrada del sustrato al interior celular (Ames y Higgins, 1983). En el segundo, la unión de la proteína periplásmica al sustrato provoca una activación de los sitios específicos de unión de éste a los componentes de membrana y la interacción sucesiva a través de los distintos componentes permitiría la entrada del sustrato. Los estudios con mutantes afectados en el complejo de membrana del transportador de histidina en *S. typhimurium*, y en otros organismos, en los que se altera su especificidad, apuntan al segundo modelo como verdadero responsable del transporte (Higgins *et al.*, 1982).

Estudios recientes han mostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, la existencia de un contacto físico entre el componente periplásmico unido al sustrato y, al menos un componente de la membrana (Prossnitz *et al.*, 1988). Otro punto menos conocido aún, es el momento en el que se requiere la

hidrólisis de ATP, esta energetización podría ser necesaria para la activación de los sitios de unión y las posteriores interacciones sucesivas o bien como etapa final tras el transporte, para que la maquinaria recupere su estado inicial, susceptible de comenzar otro ciclo (Ames y Joshi, 1990).

El transporte de nitrato en determinados procariotas parece que se lleva a cabo mediante un sistema multicomponente. El caso mejor conocido es el de la cianobacteria *Synechococcus* PCC7942, donde los genes que determinan la síntesis de los distintos componentes del transporte, *nrtABCD*, están agrupados junto con los genes estructurales de las reductasas del nitrito y del nitrato, *nirA* y *nirB* respectivamente, en un operón, denominado operón *nir* (Suzuki *et al.*, 1993; Omata *et al.*, 1993; Omata, 1995).

El análisis de la secuencia de estos genes ha permitido deducir que el producto del gen *nrtA* (Omata *et al.*, 1993), se corresponde con la proteína previamente identificada en preparaciones de membranas de esta cianobacteria, de 48 KDa (Madueño *et al.*, 1988), 47 KDa (Sivak *et al.*, 1989) o 45 KDa (Omata *et al.*, 1989). El hecho de que esta proteína esté íntimamente unida a la membrana citoplásmica, presente en su extremo N-terminal una estructura similar a los péptidos señales implicados en el transporte de proteínas a la membrana (aminoácidos 1-25), sea una de las proteínas más abundantes de la membrana plasmática de células provenientes de nitrato (incluso en exceso sobre los demás componentes del sistema de transporte Omata y Ogawa, 1987; Omata *et al.*, 1989) y sea en su mayor parte hidrofílica, apunta a que la proteína NRTA sea la que capta con gran afinidad el nitrato del espacio periplásmico, aunque en lugar de permanecer soluble en dicho espacio conserva una pequeña zona de unión a la membrana (Omata *et al.*, 1993; Omata, 1995). El gen *nrtB* codifica una proteína de 279 aminoácidos, con gran homología con los componentes hidrofóbicos que típicamente atraviesan la membrana citoplásmica en los sistemas de transporte multicomponentes.

Por último, los genes *nrtC* y *nrtD* codifican dos proteínas de 659 y 274 aminoácidos, respectivamente. El extremo N-terminal de la proteína NRTC y la proteína NRTD presentan una secuencia típica de unión al ATP, característica fundamental en todos los sistemas de transporte periplásmicos ya que la energetización se lleva a cabo mediante hidrólisis de ATP.

En la enterobacteria *K. pneumoniae*, se han descrito una serie de genes, *nasF*, *nasE* y *nasD*, cuyos productos génicos tienen mucha homología de secuencia con las proteínas NRTA, NRTB y NRTD de *Synechococcus* sp. PCC7942, respectivamente, por lo que se ha sugerido que participan en el transporte de nitrato (Lin *et al.*, 1994). Los genes *nasFED* forman parte del operón *nasFEDCBA*, donde *nasC* codifica una proteína implicada en la transferencia de electrones desde el NADH a la nitrato reductasa, *nasA*, mientras que *nasB* es el gen estructural de la nitrito reductasa (Lin *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994).

También en la bacteria *A. chroococcum*, se ha propuesto un sistema periplásmico de transporte de nitrato basándose en una serie de observaciones. En primer lugar es sensible a choque osmótico, y dependiente de la hidrólisis de ATP. En segundo lugar, en preparaciones de membrana plasmática de la estirpe silvestre se observan tres polipéptidos de masas moleculares 52, 49 y 44 kDa muy abundantes en células provenientes de nitrato y ausentes, o presentes en baja cantidad, en las membranas de células cultivadas diazotroficamente o en presencia de amonio. Por último, la estirpe mutante TR1, afectada en el transporte de nitrato (Ruiz *et al.*, 1990) carece del polipéptido de membrana de 44 kDa (Muñoz M. C *et al.*, 1993), de lo que se deduce que estos polipéptidos están implicados en el transporte de nitrato en esta bacteria.

En el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, un organismo eucariota, también se ha propuesto la participación de más de un componente polipeptídico en el transporte de nitrato. Se han identificado tres genes que están implicados en el transporte activo de nitrato y/o nitrito, *nar2*, *nar3* y *nar4*, los cuales se localizan en una agrupación génica donde se encuentra el gen estructural de la nitrato reductasa, *nit-1* (Quesada *et al.*, 1993; Quesada *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 1989). Recientemente se ha cambiado la nomenclatura para seguir las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Biología Molecular de plantas, *Nia1* equivale a *nit-1*, *Nrt2;1* a *nar3* y *Nrt2;2* a *nar4* (Galván *et al.*, 1996)

Los mutantes afectados específicamente en el transporte de nitrato, con un sistema reductor del anión funcional, cuando se transforman simultáneamente con *nar2* y *nar3* o *nar2* y *nar4*, recuperan la actividad transportadora de nitrato y/o nitrito, pero no si la transformación se lleva a

cabo con cada uno de estos genes por separado, por lo que se ha sugerido la participación de al menos dos componentes polipeptídicos en dicho transporte, o sea NAR2 y NAR3 o NAR2 y NAR4 (Quesada *et al.*, 1994). Las proteínas NAR3 y NAR4 presentan una alta homología entre ellas y, a su vez, con la proteína CRNA del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* (Unkles *et al.*, 1991) que es una proteína implicada en el transporte de nitrato; en cambio no tienen homología con ninguna de las proteínas del sistema *nrt* de *Synechococcus* (Merchán *et al.*, 1995). Estas tres proteínas son muy hidrofóbicas y parece que tienen doce dominios de anclaje a membrana que podrían formar un canal para la entrada de nitrato (Unkles *et al.*, 1991; Quesada *et al.*, 1994).

Se ha propuesto que la proteína NAR2 podría tener un papel regulador de la función de las proteínas NAR3 y NAR4 constituyendo así dos sistemas alternativos de transporte de nitrato (Quesada *et al.*, 1994) : el sistema 1 (*nar2-nar3*), común para el nitrato y para el nitrito y el sistema 2 (*nar2-nar4*) específico para el nitrato, aunque con menor afinidad por el nitrato que el sistema 1. Por último se ha propuesto un tercer sistema de transporte específico para el nitrito, que no depende de la proteína NAR2 (Galván *et al.*, 1996).

En plantas superiores se ha identificado el gen *chl1* de *Arabidopsis thaliana*, cuya expresión se induce por nitrato y está implicado en el transporte del anión (Doddema *et al.*, 1979; Tsay *et al.*, 1993), aunque este gen no presenta homología con ninguno de los genes mencionados anteriormente.

### 1. 2. 2. Transporte de nitrito

El transporte de nitrito está aún menos estudiado que el transporte de nitrato. En algunos organismos, el transporte de nitrito presenta un sólo componente de alta afinidad, que depende de energía metabólica, como en *Neurospora crassa* (Schloemer y Garret, 1974b), *Rhodopseudomonas capsulata* (Caballero *et al.*, 1986) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Córdoba *et al.*, 1986). En concordancia con estas características, se propuso que ninguno de los genes implicados en el transporte de nitrato en *Chlamydomonas reinhardtii* eran esenciales para la asimilación de nitrito (Quesada *et al.*, 1993). Sin embargo estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de dos sistemas de



transporte activo de nitrito en este alga, el primero llamado sistema 1 que transporta tanto nitrato como nitrito al interior celular, y un segundo llamado sistema 3 que es específico para el nitrito aunque con menor afinidad para el anión que el sistema 1 (Galván *et al.*, 1996).

En otros organismos se han identificado dos componentes en el transporte de nitrito, uno de alta afinidad, que correspondería al transporte activo mediado por una(s) permeasa(s), y un componente de baja afinidad que consiste en difusión a través de la membrana en forma de ácido nitroso. Es el caso de *Phaeodactylum tricornutum* (Bilbao *et al.*, 1981), *Anabaena variabilis* (Martín-Nieto *et al.*, 1989), *Anacystis nidulans* (Flores *et al.*, 1987) y *A. chroococcum* (Ruiz *et al.*, 1992). El componente activo se ve inhibido por amonio del mismo modo que el componente activo del transporte de nitrato (excepto en *Neurospora crassa*, Schloemer y Garret, 1974b). En *A. chroococcum* (Revilla, 1986; Ruiz *et al.*, 1992) y *A. nidulans* (Flores *et al.*, 1987; Madueño *et al.*, 1987) se propuso que el nitrato y nitrito comparten el mismo transportador.

Aunque se ha publicado que los genes *nrtABCD* de *Synechococcus* PCC 7942 y *nasFED* de la enterobacteria *K. pneumoniae* son necesarios para el transporte de nitrato pero no para el transporte de nitrito (Omata *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994), estudios más recientes han demostrado que en la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942 el producto del gen *nrtD*, es necesario para el transporte activo de nitrito (Luque *et al.*, 1994).

### **1. 2. 3. Reducción asimilatoria de nitrato**

#### **1. 2. 3. 1. Reducción asimilatoria de nitrato en *Azotobacter***

La reducción asimilatoria de nitrato es un proceso biológico fundamental en el que el nitrato se reduce hasta amonio, el cual se incorpora a esqueletos carbonados. Este sistema de reducción implica a dos metaloproteínas: la nitrato reductasa, que cataliza la reducción de nitrato a nitrito en una reacción que requiere la transferencia de dos electrones, y la nitrito reductasa, que cataliza la reducción de nitrito a amonio con transferencia de seis electrones. Las dos enzimas requieren cofactores para su actividad, el cofactor de molibdeno (Mo-co) para la nitrato reductasa y un grupo sirohemo para la nitrito reductasa. El amonio producido se incorpora a

esqueletos carbonados vía glutamina sintetasa/glutamato sintetasa o glutamato deshidrogenasa.

Se han caracterizado las enzimas nitrato y nitrito reductasa tanto en *A. vinelandii* como en *A. chroococcum* (Guerrero *et al.*, 1973; Spencer *et al.*, 1957; Taniguchi y Ohmachi, 1960; Vega *et al.*, 1973).

La nitrato reductasa de *A. chroococcum* se ha caracterizado parcialmente (Guerrero *et al.*, 1973). Se trata de una proteína soluble de 100 kDa de peso molecular, con molibdeno como cofactor e incapaz de utilizar los piridines nucleótidos como donadores directos de electrones. Se ha conseguido la reducción *in vitro* de nitrato con la nitrato reductasa y ferredoxina de *A. chroococcum*, esta última reducida por cloroplastos iluminados ó por NADPH y NADP<sup>+</sup> reductasa de espinacas (Tortolero *et al.*, 1975). Las flavinas FMN y riboflavinas reducidas son capaces de donar electrones a la nitrato reductasa (Llobell *et al.*, 1980).

La nitrito reductasa de *A. chroococcum* es una metaloproteína de 67 kDa de masa molecular, contiene hierro y es una enzima muy inestable cuando se trata de purificar (Vega *et al.*, 1973), presenta una alta especificidad por NADH como donador de electrones, existiendo pruebas de la participación de metales y flavinas en el transporte de electrones desde el piridín nucleótido al nitrito.

En *A. vinelandii*, la mayor parte de actividad nitrato reductasa se encuentra asociada a grandes partículas (Taniguchi y Ohmachi, 1960). Se ha descrito que esta enzima puede utilizar el NADPH como donador de electrones, si bien el enzima solubilizado no acepta electrones de este donador sino de la ferredoxina o la flavodoxina (Bothe y Häger, 1981). La enzima purificada es un monómero que presenta un tamaño de 105 kDa e *in vitro* no utiliza NADH o NADPH como donadores de electrones (Gangeswaran *et al.*, 1993).

A partir de una genoteca de *A. vinelandii* se han aislado los genes estructurales de las reductasas del nitrato y del nitrito, *nasB* y *nasA*, respectivamente. El análisis de mutantes de inserción en *nasA* y *nasB* así como el estudio de fusiones transcripcionales del gen de la  $\beta$ -galactosidasa con *nasA* ha llevado a la conclusión de que estos genes forman un operón cuyo promotor está por delante de *nasA* (Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993). Se ha

secuenciado un fragmento de 328 pb del gen *nasA* y el polipéptido deducido de la secuencia de ADN mostró una alta homología con la proteína NIRB de *E. coli* que representa la nitrito reductasa dependiente de NADH. El análisis de esta homología mostró la existencia de una región rica en glicina fuertemente conservada y que corresponde a los lugares de unión de la enzima al NAD y al FAD (Peakman *et al.*, 1990).

En cuanto a la regulación, las dos enzimas del sistema de asimilación son inducibles por nitrato y nitrito y reprimibles por amonio. Los niveles máximos de expresión se alcanzan en medios sin amonio y con nitrato. Cuando ambas fuentes de nitrógeno están presentes en concentraciones equimolares los niveles de expresión son alrededor del 35-40% del nivel alcanzado en condiciones de máxima inducción. La fuente de carbono también influye en los niveles de expresión de ambas reductasas de *A. vinelandii*. La represión por amonio es más eficiente cuando la fuente de carbono es acetato o  $\alpha$ -cetoglutarato, que cuando es sacarosa. Se han obtenido mutantes en los que la represión por amonio no depende de la fuente de carbono (Luque *et al.*, 1987).

Para la expresión del operón de la nitrito-nitrato reductasa la célula necesita recibir e integrar dos señales, la deficiencia de amonio incorporado a esqueletos carbonados y la presencia de nitrato. En *A. vinelandii* la expresión está sometida a dos niveles de regulación: un nivel general, homólogo al sistema regulador general del metabolismo del nitrógeno, o sistema NTR, necesario para la desrepresión en ausencia de amonio (Toukdarian y Kennedy, 1986; Luque *et al.*, 1987), y un sistema específico, sistema *nasST*, necesario para la inducción por nitrato (Gutierrez, 1994; Gutierrez *et al.*, 1995). Se requiere, además, un factor sigma específico, homólogo del factor sigma-54 (NTRA) (Santero *et al.*, 1986).

La existencia de un sistema específico para la inducción por nitrato se puso de manifiesto tras la caracterización de un mutante que carecía de las dos actividades reductasas, aunque no estaba afectado en el sistema *ntn* (Luque, 1987). La mutación se localizó a 10 kb del operón *nasAB* (Ramos, 1992). Por lo que se pensó que podía tratarse de un mutante en un gen regulador de la expresión del operón *nasAB*, al que se denominó inicialmente *nasR* (Ramos, 1992). Los estudios más recientes demostraron la existencia de dos genes en esta región, el gen *nasS* y el gen *nasR* (Gutierrez, 1994), que se llamó

posteriormente *nasT* (Gutierrez *et al.*, 1995). Los genes *nasST*, se han clonado y secuenciado. Se trata de dos genes que se cotranscriben a partir de un promotor dependiente de sigma 70, formando así un operón cuya expresión se hace de forma constitutiva, es decir, no depende ni del sistema *ntr*, ni de la fuente de nitrógeno.

La proteína NASS mostró una alta homología con proteínas implicadas en el transporte de nitrato, como NASF de *K. pneumoniae* (Lin *et al.*, 1994), NRTA (Omata, 1991), y NRTC (Omata *et al.*, 1993) de *Synechococcus* sp. PCC7942. Aunque este dato hizo pensar que la proteína NASS estaba implicada en el transporte de nitrato, no fué el caso. El fenotipo de los mutantes en *nasS* sugiere que NASS es un regulador negativo que impide la expresión de *nasAB* en ausencia de nitrato (Gutierrez, 1994; Gutierrez *et al.*, 1995).

La proteína NAST presenta una elevada homología con las proteínas BAER de *E. coli* (Nagasawa *et al.*, no publicado), CHEB (Bischoff y Oradal, 1991) y ORFX17 (Sorokin *et al.*, 1993) de *B. subtilis*, que son proteínas reguladoras de los sistemas de dos componentes. Los mutantes afectados en el gen *nasT* carecen de actividades reductasas del nitrato y del nitrito, de lo que se deduce, que el gen *nasT* es un activador de la expresión del operón *nasAB* (Gutierrez, 1994; Gutierrez *et al.*, 1995).

Además de estos elementos reguladores, se requiere una nitrato reductasa activa o, al menos, unida a su cofactor, para que el circuito de inducción por nitrato del operón sea operativo. Los mutantes en el gen *nasB* o los mutantes en el cofactor de molibdeno expresan el operon *nasAB* independientemente de la presencia o no de nitrato en el medio aunque sigue reprimiéndose por amonio (Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993). La implicación de la nitrato reductasa en la autoregulación del sistema de asimilación de nitrato se ha descrito también en organismos eucarióticos como es el caso del producto del gen *niaD* de *Apergillus nidulans* (Cove, 1979).

Para complicar aún más el esquema de regulación del operón *nasAB*, aparentemente el Mo también interviene en dicha regulación. Se ha descrito recientemente que los mutantes que expresan constitutivamente el gen *nifO* son más sensibles a la represión por amonio que la cepa silvestre. El gen *nifO* forma parte del operón *nifBQ* implicado en la biosíntesis del cofactor de Fe y

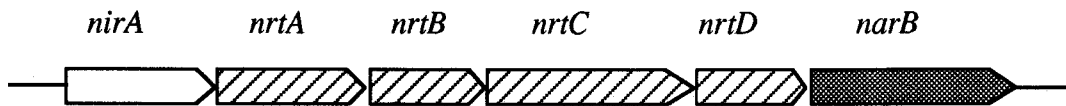
Mo de la nitrogenasa (Joerger and Bishop, 1988; Rodriguez-Quiñones *et al.*, 1993). No se conoce cual es la función de la proteína NIFO. Los estudios de comparación de secuencias no muestran homología con ningún otro gen *nif* aunque sí cierta homología con Arsc de *E. coli* (Rosen *et al.*, 1991) y DraY de *Rhodospirillum rubrum* (Roberts *et al.*, 1990). La mutación en *nifO* no afecta a ninguna de las nitrogenasas en condiciones de crecimiento diazotrófico pero parece ser necesario para la fijación de nitrógeno en presencia de nitrato (Rodriguez-Quiñones *et al.*, 1993). Aunque es todavía prematuro asignar una función a NIFO en la regulación del operón *nasAB*, los datos de los que se disponen permiten especular con la posibilidad de que NIFO intervenga en el metabolismo del Mo, participando en la formación de un intermediario inaccesible para el cofactor de molibdeno de la nitrato reductasa. Se ha propuesto que la síntesis constitutiva de NIFO titularía el Mo ocasionando que al menos una fracción de la nitrato reductasa carezca de Mo-co o contenga un Mo-co no funcional, dicha forma de nitrato reductasa provocaría una represión completa a concentraciones de amonio a las que sólo debería haber una represión parcial (Gutierrez *et al.*, 1997, en prensa). De hecho, una situación parecida se describió para la nitrato reductasa respiratoria de *E. coli*, donde el Mo-co actúa como correpresor del operón y la mutaciones en el gen *chlD* conducen a la síntesis de una nitrato reductasa sin cofactor que reprime la expresión del operón a menos que se añadan concentraciones elevadas de Mo (Pascal *et al.*, 1982; Pascal and Chippaux, 1982)

### 1. 2. 3. 2. Reducción asimilatoria de nitrato en otros procariotas

La bioquímica y la genética de la asimilación de nitrato se conoce con bastante detalle en las cianobacterias. La nitrato reductasa se encuentra asociada a las membranas tilacoidales tanto en cianobacterias unicelulares (Manzano *et al.*, 1976) como filamentosas (Hattori y Myers, 1967; Ortega *et al.*, 1976; Ida y Mikami, 1983) y es dependiente de ferredoxina. Se ha purificado y se ha calculado el peso molecular del enzima en *Synechococcus* sp. 6301 (Candau, 1979), *Plectonema boryanum* (Mikami e Ida, 1984) y *Anabaena variabilis* (Martín Nieto, 1991).

En cuanto a la nitrito reductasa, se encuentra asociada a membranas fotosintéticas en *Synechococcus* sp. (Manzano *et al.*, 1976) y parcialmente asociada en *Anabaena* sp. (Ortega *et al.*, 1976). No se conoce exactamente la naturaleza de su cofactor, aunque podría contener hierro (Yabuki *et al.*, 1985).

Se ha identificado una agrupación génica que codifica para todos los componentes de asimilación de nitrato en *Synechococcus* sp. PCC7942. Los genes *nrtABCD*, cuyos productos constituyen el sistema multicomponente de transporte de nitrato como se explicó anteriormente (Omata *et al.*, 1989; Omata, 1991; Luque *et al.*, 1992; Omata *et al.*, 1993); junto con los genes *nirA* (Luque *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1993) y *narB* (Andriessse *et al.*, 1990), genes estructurales de las reductasas del nitrito y del nitrato repectivamente, forman un operón (Suzuki *et al.*, 1993; Omata, 1995).



**Figura 1.** Región *nirA-narB* en *Synechococcus* PCC 7942 (Suzuki *et al.*, 1993; Omata, 1995)

En las cianobacterias la asimilación del nitrógeno está sujeta a un estricto control, de manera que cuando disponen de amonio no utilizan ninguna otra fuente alternativa de nitrógeno, como el nitrato, nitrito o el N<sub>2</sub>. El amonio también provoca una inhibición a corto plazo así como una represión del sistema de transporte del nitrato y nitrito (Flores *et al.*, 1980; Flores y Herrero, 1994). La represión por amonio no se debe al amonio "per se", sino a un producto resultante de su metabolización a glutamina, y más concretamente, según un trabajo reciente, al cianato resultante de la decomposición de la glutamina (Suzuki *et al.*, 1996). La regulación por amonio no depende de un sistema análogo al sistema NTR de otros procariontes sino que depende de un regulador positivo denominado NtcA (Vega-Palas *et al.*, 1990). La proteína NtcA pertenece a la familia Crp de activadores transcripcionales bacterianos y contiene en su extremo C-terminal un motivo hélice-vuelta-hélice de interacción con el ADN (Vega-Palas *et al.*, 1992). NtcA reconoce una secuencia específica de los promotores regulados por amonio, a la que se une, activando la síntesis de los mensajeros correspondientes, incluido el suyo propio, en ausencia de amonio (Luque *et al.*, 1994).

En cuanto al papel del nitrato, estaba descrito que las cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno requieren el nitrato como inductor (Hattori, 1962; Ohmori y Hattori, 1970, Herrero *et al.*, 1981; Flores *et al.*, 1983, Herrero *et al.*, 1985) mientras que en cianobacterias unicelulares de los

géneros *Synechococcus* y *Synechocystis* no (Stevens y van Baalen, 1974; Herrero *et al.*, 1981; Herrero y Guerrero, 1986; Luque *et al.*, 1994). No obstante, en un trabajo reciente se ha descrito que en ausencia de asimilación de amonio, tanto el nitrato como el nitrito aumentan aún más el nivel de transcripción de los operones de la asimilación de nitrato de *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Plectonema boryanum*, si bien el inductor parece ser el nitrito y no el nitrato puesto que en un mutante en el gen de la nitrato reductasa, el nitrato deja de ejercer su efecto inductor (Kikuchi *et al.*, 1996).

Los primeros trabajos sobre la genética de la asimilación de nitrato en bacterias se hicieron en *Pseudomonas aeruginosa*, comprobándose que tiene dos nitrato reductasas, una asimilatoria y otra disimilatoria que son genéticamente diferentes (Sias *et al.*, 1980). La obtención de mutantes afectados en la asimilación de nitrato permitió identificar los posibles genes estructurales de la nitrato reductasa, *nasC* y la nitrito reductasa, *nis* (Sias *et al.*, 1980). Sin embargo no se ha avanzado mucho más en la genética de la asimilación de nitrato en esta bacteria.

El sistema bacteriano mejor conocido, junto con el de *Azotobacter*, es el de *K. pneumoniae*. En *Klebsiella* el nitrato puede servir como aceptor de electrones para la respiración anaerobia, o como fuente de nitrógeno a través del proceso de asimilación. Al igual que en *P. aeruginosa*, los genes estructurales de la nitrato reductasa asimilatoria y disimilatoria son diferentes (Cali *et al.*, 1989; Bender y Friedrich, 1990). Los genes estructurales de las nitrato y nitrito reductasas asimilatorias *nasA* y *nasB*, respectivamente, han sido clonados y secuenciados (Lin *et al.*, 1993). Estos genes junto con los genes *nasFEDC* forman parte de un operón. Basándose en el fenotipo de los mutantes y en la secuencia de *nasC* se ha atribuido al producto de este gen un papel en la transferencia de electrones desde el NADH a la nitrato reductasa (Lin *et al.*, 1994). Las proteínas NASF, NASE y NASD presentan una gran homología con las proteínas NRTA, NRTB y NRTC de *Synechococcus* sp por lo que se piensa que están implicadas en el transporte de nitrato (Lin *et al.*, 1994)

El esquema de regulación de la asimilación de nitrato en *Klebsiella* spp., es el mismo que el descrito para *Azotobacter*, está sometida a un doble control, es decir, a represión por amonio (Van't Riet *et al.*, 1968) y a inducción por nitrato (Cali *et al.*, 1989; Bender *et al.*, 1990; Stewart *et al.*, 1990). La

expresión del sistema de asimilación de nitrato es dependiente directamente del sistema NTR (Cali *et al.*, 1989; Macaluso *et al.*, 1990), a diferencia de otros operones del metabolismo del nitrógeno también sujetos a regulación por NTR pero indirectamente a través de un intermediario, la proteína NAC. Se han identificado en el promotor del operón *nasFEDCBA* una secuencia de unión de sigma-54 así como dos presuntos sitios de unión de NTRC (Lin y Stewart, 1996).

La inducción por nitrato está mediada por un tercer gen, *nasR*, cuyo producto es un regulador positivo de la expresión del operón *nasFEDCBA*. El gen *nasR* que está localizado en un fragmento de 2 Kb por delante de *nasF* (Goldman *et al.*, 1994). La proteína NASR tiene un peso molecular de 44 KDa y su extremo C-terminal presenta homología con la proteína AmiR de *P. aeruginosa* que es un regulador positivo de la expresión del gen de la amidasa alifática, *amiE*. Se ha sugerido que la proteína AmiR actúa como un antiterminador de la transcripción (Drew y Lowe, 1989).

La función de NASR como antiterminador de la transcripción se ve apoyada por los estudios recientes que demuestran la presencia de una estructura por delante de *nasF* capaz de formar, en ausencia de nitrato, un lazo en el ARNm susceptible de actuar como un terminador de la transcripción independiente de Rho. Se ha sugerido que en presencia de nitrato o nitrito la proteína NASR se uniría a la estructura antiterminadora evitando la formación del lazo y permitiendo así la expresión del operón *nasFEDCBA* (Lin y Stewart, 1996).

La agrupación de los genes implicados en la asimilación de nitrato parece una característica bastante extendida entre los procariotas como se deduce de que también se da en bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*. En este caso se han identificado seis genes implicados en la asimilación de nitrato, *nasABCDEF*, donde *nasA*, está implicado en el transporte de nitrato, *nasD* y *nasE* codifican para las subunidades de la nitrito reductasa mientras que *nasF*, es necesario para la síntesis del sirohemo. La proteína NASB parece que está implicada en el transporte de electrones a la nitrito reductasa, NASC (Ogawa *et al.*, 1995).

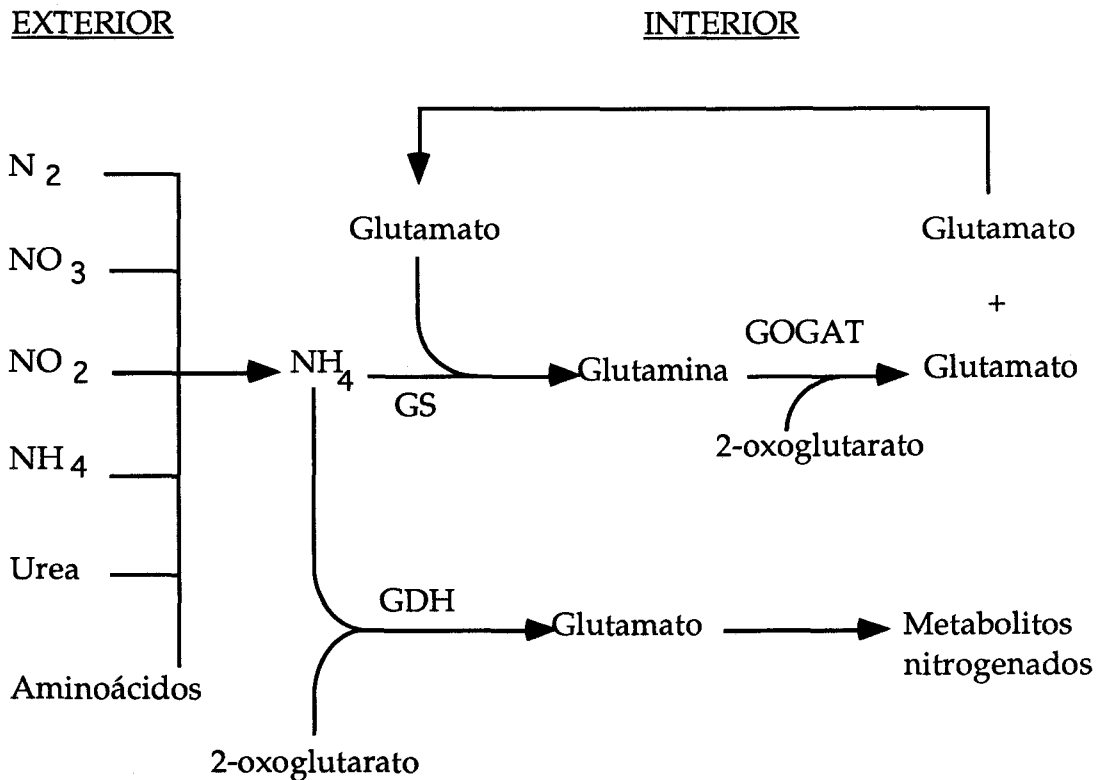


#### 1. 2. 4. Incorporación de amonio a esqueletos carbonados.

La asimilación del amonio generado en el interior celular como consecuencia de la asimilación de nitrato, fijación de nitrógeno o del propio metabolismo celular, así como el amonio transportado directamente del medio exterior, tiene lugar en *A. vinelandii* a través de la acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintetasa (GOGAT), las cuales constituyen la denominada ruta GS/GOGAT. A diferencia de lo que ocurre en otros organismos, donde existe más de una vía para la asimilación de amonio, en *A. vinelandii* (Kennedy y Toukdarian, 1987) y *A. chroococcum* (Bárcena, 1980) la ruta GS/GOGAT constituye la única vía de incorporación del amonio a esqueletos carbonados, ya que no se ha podido detectar actividad glutamato deshidrogenasa (GDH).

Otra vía de asimilación de amonio, que coexiste con la citada anteriormente en algunos organismos, es la catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH) que, en la mayoría de los casos, tendría un papel significativo sólo en presencia de altas concentraciones de amonio, salvo en el caso de los hongos donde es la ruta principal (Brown *et al.*, 1974).

La GDH cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato en glutamato mientras que la ruta de asimilación de amonio GS/GOGAT se lleva a cabo en dos etapas. En la primera, una molécula de glutamato reacciona con una de amonio dando una molécula de glutamina. Esta reacción está catalizada por la GS, enzima que ha sido muy estudiada por su papel clave en el metabolismo de nitrógeno. La GS es una enzima homomultimérica que en bacterias Gram negativas puede tener cada una de sus subunidades en forma adenilada (poco activa) o desadenilada (activa). La adenilación y desadenilación de la GS responde a la fuente de nitrógeno utilizada y es llevada a cabo por un sistema de varias enzimas. En la segunda etapa, que está catalizada por la GOGAT, se produce una transaminación desde la molécula de glutamina antes formada hasta una molécula de 2-oxoglutarato para dar como producto dos moléculas de glutamato, figura 2.



**Figura 2.** Vías de incorporación de amonio en bacterias

*E. coli* y *S. typhimurium* han sido los organismos modelos para el estudio del control genético de la producción de amonio y su posterior incorporación a esqueletos carbonados. En estas bacterias, el amonio reprime la síntesis de las enzimas que intervienen en diversas rutas de obtención de esta fuente de nitrógeno mediante un mecanismo común denominado: Sistema de Regulación General del Metabolismo del Nitrógeno o sistema NTR. En este sistema los productos de los genes *ntrA* (o *rpoN* o *glnF*), *ntrB* (*glnL*) y *ntrC* (*glnG*), controlan la activación de los promotores *ntr*; entre ellos la expresión del operón que contiene los reguladores específicos de los genes *nif*, *nifLA*, el segundo promotor del operón *glnAntrBC* o los promotores de los operones de la utilización de la histidina, prolina, arginina etc.

El producto del gen *ntrA* es un factor sigma para la ARN polimerasa llamado  $\sigma^{54}$ , diferente de  $\sigma^{70}$  convencional para los promotores de *E. coli* (Hirschman *et al.*, 1985). Se han encontrado varios promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  en otros sistemas: genes *xylABC*, *cpg2* y de la pilina en *Pseudomonas*, genes *fla* en *Caulobacter*, *dctA* en *Rhizobium*, *fdhF* en *E. coli* (Gussin *et al.*, 1986). Muchos de ellos no están controlados por nitrógeno y, por tanto, se

puede decir que el factor  $\sigma^{54}$  no está implicado exclusivamente en el metabolismo del nitrógeno.

Los genes *ntrB* y *ntrC* forman un operón junto al gen estructural de la glutamina sintetasa, *glnA*, sujeto él mismo a control NTR y que se transcribe en sentido *glnAntrBC*. Las proteínas NTRB y NTRC pertenecen a un sistema de proteínas que actúan por parejas, denominado sistema de dos componentes.

El término "dos componentes" hace alusión al esquema básico de estos sistemas, que constan de dos elementos denominados componente sensor y componente regulador de la respuesta. Como indica la denominación empleada, el sensor capta la información que es transmitida al elemento regulador que, directa o indirectamente, desencadena una respuesta que en la mayoría de los casos tiene lugar a nivel de expresión génica (Parkinson, 1993). La proteína NTRB es el sensor y NTRC es el regulador de la expresión génica de los distintos promotores sujetos a su control. NTRB fosforila o defosforila a NTRC en respuesta a la limitación o exceso de nitrógeno combinado, respectivamente. NTRB está modulada por la proteína P<sub>II</sub>, producto del gen *glnB*, y ésta a su vez, está controlada por la uridiltransferasa (UR/UT) producto del gen *glnD*. Cuando la concentración de amonio en el medio es baja, la relación intracelular acetoglutarato/glutamina es alta, y esto sirve de señal para que la P<sub>II</sub> sea uridilada. En esta situación NTRB fosforila a NTRC. NTRC fosforilado, junto a NTRA, es capaz de inducir la transcripción de los promotores sometidos a control NTR. Por otra parte, P<sub>II</sub>-UMP también activa la capacidad desadelinante de la adeniltransferasa que retira los grupos AMP de la GS pasando a su forma desadelinada activa (Keener *et al.*, 1987), ver figura 3.

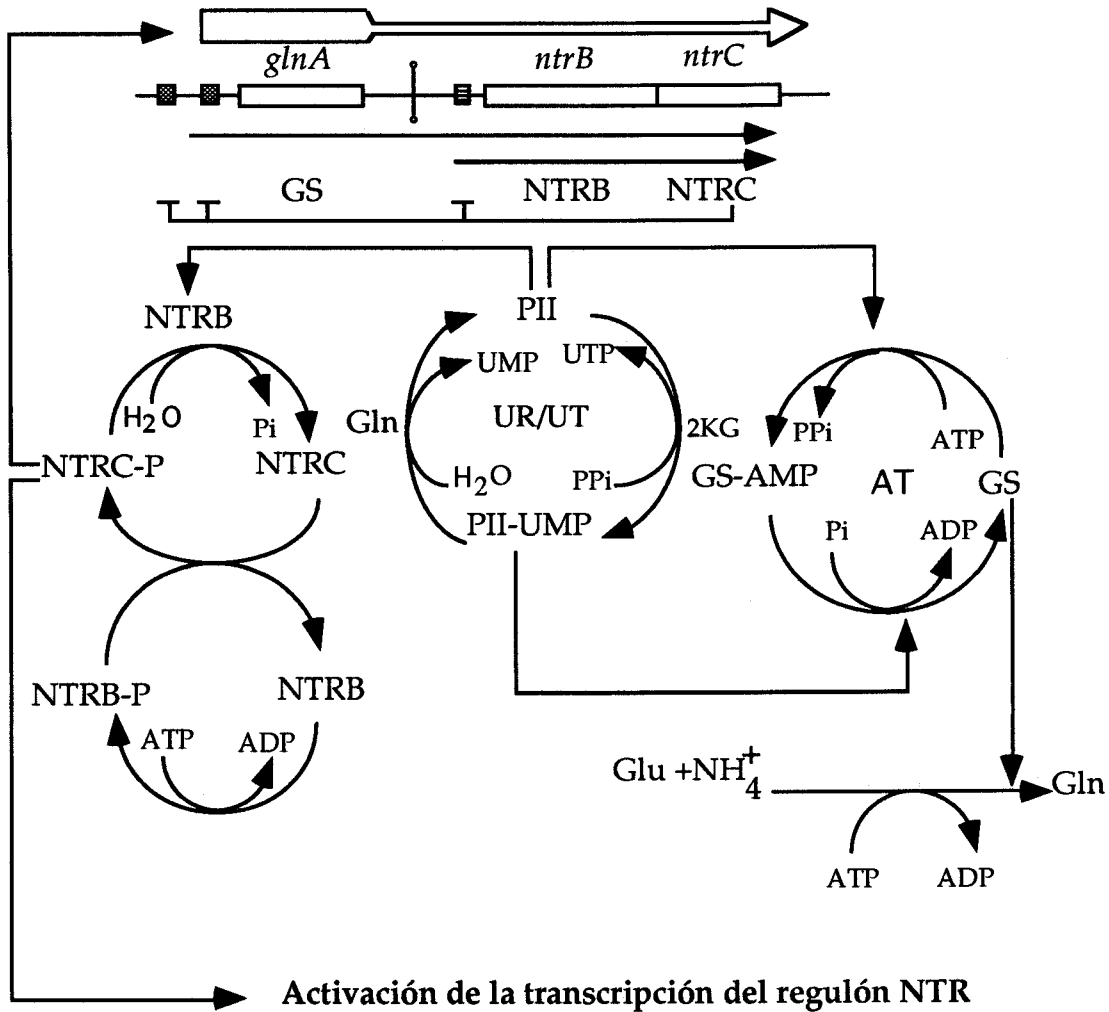


Figura 3. Modelo de regulación del sistema NTR en *E. coli* y *S. typhimurium*. (Stock *et al.*, 1989)

Cuando la relación  $\alpha$ -cetoglutarato/glutamina es baja, la uridiltransferasa retira los grupos UMP de la P<sub>II</sub>. En este momento la P<sub>II</sub> activa la capacidad adenilante de la adeniltransferasa, que añade grupos AMP a la GS pasando de una forma activa a una inactiva y por otra parte, la P<sub>II</sub> libre interacciona con NTRB que desfosforila a NTRC, dejando entonces de activar la transcripción de los promotores que controla (Keener *et al.*, 1987).

En *A. vinelandii* se han identificado genes homólogos, estructural y funcionalmente, a los descritos anteriormente en las enterobacterias. Los primeros en describirse fueron los pertenecientes al operón *glnAntrBC* (Toukdarian *et al.*, 1986; Toukdarian *et al.*, 1990) y el gen *ntrA* (Santero *et al.*,

1987). También se ha aislado un gen homólogo al de la uridilil transferasa, *glnD*, al que se le ha denominado *nfrX* (Santero *et al.*, 1988; Contreras *et al.*, 1991a). No obstante, a pesar de que los elementos reguladores de *Azotobacter* sean muy parecidos a los de las enterobacterias, el modo en que están montados difiere significativamente de éstas. La diferencia más importante es que el regulador general NTRC no lo es tanto, es decir, en *Azotobacter* NTRC no regula la fijación de nitrógeno ni la asimilación de amonio. El promotor de los genes *nifLA* depende de NTRA pero no de NTRC. En este caso la fijación de nitrógeno parece depender de NFRX que modifica, directa o indirectamente, al represor NIFL en función del estado de la célula respecto al nitrógeno. La expresión de los genes *glnAntrBC* en *Azotobacter* es independiente de la fuente de nitrógeno e independiente de NTRC, por lo que la regulación de la asimilación de amonio parece que se ejerce exclusivamente a nivel de actividad de la glutamina sintetasa, mediante adenilación-desadenilación, y no a nivel de expresión génica. En resumen, que las tres rutas del metabolismo del nitrógeno en *Azotobacter* mejor caracterizadas, la fijación de nitrógeno, la asimilación del nitrato y la asimilación de amonio no comparten ningún elemento regulador y que el único sistema bajo control NTR en *A. vinelandii*, hasta el momento, es el operón de la nitrito-nitrato reductasa, *nasAB*.

## OBJETIVOS

Como se ha descrito anteriormente, el análisis de mutantes y los estudios de expresión de fusiones transcripcionales del gen de la nitrito reductasa y el gen de la beta-galactosidasa pusieron de manifiesto:

- que los genes de la nitrito y nitrato reductasa, *nasA* y *nasB*, están organizados en un operón que cuyo promotor estaría localizado por delante de *nasA*.

- que, en ausencia de nitrato, *NASB* ejerce un efecto regulador negativo sobre la expresión de *nasAB*.

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido el análisis de la secuencia del operón *nasAB* seguido de la mutagénesis dirigida de *nasB* para tratar de disociar la función enzimática de la función reguladora de la nitrato reductasa. El segundo objetivo ha sido la caracterización del transporte de nitrato en esta bacteria, poniendo especial atención en su regulación.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

## 2. 1. ESTIRPES BACTERIANAS y PLASMIDOS

Tabla I. Estirpes bacterianas y plásmidos utilizados.

ESTIRPE O PLASMIDO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
UW136	Rif <sup>R</sup>	W. Brill
UW6r	<i>nifK</i> , Rif <sup>R</sup>	W. Brill
AS267	<i>nasA6::Tn5-B20</i> , Rif <sup>R</sup>	Ramos <i>et al.</i> , 1993
AS270	Φ( <i>nasA-lacZ</i> )12, Rif <sup>R</sup>	Ramos <i>et al.</i> , 1993
AS271	<i>nasA29::Tn5-B20</i> , Rif <sup>R</sup>	Ramos <i>et al.</i> , 1993
AS430	<i>nasT::Ω</i> , Rif <sup>R</sup>	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1995
AS433	Inserción del cassette Ω en el punto <i>BglII</i> por detrás del operón <i>nasST</i>	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1995
AS434	<i>nasS::KIXX</i> , Rif <sup>R</sup>	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1995
AS435	<i>ntrC511</i> , Rif <sup>R</sup>	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1995
AS440	Φ <i>nasA'</i> - <i>lacZ</i> , <i>nasA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> , <sup>+</sup> Rif <sup>R</sup>	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1995
AS441	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i> , <i>ntrA::Tn5</i> , Rif <sup>R</sup>	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1995
AS446	Φ <i>nasA'</i> - <i>lacZ</i> , <i>nasA</i> <sup>+</sup> <i>nasB::Tn5</i> , Rif <sup>R</sup>	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1995



Tabla I (cont.). Estirpes bacterianas y plásmidos utilizados.

ESTIRPE O PLASMIDO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
AS500	Sustitución del fragmento <i>XhoI</i> de <i>nasAB</i> por el cassette <i>nptI-sacB-sacR</i> , Rif <sup>R</sup>	Esta tesis
AS502	AS267 con una inserción del cassette $\Omega$ en el punto <i>SalI</i> de <i>nasT</i>	Esta tesis
AS503	AS270 con una inserción del cassette $\Omega$ en el punto <i>SalI</i> de <i>nasT</i>	Esta tesis
AS506	AS441, Tn5-- <i>et</i>	Esta tesis
AS507	AS435, Tn5-- <i>et</i>	Esta tesis
AS508	AS506, <i>nasA::Tn5</i>	Esta tesis
AS509	AS507, <i>nasA::Tn5</i>	Esta tesis
AS510	AS500 con sustitución del Cassette <i>nptI-sacB-sacR</i> por el fragmento <i>XhoI</i> del plasmido pPNC10, 13A	Esta tesis
AS511	AS510, $\Phi$ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB'</i>	Esta tesis
AS512	Inserción del cassette KISS en el punto <i>Kpn I</i> del final de <i>nasB</i> , Rif <sup>R</sup>	Esta tesis
AS513	Inserción del cassette KIXX en el punto <i>Xho I</i> de <i>nasH</i> , Rif <sup>R</sup>	Esta tesis

Tabla I (cont). Estirpes bacterianas y plásmidos utilizados.

ESTIRPE O PLASMIDO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<u><i>Azotobacter vinelandii</i></u>		
AS602	<i>nas</i> Δ <i>ST</i> <sup>+</sup> , Rif <sup>R</sup>	Gutierrez <i>et al.</i> , 1995
<u><i>Azotobacter chroococcum</i></u>		
ATCC4412	Silvestre	Colección de la Universidad de Valencia
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
71-18	Δ[ <i>lac-pro</i> ], F'[ <i>lacI</i> Q, <i>lacZ</i> ΔM15, <i>proAB</i> ], <i>supE</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
BMH71-18 <i>mutS</i>	<i>thi</i> , <i>supE</i> , Δ( <i>lac-proAB</i> ), [ <i>mutS</i> ::Tn10][F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> q ΔM15]	Zell y Fritz, 1987
DH5α	F'/endA1 <i>hsdr</i> 17( <i>rk-mk</i> +) <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>recA</i> 1 <i>gyrA</i> ( <i>nal</i> r) <i>relA</i> 1 Δ( <i>lacZ</i> YA- <i>argF</i> )u169 (fi80 <i>LacZ</i> ΔM15)	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<u>Plásmidos</u>		
pBLUESCRIPT II SK+	Plásmido derivado del pUC19, contiene una región de múltiples dianas de clonación, Ap <sup>R</sup>	Stratagene
pMAS19.1	Inserción del cassette Ω en el punto <i>Sal</i> I del plásmido pRM19	Gutierrez <i>et al.</i> , 1995
pHP45Ω	Tra <sup>-</sup> , Ap <sup>R</sup> , Ω (Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> )	Prentki y Krisch, 1984

Tabla I (cont.). Estirpes bacterianas y plásmidos utilizados.

ESTIRPE O PLASMIDO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<u>Plásmidos</u>		
pPN4	Fragmento <i>SalI-KpnI</i> del plásmido pRM20 clonado en el pTZ18R	Esta tesis
pPN12	<i>PnasAB</i> de <i>A. vinelandii</i> clonado en pCB267	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1995
pPN15	Fragmento <i>EcoRI-SalI</i> del plásmido pRM20 clonado en pTZ19R	Esta tesis
pPN15K	Fragmento <i>Kpn I</i> de 820 pb de <i>nasB</i> clonado en pTZ18R	Esta tesis
pPN15KE	Fragmento <i>EcoRI-KpnI</i> del plásmido pPN15 clonado en pTZ19R	Esta tesis
pPN15KR	Igual que pPN15K, pero el fragmento <i>KpnI</i> está clonado al revés	Esta tesis
pPN15V	Fragmento <i>EcoRI-SphI</i> del plásmido pPN15 clonado en pTZ19R	Esta tesis
pPNC10,13A	pRM21R que lleva las mutaciones C10 y C13 a A10 y A13 de <i>nasB</i>	Esta tesis
pPNS2	Fragmento <i>SphI</i> de 1.3 Kb del plásmido pPN15 clonado en pTZ18R	Esta tesis
pPNS2KISS	Inserción del Cassette KISS en el punto <i>KpnI</i> del plásmido pPNS2	Esta tesis

Tabla I (cont.). Estirpes bacterianas y plásmidos utilizados.

ESTIRPE O PLASMIDO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<u>Plásmidos</u>		
pPNS2KIXX	Inserción del Cassette KIXX en el punto <i>XhoI</i> del plásmido pPNS2	Esta tesis
pPNS2R	Igual que pPNS2, pero el fragmento <i>SphI</i> está clonado al revés	Esta tesis
pPNS2RXS	Derivado del pPNS2R, cortando con <i>XhoI</i> y <i>SalI</i> y ligando	Esta tesis
pRM18	Fragmento <i>Eco47III-EcoRI</i> de 2.3 Kb de $\lambda$ nas3.10 clonado en pTZ19R	Ramos <i>et al.</i> , 1993
pRM19	Fragmento <i>EcoRI</i> de 4 kb subclonado de $\lambda$ nas3.10 en pTZ19R	Ramos, 1992
pRM20	Fragmento <i>BamHI</i> de 15Kb de $\lambda$ nas3.10 clonado en pTZ19R	Ramos, 1992
pRM21	Fragmento <i>SalI</i> de 6.3 Kb de $\lambda$ nas3.10 clonado en pTZ19R	Ramos, 1992
pRM21R	Igual que el pRM21, pero el fragmento <i>SalI</i> esta clonado al reves	Esta tesis
pRM21X	Fragmento <i>XhoI</i> del pRM21 sustituido por el cassette <i>sacB-sacR-nptI</i> del pUM24	Esta tesis

Tabla I (cont.). Estirpes bacterianas y plásmidos utilizados.

ESTIRPE O PLASMIDO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<u>Plásmidos</u>		
pTZ18R	Tra <sup>-</sup> , Ap <sup>R</sup> , contiene una región de múltiples dianas de clonación	Mead et al., 1986
pTZ19R	Igual que pTZ18R, pero la región de múltiples dianas de clonación se orienta en dirección contraria	Mead et al., 1986
pUC4-KISS	Tra <sup>-</sup> , Ap <sup>R</sup> , KISS (Km <sup>R</sup> )	Oka et al., 1982
pUC4-KIXX	Tra <sup>-</sup> , Ap <sup>R</sup> , KIXX (Km <sup>R</sup> )	Beck et al., 1982
pUM24	Plásmido con los genes <i>sacB-sacR-nptI</i> de <i>B. subtilis</i> , Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Ried y Collmer, 1987

## 2. 2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

### 2. 2. 1. *Azotobacter vinelandii*

Los cultivos líquidos se hacían en agitación fuerte (200 r.p.m.). La temperatura de incubación era de 30°C. Los medios sólidos llevaban 15 g/l de agar ADSA-MICRO.

El medio mínimo para *A. vinelandii* era el medio de Burk modificado, cuya composición es la siguiente:

MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	5 mg
NaCl	0.2 g
Solución Fe-EDTA	1 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0.29 mg
Sacarosa	20 g
Tampón fosfato 0.5 M (pH 7.5)	40 ml
H <sub>2</sub> O	hasta 1 l

El tampón fosfato se añadía después de autoclavar el medio. Este medio se suplementaba, cuando era necesario con cloruro amónico (0.8 g/l), nitrato potásico (0.8 g/l), nitrito sódico (0.2 g/l) o nitrato amónico (1 g/l).

El medio rico no definido, BSNA, es el medio de Burk suplementado con triptona (2 g/l) y extracto de levadura (1 g/l).

Para inducir el estado competente en *Azotobacter vinelandii* en los experimentos de transformación se utilizó el medio TF, que es similar al medio de Burk pero sin hierro ni molibdeno y suplementado con 0.8 g/l de cloruro amónico.

### 2. 2. 2. *Escherichia coli*

La temperatura de incubación era de 37 °C. En medio líquido se incubaba en agitación a 200 r.p.m. En medios sólidos se añadía agar (15 g/l).

El medio rico no definido utilizado ha sido el medio de Luria-Bertani, que contiene:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	hasta 1 l
El pH se ajusta a 7.2 con NaOH	

En ciertos experimentos se empleó el medio mínimo E, cuya composición x50 es:

MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	2.5 g
Acido cítrico	25 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	125 g
CINH <sub>4</sub>	11 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	32.8 g
H <sub>2</sub> O	167.5 ml

Antes de usar se diluye a 1x con agua destilada estéril y las siguientes soluciones, por litro:

Glucosa 20%	10 ml
B1 (Tiamina 5 mg/ml)	0.5 ml

### 2. 2. 3. Agentes selectivos

Para la selección e identificación de diferentes estirpes y plásmidos se utilizaban agentes a las siguientes concentraciones (en µg/ml):

	<i>A. vinelandii</i>	<i>E. coli</i>
Espectinomicina	10	100
Kanamicina	2	40
Tetraciclina	4	20
Acido nalidíxico	20	25
Ampicilina	50	100
Cloranfenicol	-	25
KClO <sub>3</sub>	12250	-
Estreptomicina	10	100
Rifampicina	15	15
X-gal	-	50
IPTG	-	50



## 2. 3. TAMPONES Y SOLUCIONES

### 2. 3. 1. Tampón fosfato 0.5 M, pH 7.5

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10.88 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	73.12 g
$\text{H}_2\text{O}$	hasta 1 l

### 2. 3. 2. Solución de Fe-EDTA

Solución A:

EDTA ácido libre	16 g
KOH	10.4 g
$\text{H}_2\text{O}$	hasta 186 ml

Solución B:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13.7 g
$\text{H}_2\text{O}$	hasta 346 ml

Se preparaba mezclando las soluciones A y B, y burbujeando la mezcla con aire durante una noche.

### 2. 3. 3. Reactivo de Holmes-Bonner

Se preparaba siguiendo el procedimiento descrito por Maniatis *et al.*, (1982). Una solución de cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1 se mezclaba en volúmenes iguales con una solución de fenol saturada con tampón Tris-EDTA.

### 2. 3. 4. PEG/NaCl

PEG 20%, 2.5 M NaCl

### 2. 3. 5. Soluciones para aislar ADN plasmídico

Solución I:

Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8	25 mM

Solución II:

NaOH	0.2 N
SDS	1%

Solución III:

Acetato potásico	3 M
Acido fórmico	1.8 M

### 2. 3. 6. Tampón MOPS-KOH 50mM, pH7.5

MOPS a 50mM ajustando el pH con KOH

### 2. 3. 7. Tampón STE

Sacarosa	24 mM
Tris-HCl pH 8	10 mM
NaCl	0.1 M
EDTA	0.1 mM
Tritón X-100	5%

**2. 3. 8. CTAB/NaCl**

NaCl 4.1 g

CTAB 10 g

H<sub>2</sub>O hasta 100 ml

Se calentaba a 65°C hasta disolverlo completamente.

**2. 3. 9. Tampón TE**

Tris-HCl 10 mM, pH 7.5-8, EDTA 1 mM.

**2. 3. 10. Tampón TES**

Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8.

**2. 3. 11. Tampón TESL**

Similar al TES pero 100 veces menos EDTA y NaCl.

**2. 3. 12. Tampón SSC (x20)**

NaCl 3 M, citrato sódico 0.3 M, pH 7.

**2. 3. 13. Tampón TAE (x50)**

Trizma base 242 g

Acido acético glacial 57.1 ml

EDTA 0.5 M (pH 8) 100 ml

H<sub>2</sub>O hasta 1 l

**2. 3. 14. Tampón TBE (x10)**

Trizma base	162 g
Acido bórico	27.5 g
EDTA sal disódica	9.5 g
H <sub>2</sub> O	hasta 1 l

**2. 3. 15. Tampón de lisis para *Azotobacter vinelandii***

SDS 0.2 %, 2 x SSC

**2. 3. 16. Tampones para digestiones con enzimas de restricción**

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaban con el tampón adecuado a cada enzima suministrado por la propia casa comercial (Promega).

**2. 3. 17. Tampón para el ligamiento de ADN**

Se utilizaba el tampón suministrado por Promega.

**2. 3. 18. Tampón Z para  $\beta$ -galactosidasa**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	10.6 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	6.24 g
KCl	0.75 g
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.246 g
$\beta$ -mercaptoetanol	2.7 ml
H <sub>2</sub> O	hasta 1 l
Ajustar el pH a 7	

**2. 3. 19. Tampón SM**

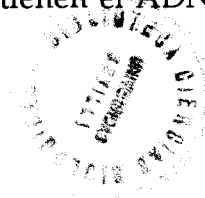
NaCl	5.8 g
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	2 g
Tris-HCl 1 M, pH 7.5	50 ml
Gelatina	0.1 %
H <sub>2</sub> O	hasta 1 l

**2. 3. 20. Soluciones para el marcaje y detección de ADN**

Solución de hibridación: 5xSSC; reactivo de bloqueo (suministrado por Boehringer-Mannheim), 5%; N-laureilsarcosina, sal sódica, 0.1%; SDS, 0.02%; formamida, 50%.

Soluciones de lavado de los filtros que contienen el ADN a analizar:

1. 2xSSC; SDS, 0.1%.
2. 1xSSC; SDS, 0.1%.
3. 0.1xSSC; SDS, 0.1%.



Tampón 1: Tris-HCl, 100 mM; NaCl, 150 mM; pH 7.5

Tampón 2: Reactivo de bloqueo, 2% en tampón 1.

Tampón 3: Tris-HCl, 100 mM; NaCl, 100 mM; MgCl<sub>2</sub>, 50 mM; pH 9.5

**2. 3. 21. Solución de ADN de esperma de arenque**

El ADN de esperma de arenque se disolvía a una concentración final de 10 mg/ml, se calentaba a 100°C durante 10 minutos y se pasaba varias veces por la aguja de una jeringa. Se guardaba a -20°C.

**2. 3. 22. Soluciones para electroforesis de proteínas**

Solución para el gel de resolución:

Acrilamida 40%

N-N' metilen-bis-acrilamida 1%

Filtrar y guardar a 4°C, no más de un mes

Solución para el gel de apilamiento:

Acrilamida 40%

N-N' metilen-bis-acrilamida 1%

Filtrar y guardar a 4°C, no más de un mes

Tampón de resolución x4: Tris-HCl 1.5 M; SDS, 0.4%; pH 8.8

Tampón de apilamiento x4: Tris-HCl 0.5 M; SDS, 0.4%; pH 6.8

Tampón de electrodos x10:

Trizma base 0.25 M

Glicina 1.92 M

SDS 1%

Tampón de equilibrio x2 (tampón de lisis x2):

Tris-HCl pH 6.8 125 mM

SDS 6%

β-mercaptoetanol 10%

Glicerol 20%

Azul de bromofenol 0.1%

## 2. 4. ESTIMACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

### 2. 4. 1. Actividad nitrato reductasa

El método utilizado es una modificación del descrito por Guerrero *et al.*, (1973). El ensayo se realizaba con cultivos en fase exponencial. Las células se recogían por centrifugación, se lavaban dos veces con tampón fosfato 12.5 mM, pH 7.5 y finalmente se resuspendían en 1/10 del volumen inicial en el mismo tampón.

MOPS-KOH 0.5 M, pH 7.0	0.4 ml
KNO <sub>3</sub> 100 mM	0.2 ml
Metil viológeno 1.5 mM	0.2 ml
CNOK 10 mM	0.2 ml
Células y H <sub>2</sub> O	0.8 ml
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (8 mg/ml en NaHCO <sub>3</sub> 95 mM)	0.2 ml

La mezcla se incubaba a 30°C durante 60 minutos y la reacción se paraba agitando vigorosamente hasta oxidar completamente el metil viológeno reducido. Se centrifugaba y se tomaba 1 ml de sobrenadante para determinar la concentración de nitrito.

### 2. 4. 2. Actividad nitrito reductasa

El método empleado es una modificación del descrito por Vega *et al.*, (1973). Las células se preparaban de forma idéntica a la descrita para el ensayo de la nitrato reductasa. La mezcla de ensayo contenía:

Tampón fosfato 0.5 M, pH 7.5	0.2 ml
NaNO <sub>2</sub> 10 mM	0.1 ml
Metil viológeno 1.5 mM	0.14 ml
H <sub>2</sub> O	0.26 ml

Células	0.2 ml
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (26 mg/ml en NaHCO <sub>3</sub> 0.29 M)	0.2 ml

La mezcla se incubaba a 30°C durante 60 minutos y la reacción se detenía por agitación vigorosa hasta oxidar completamente el metil viológeno. Se centrifugaba y se tomaba una muestra diluida 10 veces en agua para determinar la concentración de nitrito.

#### 2. 4. 3. Actividad β-galactosidasa

A partir de cultivos en fase exponencial se tomaban muestras y se les añadía tampón Z hasta un volumen final de 1 ml, 25 ml de cloroformo y 25 ml de SDS 0.1 %. Trás incubar 10 minutos a 30°C se añadían 200 ml de o-nitrofenil β-D-galactopiranosido (ONPG), 4 mg/ml, y se continuaba la incubación hasta apreciar color amarillo. El desarrollo de color se detenía con 0.5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. Se centrifugaba la mezcla y se medía la densidad óptica del sobrenadante a 420 nm. La actividad se expresaba en unidades Miller, obtenidas por la siguiente ecuación:  $1000 \times [DO_{420nm} / (t \times v \times DO_{600nm})]$ , donde t es el tiempo desde la adición de ONPG hasta que se añadió el Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en minutos, v es el volumen de cultivo en ml y DO<sub>600nm</sub> corresponde al cultivo de partida.



## 2. 5. Consumo de nitrato

### 2. 5. 1. Estimación del consumo de nitrato.

#### 2. 5. 1. 1. Estimación del consumo de nitrato lavando las células.

El consumo de nitrato se determinó siguiendo su desaparición del medio en que estaban suspendidas las células.

Las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento ( $DO_{560}=0.5-0.7$ ) por centrifugación a  $9000 \times g$  durante 5-10 min en una centrífuga Beckman J2-21 a  $0-4^{\circ}C$ , se lavaron y resuspendieron en MOPS-KOH, 50mM, pH7.5 suplementado con sacarosa al 1%(p/v). Alícuotas de 20 ml de esta suspensión se colocaron en matraces erlenmeyers de 50 ml de capacidad, los cuales permanecían abiertos al aire y eran sometidos a una agitación de 100 r.p.m a  $30^{\circ}C$ . Las suspensiones celulares así obtenidas se incubaron durante 15 min en dichas condiciones antes de iniciar el experimento por la adición del ión a una concentración de 0.5mM. De la suspensión celular se tomaron alícuotas de 1 ml cada cierto tiempo que se filtraron inmediatamente utilizando un sistema de filtración Millipore tipo HA de 12 orificios con un papel de filtro Glass Microfibre (GF/C) de Whatman. La concentración de nitrato en el medio se determinó como se especifica en el Apartado 2.6.2.

#### 2. 5. 1. 2. Estimación del consumo de nitrato sin lavar las células.

Las células se cultivaron en medio BS suplementado con 3 mM de nitrato hasta  $DO_{560}=0.7$  densidad a la que el nitrato restante en el medio no interfiere con el nitrato añadido en el experimento. A continuación se añadió a las suspensiones celulares el nitrato a concentración final de 0.5mM, y se tomaron alícuotas de 1ml cada cierto tiempo.

### 2. 5. 2. Tratamiento de choque osmótico.

Las células en fases exponencial ( $DO_{560}=0.5-0.7$ ) y cultivadas en medio BS con  $KNO_3$ , 8mM, se recogieron por centrifugación y se lavaron con Tris-HCl 10mM, pH=8. A continuación se resuspendieron en tampón Tris-HCl 30mM, pH=8, conteniendo sacarosa al 20%(p/v), hasta alcanzar una concentración aproximada de 1g de peso húmedo por 80 ml. La suspensión

celular así obtenida se incubó durante 10 min con agitación suave (87 r.p.m) a 30°C, tras lo cual las células se centrifugaron a 12000xg durante 5 min a 4°C, eliminándose todo el sobrenadante. El precipitado se resuspendió, suave y rápidamente, con tampón Tris-HCl 30 mM, pH=8, conteniendo sacarosa al 15% (p/v), incubándose durante 5 min en las mismas condiciones descritas anteriormente. El volumen de tampón utilizado en dicha resuspensión fue igual al volumen original del cultivo. La suspensión se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior, eliminando completamente el sobrenadante y conservando el precipitado de células sometidas a choque osmótico.

Para realizar ensayos de consumo de nitrato con estas células, se resuspendieron en tampon MOPS-KOH 50mM, pH7.5 con sacarosa al 1% (p/v) o en sobrenadantes de cultivo suplementado con sacarosa al mismo porcentaje. La viabilidad de estas células se comprobó mediante siembra en medio BS sólido, así como siguiendo la DO560 de la suspensión durante el ensayo de consumo (la lisis celular se registra por una caída de dicha absorbancia).

## 2. 6. METODOS ANALITICOS

### 2. 6. 1. Determinación de nitrito

La determinación de nitrito se realizaba según el método descrito por Snell y Snell (1949). Para ello se utilizaban las siguientes soluciones:

Solución A: Sulfanilamida 58 mM en HCl 2.4 N

Solución B: N-naftil-1-etilén-diamina diclorhidrato (N'NEDA) 0.69 mM

La determinación se realizaba añadiendo a 1 ml de muestra, 1 ml de solución A y 1 ml de solución B. Se agitaba y se incubaba 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añadían 2 ml de agua destilada y se medía la densidad óptica a 540 nm. Se realizaba una recta de calibrado con nitrito sódico.

### 2. 6. 2. Determinación de nitrato

El nitrato se determinó por absorbancia a 210 nm en disolución ácida, según el método descrito por Cawse (1967). A 0.5ml de muestra, conteniendo entre 0 y 400 nmoles de nitrato, se añadieron 0.5 ml de ácido amidosulfúrico al 2% (p/v). Tras incubar 2 min a temperatura ambiente, se agitó vigorosamente y se añadieron 1.5 ml de ácido perclórico al 6.65% (p/v). Después de 25 min a temperatura ambiente, se estimó la concentración de nitrato midiendo la absorbancia de la disolución a 210 nm y empleando un coeficiente de extinción  $E=6.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . El tratamiento con ácido amidosulfúrico elimina posibles contaminaciones de nitrito presentes en la muestra que absorben también la luz ultravioleta en medio ácido.

### 2. 6. 3. Determinación de proteína

Se realizaba por el método de Lowry modificado por Markwell *et al.*, (1978). Se empleaba las siguientes soluciones:

Solución A:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2%
NaOH	0.4%

Tartrato NaK	0.16%
SDS	1 %

Solución B:

CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	4%
---------------------------------------	----

Solución C:

100 de A + 1 de B, preparar poco antes de usar.

Solución D:

Folín 1:1 con agua destilada.

El procedimiento era el siguiente: a 1 ml de muestra diluida en NaOH 0.1 N con 20-40 mg de proteína se le añadían 3 ml de solución C. Se incubaba durante 45 minutos a 30°C. A continuación se añadían 0.3 ml de solución D y se incubaba otros 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se medía la absorbancia a 750 nm. La recta patrón se hacía con ovoalbúmina bovina disuelta en NaOH 0.1 N.

#### 2. 6. 4. Medidas de pH

El pH de las soluciones se determinaba utilizando un pH-metro "Crison" modelo micropH 2001.

#### 2. 6. 5. Medidas espectrofotométricas

Se llevaban a cabo utilizando los espectrofotómetros Pharmacia LKB modelo Novaspec II y Ultrospec III.

## 2.7. ANALISIS DE PROTEINAS

### 2.7.1. Preparación de extractos para electroforesis

Las muestras que se deseaban someter a electroforesis unidimensional con SDS, se concentraban 10 veces en tampón de equilibrio y se calentaban a 95°C durante 5 minutos.

### 2.7.2. Precipitación de las proteínas del sobrenadante

A un volumen de muestra se le añadía otro de TCA al 50%(p/v), se centrifugaba 15 min a 15000 r.p.m. tras incubar 10 min en hielo, a continuación se lavaba 2 veces con etanol absoluto y se secaba a 55°C. Una vez seco el precipitado, se resuspendía en SB 1x

### 2.7.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Las electroforesis se realizaban con aparatos de "Bio-Rad" modelo Miniprotean II. Para las electroforesis unidimensionales se usaba el método de Laemmli (1970); los geles se preparaban con un 10% de acrilamida y se sometían a 100 voltios durante 1 hora.

Como patrón de pesos moleculares se utilizaba una mezcla comercial (Bio-Rad) de proteínas de pesos conocidos (en Da):

Fosforilasa b de músculo de ratón	97400
Seroalbúmina de vaca	66200
Ovoalbúmina de gallina	45000
anhidrasa carbónica de vaca	31000
Inhibidor de tripsina	21500
Lisozima de gallina	14400

### 2.7.4. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante tinción

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se teñían introduciendo el gel en una solución acuosa de azul de Coomassie R 250 al 0.25%(p/v),

metanol al 40%(v/v) y ácido acético al 10%(v/v) en agua. Tras 15 min de tinción a temperatura ambiente, se lavaba varias veces con una solución de metanol al 40%(v/v) y ácido acético al 10%(v/v) en agua. Una vez concluido este tratamiento, las proteínas aparecían como bandas de color azul. Los geles se conservaron en ácido acético al 10%(v/v) en agua.

## 2. 8. METODOS GENETICOS Y DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 2. 8. 1. Mutagénesis dirigida.

La mutagénesis se llevaba a cabo utilizando el "Kit" suministrado por la casa comercial CLONTECH ("Transformer<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (2nd version), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Este método se basa en utilizar dos oligos, uno de selección y otro de mutación de los aminoácidos en cuestión

### 2. 8. 2. Preparación de células competentes y Transformación de *E. coli* y *A. vinelandii*

#### 2. 8. 2. 1. *Azotobacter vinelandii*

Para obtener células competentes se seguía el procedimiento descrito por Page y von Tigerstrom (1979), con algunas modificaciones. Se partía de un preinóculo de la estirpe deseada que había crecido a 28°C, con agitación, hasta la fase estacionaria, en medio TF. A continuación se diluía 10 veces en el mismo medio y se incubaba de nuevo hasta el final de la fase exponencial. El cultivo competente tomaba un intenso color amarillo verdoso.

Para transformar con ADN cromosómico se mezclaban 0.5 ml del cultivo concentrado 10 veces y 0.1 ml de la solución de ADN y se depositaba en una caja de medio TF. Tras incubación 15 horas a 30°C, la biomasa resultante se sembraba en el medio selectivo adecuado.

Para transformar con ADN plasmídico se utilizaba el método descrito por Glick *et al.*, (1985), ligeramente modificado. Se concentraban las células competentes 10 veces en medio TF. Se añadía la solución de ADN y se incubaba a 30°C durante 30 minutos. A continuación se añadían 10 volúmenes de medio TF y se continuaba incubando una hora más. Por último se sembraba en el medio selectivo adecuado.

#### 2. 8. 2. 2. *Escherichia coli*

Las transformaciones de *E. coli* se llevaban a cabo por el método del cloruro cálcico descrito por Maniatis *et al.*, (1982). La estirpe que se pretendía

transformar se crecía en medio de Luria-Bertani durante 15 horas. Posteriormente, se diluía 100 veces en ese mismo medio y se incubaba a 37°C durante 2-4 horas, hasta que alcanzaba una densidad óptica a 600 nm de 0.5. En ese momento el cultivo se enfriaba en hielo durante 10 minutos. Al cabo de ese tiempo, las células se centrifugaban a 10<sup>4</sup> r.p.m. durante 10 minutos, y se resuspendían en la mitad del volumen inicial de CaCl<sub>2</sub> 50 mM preenfriado, y se mantenía en hielo durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, la suspensión se centrifugaba y se resuspendía en 1/100 del volumen inicial de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y glicerol 15% frío, se mantenía en hielo durante al menos 2 horas. Trás este tratamiento, las células estaban en estado competente, por lo que se distribuían en tubos Eppendorf (0.2 ml/tubo) y se congelaban a -70°C. Por este procedimiento las células podían mantener la competencia durante un periodo de 6 meses. Para comprobar en cada momento el estado competente, se hacían transformaciones con concentraciones diferentes de ADN plasmídico conocidas.

Para transformar las células competentes, se descongelaba una muestra de 0.2 ml. A continuación, se mezclaba 0.1 ml de la suspensión bacteriana con el ADN correspondiente y se mantenía la mezcla en hielo durante 30 minutos. Al cabo de dicho tiempo se incubaba a 45°C durante 30 segundos. La mezcla se inoculaba a 37°C durante 1 hora en 1 ml de medio de Luria-Bertani. Por último, las células se recogían por centrifugación y se sembraban en cajas conteniendo el medio de selección apropiado.

Cuando se utilizaban plásmidos y estirpes de *E. coli* que permitían identificar clones portadores de moléculas recombinantes gracias a la inactivación insercional de la subunidad *a* del gen *lacZ* (Ullman *et al.*, 1967), el medio de selección se suplementaba con IPTG (0.2 mM) y X-gal (50 µg/ml).

### 2. 8. 3. Preparación de células electrocompetentes y electroporación de *E. coli*

Como alternativa a los métodos químicos de transformación se prepararon células electrocompetentes mediante uno de los métodos descritos para *E. coli* por BTX, Inc.

Un cultivo saturado de la estirpe deseada se diluyó 100 veces en 500 ml de LB y se incubó con agitación a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> apriximada de 0.5. El cultivo se enfrió rápidamente colocándolo en hielo 10' y se recogieron las



células mediante centrifugación a 4000xg a 4°C durante 15'. Se lavaron las células de forma sucesiva en 500 y 250 ml de agua bidestilada a 0°C y después en 10 ml de glicerol al 25% (v/v) a 0°C. Finalmente las células se resuspendieron en 1.5 ml de glicerol al 25% (v/v) a 0°C, se repartieron en alícuotas de 40 µl, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Las células preparadas de este método alcanzaron frecuencia de transformación superior a los 10<sup>9</sup> transformantes por µg de ADN plasmídico.

La electroporación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada alícuota de células electrocompetentes se mezcló con 1 a 5 µl de ADN o de mezcla de ligación (las mezclas de ligación se precipitaron, lavaron con etanol al 70% (v/v) y resuspendieron en agua para minimizar la concentración de sales), manteniéndola siempre en hielo. Las suspensiones se transfirieron a cubetas de electroporación con una abertura de 2 mm y se sometieron a una diferencia de potencial de 2.5 kV con una resistencia en paralelo de 129 ohmios en un electroporador BTX Electro cell manipulator<sup>®</sup> 600. Después del pulso, las células se diluyeron en 1 ml de medio LB, se incubaron durante 60 a 90' a 37°C, se sembraron en medio selectivo y se incubaron toda la noche a la misma temperatura.

### 2. 8. 4. Aislamiento de ADN

#### 2. 8. 4. 1. Aislamiento de ADN plasmídico

Los métodos seguidos para aislar ADN plasmídico a partir de *E. coli* fueron los siguientes:

- 1) Método de lisis alcalina, bien en su modalidad a pequeña escala, como se describe en Maniatis *et al.* (1982), o bien en su modalidad a media escala, a partir de 40 ml de cultivo, en el que se utilizaban volúmenes de reactivos proporcionales a los empleados en el aislamiento a pequeña escala.
- 2) Método de Holmes y Quigley (1981), basado en la lisis de esferoplastos celulares a 100°C en presencia de Tritón X-100 (Maniatis *et al.*, 1982).
- 3) Aislamiento de ADN siguiendo el procedimiento de lisis alcalina (Maniatis *et al.*, 1982) y posterior tratamiento con acetato amónico y polietilenglicol (Ausubel *et al.*, 1989).

4) Aislamiento de ADN a gran escala utilizando el "kit Magic™ Maxipreps ADN Purification System" suministrado por la casa comercial Promega. El protocolo seguido fue el descrito por los fabricantes.

El ADN plasmídico obtenido era tratado con ARNasa a una concentración final de 20 µg/ml.

#### 2. 8. 4. 2. Aislamiento de ADN cromosómico de *A. vinelandii*

##### 2. 8. 4. 2. 1. Aislamiento de ADN purificado

El método era el descrito por Robson *et al.*, (1984) con leves modificaciones. Se cultivaba *A. vinelandii* en medio Burk (50 ml) hasta final de la fase exponencial. Las células se recogían por centrifugación y se lavaban con NaCl al 3%. Se resuspendían en 10 ml de TES y se les añadía 1.6 ml de SDS al 10%. Se incubaba a 37°C durante 10 minutos y se precipitaba con 1.2 ml de acetato sódico 3 M y 10 ml de isopropanol a -20°C. Se mezclaba cuidadosamente, se recogía el ADN con varillas de vidrio y se resuspendía en 3 ml de 1xSSC. A continuación se añadía ARNasa a 10 µg/ml y se incubaba a 37°C durante 30 minutos. Luego se añadía proteinasa K a 0.5 mg/ml y se incubaba en agitación suave durante 15 horas a 37°C. Por último se desproteinizaba con el reactivo de Holmes-Bonner, se precipitaba con etanol absoluto y se resuspendía en 0.5 ml de TESL.

##### 2. 8. 4. 2. 2. Aislamiento de ADN cromosómico para transformación

Se seguía el procedimiento de Page y Sadoff (1976). Cultivos de 10 ml de medio Burk suplementado con cloruro amónico se llevaban hasta final de la fase exponencial. Las células se recogían por centrifugación y se resuspendían en 3 ml de la siguiente solución:

NaCl	1.5 M
Citrato sódico	15 mM
SDS	0.2%

A continuación se incubaba 90 minutos a 65°C y se agitaba vigorosamente durante 2 minutos. Los lisados se conservaban a -20°C.

### 2. 8. 5. Restricción de ADN

Las endonucleasas de restricción empleadas eran suministradas por la casa Promega y se utilizaban de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tiempo de reacción variaba entre 1 y 4 horas. Las reacciones se detenían por incubación a 65°C durante 20 minutos, por adición de EDTA a una concentración final de 10 mM o por fenolización de la reacción de restricción. La eficacia de la digestión se comprobaba mediante electroforesis en gel de agarosa.

### 2. 8. 6. Desfosforilación de los extremos 5' del ADN

La desfosforilación de los extremos 5' del ADN se realizaba con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera suministrada por la casa comercial Boehringer-Mannheim, siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se detenía calentando la reacción a 65°C durante 45 minutos en presencia de EGTA a una concentración final de 10 mM, fenolización y precipitación con etanol.

### 2. 8. 7. Relleno de extremos cohesivos

Para ello se utilizaba el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Este enzima y los nucleótidos necesarios eran suministrados por la casa Boehringer-Mannheim. Se seguía el protocolo del fabricante.

### 2. 8. 8. Tratamiento del extremo 3' colgante.

El tratamiento del extremo 3' del ADN se realizaba con la enzima T4 DNA polimerasa. A la muestra del ADN se le añadía 10 µl de dNTP 0.5 mM, 0.5 µl de BSA a 20 mg/ml y 10 µl de tampón 5X de T4 polimerasa y 1 µl de la enzima a 0.1 unidad. Se dejaba la muestra 20 minutos a 37°C y luego se precipitaba el ADN tras fenolizar.

### 2. 8. 9. Ligamiento de ADN

Las moléculas de ADN cortadas con las endonucleasas de restricción adecuadas se mezclaban y se precipitaban con etanol, se lavaban con etanol al 70% y se resuspendían en 9 µl de tampón de ligamiento. Luego se añadía 1 µl

(1 U/ $\mu$ l) de ADN ligasa de T4, suministrada por Promega, y se incubaba a 15°C durante 15 horas. Los productos de la reacción se utilizaban para transformar a *E. coli*.

### 2. 8. 10. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Se llevaba a cabo en aparatos de la firma Bio-Rad según el procedimiento descrito por Maniatis *et al.* (1982). Para obtener patrones de tamaño se digería el ADN del fago  $\lambda$  con diferentes enzimas de restricción o se utilizaba el ADN del plásmido pGEM-3 tratados con las endonucleasas *Hinfl*, *RsaI* y *SinI*. Las bandas obtenidas en cada caso (en pb) aparecen en la tabla II.

ADN $\lambda$ / <i>Bam</i> HI	ADN $\lambda$ / <i>Eco</i> RI	ADN $\lambda$ / <i>Hind</i> III		ADN $\lambda$ / <i>Sma</i> I	ADN pGEM-3	
16841	*21226	*23130	564	*19399	2645	396
7233	7421	9416	125	12220	1605	350
*6770	5804	6557		*8612	1198	222
6527	5643	*4361		8271	676	179
5626	4878	2322			517	126
*5505	*3530	2027			460	

**Tabla II.** Las bandas marcadas con \* daban lugar a una banda adicional, suma de las dos, por la unión a través de los extremos *cos* de  $\lambda$ , para evitar esto el ADN de  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción se puede calentar a 68°C durante 10 minutos.

Trás la electroforesis, los geles se teñían con una solución de bromuro de etidio y las bandas de ADN se visualizaban con transiluminador equipado con luz ultravioleta y se fotografiaban con cámaras Polaroid.

### **2. 8. 11. Purificación de fragmentos de restricción mediante la técnica de "geneclean"**

Para ello, la muestra que contenía el fragmento de ADN de interés se sometía a electroforesis en gel de agarosa. La porción de agarosa con el fragmento en cuestión se cortaba y el ADN se purificaba con el "kit geneclean" suministrado por BIO 101 Inc., siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

### **2. 8. 12. Análisis de ADN mediante hibridación**

Se utilizaba el "kit" no radiactivo de marcaje y detección de ADN de la casa Boehringer-Mannheim. Este método se basa en el marcaje al azar de ADN con digoxigenina-dUTP y en la detección de híbridos mediante enzimoimmunoensayo.

#### **2. 8. 12. 1. Transferencia de ADN a filtros de nailon**

Una vez que el ADN se había sometido a electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos se transferían a filtro de nailon (Hybond-N, Amersham). Para ello el gel se sumergía en HCl 0.25 N durante 15 minutos. Luego se lavaba con agua destilada y se incubaba en una solución de NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M durante 30 minutos. La transferencia se realizaba por presión durante 8-15 horas en presencia de una solución de NaCl 1.5 M y NaOH 0.25 M. El filtro se lavaba con una solución de 2xSSC. Al final se secaba y el ADN se fijaba al mismo por exposición a la luz ultravioleta durante 2 minutos.

#### **2. 8. 12. 2. Marcaje de la sonda**

El ADN para el marcaje se obtenía bien por el método de "geneclean" bien a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión. En este último caso no era necesario purificar el ADN, bastaba fundir la agarosa antes de la reacción de marcaje. Para ello se añadía 1.5 volúmenes de TE y se calentaba a 70°C. El marcaje se realizaba siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparaban también sondas marcadas por PCR.

### 2. 8. 12. 3. Hibridación de ADN con sondas marcadas con digoxigenina-dUTP

Se seguía las instrucciones del "kit" de la firma Boehringer-Mannheim. Se usaba formamida en las soluciones de prehibridación e hibridación. La prehibridación se hacía a 42°C durante 6 horas en presencia de ADN de esperma de arenque a una concentración final de 100 µg/ml. La hibridación se llevaba a cabo a 42°C durante 15 horas en presencia del ADN marcado. Posteriormente el filtro se lavaba con distintas soluciones de SSC y SDS para quitar el exceso y las uniones no específicas de la sonda al filtro o al ADN. A continuación se unía el anticuerpo conjugado con el ADN híbrido marcado. El revelado de la hibridación se podía llevar a cabo por dos métodos:

- 1) Método colorimétrico. La reacción cromática se producía en presencia de NTB y X-fosfato.
- 2) Método quimioluminiscente Lumi-Phos 530.

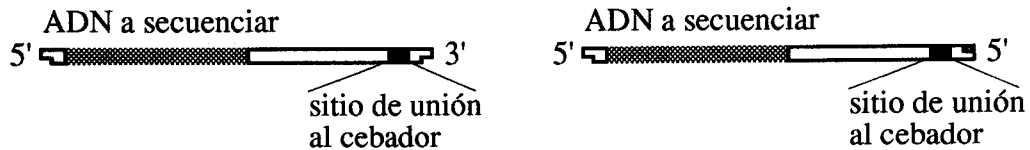
En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante (Boehringer-Mannheim).



### 2. 8. 13. Secuenciación de ADN

#### 2. 8. 13. 1. Construcción de plásmidos conteniendo delecciones seriadas de fragmentos de ADN a secuenciar

Para la construcción de estos plásmidos se utilizaba el "kit Double-Stranded Nested Deletion" suministrado por la firma comercial Pharmacia. Este método se basa en las propiedades de la enzima *exoIII*, que es específica de ADN de cadena doble y digiere una única cadena comenzando por un extremo 3' no protuberante. Para ello se realizaba una digestión doble del plásmido que contiene el fragmento de ADN a secuenciar insertado en la región de múltiples sitios para la clonación. Una de las enzimas debía generar extremos 5' protuberantes o extremos romos, mientras que la otra debía generar extremos 3' protuberantes que sobresalieran al menos 4 bases. Si los dos extremos a generar fueran 5' protuberantes, uno de ellos se protegía de la digestión de la exonucleasa rellenándolo con tionucleótidos y posterior tratamiento con la otra enzima de restricción. La localización relativa de las dianas debía ser como se esquematiza a continuación:



A continuación se trataba con *exoIII* durante diferentes tiempos para generar deleciones de distinto tamaño. Posteriormente se trataba con nucleasa S1 para eliminar los fragmentos de cadena única generados. Por último, se recircularizaba con ADN ligasa de T4, se transformaba *E. coli* y se analizaba el tamaño de las deleciones de los distintos transformantes.

### 2. 8. 13. 2. Aislamiento de ADN y secuenciación

El aislamiento de ADN se llevaba a cabo utilizando el "Kit" suministrado por la casa comercial Promega (Wizard™ Minipreps DNA Purification System) y el ADN se secuenció en ambas direcciones según el método de Sanger en el secuenciador automático (ALF-Pharmacia) en el servicio general de biología molecular de la Universidad de Sevilla.

### 2. 8. 14. Comparación de secuencias de aminoácidos

Las secuencias de aminoácidos se comparaba con las presentes en los bancos de datos del paquete informático del Genetics Computer Group de la Universidad de Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984), depositados en el Centro Informático Científico de Andalucía, mediante el programa TFASTA (Pearson y Lipman, 1988) de comparación de secuencias.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**



### 3. 1. ESTRUCTURA DEL OPERON *NasAB*

#### 3. 1. 1. Secuencia de la región *nasAB*

En estudios previos se había acotado, mediante análisis mutacional, una región del genoma de *A.vinelandii* de 6,3 Kb que contiene los genes que codifican la nitrito y la nitrato reductasa, *nasA* y *nasB*, respectivamente (F. Ramos *et al.*, 1993; F. Ramos, 1992). En este trabajo se ha abordado la secuenciación de un fragmento que contiene dicha región. Para ello se realizaron subclonaciones, con enzimas de restricción que reconocían dianas internas, en los plásmidos pTZ19R, pTZ18R y pBluescript II SK+. También se hicieron deleciones seriadas de algunas de las subclonaciones según se describe en Materiales y Métodos, y se eligieron oligonucleótidos para completar la secuencia en algunas zonas. Los plásmidos utilizados para la secuenciación se muestran en la figura 4.

La secuencia obtenida ha sido sometida al programa de análisis de secuencias de ADN, "codonpreference" del paquete informático GCG, figura 5. Se encontró una primera ORF incompleta de 186 nucleótidos, a 274 nucleótidos del extremo 3' de la anterior aparecen dos ORFs completas y una cuarta ORF incompleta. La primera fase de lectura abierta completa corresponde a *nasA* y está constituida por 2762 pb. A 77 pb del extremo 3' de esta última se encuentra la segunda ORF completa que corresponde a *nasB* y que está constituida por 2702 pb. A 99 pb del extremo 3' de *nasB* se encuentra la cuarta ORF incompleta.

En la figura 6 se muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente al fragmento *Eco47III-SphI* de 6.651 pb así como las secuencias de aminoácidos de las cuatro ORFs. Se señalan las posibles secuencias de unión a ribosomas localizadas a 6, 7 y 6 nucleótidos de los codones de iniciación (ATG) de los genes *nasA*, *nasB* y *nasH* respectivamente.

A 157 pb del codón de iniciación de *nasA* se encuentra la posible secuencia promotora 5'GG-(10 bases)-GC3' típica secuencia dependiente de sigma<sup>54</sup>. Entre *nasA* y *nasB* no aparece ninguna secuencia promotora lo cual confirma que los dos genes forman parte del mismo operón siendo el primer gen *nasA* y el segundo *nasB*. A 50 pb del extremo 3' de *nasB* y a 36 pb del codon de iniciación de la cuarta fase de lectura abierta se encuentra una

posible secuencia promotora, 5'GG-(10bases)-GC3', dependiente de sigma54. Sin embargo los posibles sitios de unión de la proteína NTRC están menos claros, la secuencia consenso correspondiente no está completa, sólo la mitad.

A 82 nucleótidos de la secuencia -12 del promotor de *nasAB* y a 33 nucleótidos del codón de iniciación del gen *nasA*, aparece una repetición invertida capaz de formar un lazo en el ARNm, 5'AAAAGGCGTCCN<sub>20</sub>GGACGCCTTT3'. Dicha estructura podría actuar como un terminador de la transcripción independiente de Rho. No se encontró una estructura terminadora similar entre *nasA* y *nasB*, ni entre *nasB* y la cuarta fase de lectura abierta incompleta.

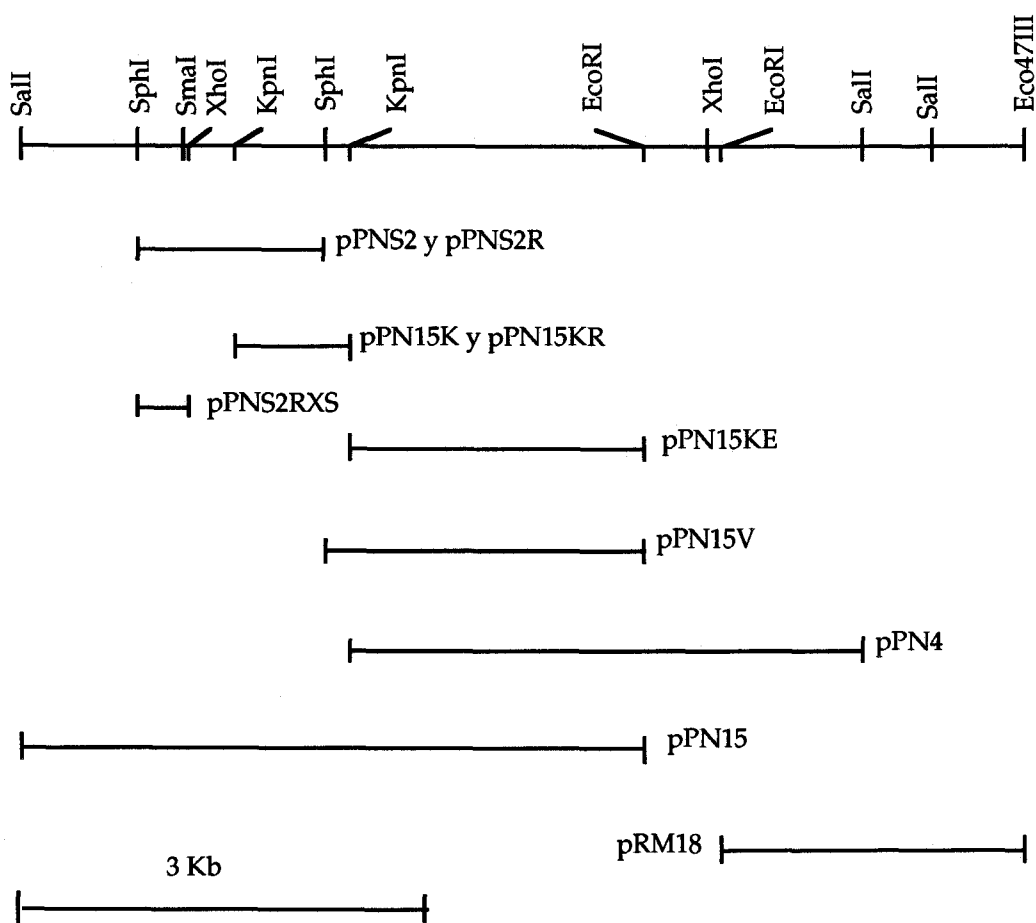
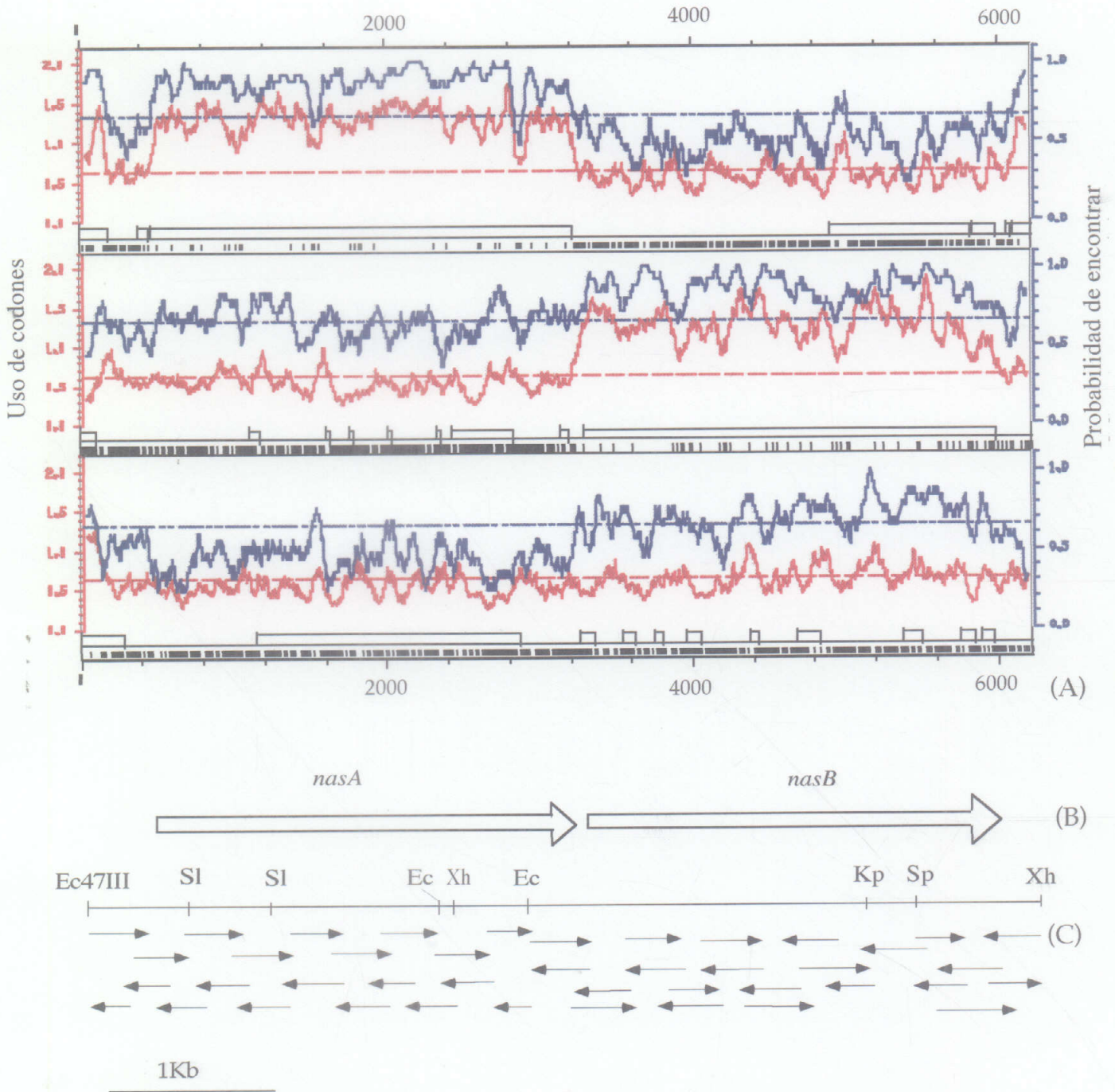


Figura 4. Mapa de los plásmidos utilizados para la secuenciación



**Figura 5.** (A) Uso de codones (línea roja) y probabilidad de encontrar regiones codificadoras (línea azul) de la secuencia de nucleótidos del fragmento Eco47III-SphI. (B) Localización de las ORFs correspondientes a los genes *nasA*, *nasB* y *nasH*. (C) estrategia de secuenciación.



**Secuencia de nucleótidos de *nasAB-nasH***

GCC AAT CAC CGC GGC ATC GCC TAC GGC CTG GTG GCC CCG CTG TTC GAG CAG GCC CGG GTC	1359
Ala Asn His Arg Gly Ile Ala Tyr Gly Leu Val Ala Pro Leu Phe Glu Gln Ala Arg Val	300
TGC GCC GAC CAT CTG GCC CGA CTC GGC AAC GCC CGC TAC GAA GGC TCG GTG ACC TCC ACC	1419
Cys Ala Asp His Leu Ala Arg Leu Gly Asn Ala Arg Tyr Glu Gly Ser Val Thr Ser Thr	320
AAG CTC AAG GTC ACC GGC ATC GAC CTG TTT TCC GCC GGC GAC TTC ATG GGC GGG GAA GGC	1479
Lys Leu Lys Val Thr Gly Ile Asp Leu Phe Ser Ala Gly Asp Phe Met Gly Gly Glu Gly	340
ACC GAG ACC ATC ACC TTt TCC GAC CCC ATC GGC GGC GTC TAC AGA GCT GGT GTC AGG ACG	1539
Thr Glu Thr Ile Thr Phe Ser Asp Pro Ile Gly Gly Val Tyr Arg Ala Gly Val Arg Thr	360
ACT GCT GGT CGC GCT GCT GTA CGC ACC GGC TGG TAC TTC CGG Cag ATC CGC GAG CAG CAC	1599
Thr Ala Gly Arg Ala Ala Val Arg Thr Gly Trp Tyr Phe Arg Gln Ile Arg Glu Gln His	380
AAT GTC GCC GAA ATC CGC GAC CTC CTG ATG TTC GGC GAA AAC GCC ATC GGC GAC GCC GGC	1659
Asn Val Ala Glu Ile Arg Asp Leu Leu Met Phe Gly Glu Asn Ala Ile Gly Asp Ala Gly	400
CAT CAG GGC CAG GAC AAG GCC ATG GCG ATG AGC GAC GAG ATG GAG GTC TGC GGC TGC AAC	1719
His Gln Gly Gln Asp Lys Ala Met Ala Met Ser Asp Glu Met Glu Val Cys Gly Cys Asn	420
GGT GTG TGC AAG GGC ACC ATC GTC AAG GCG ATC CGG GAA AAT GGT CTG CTT TCC GTG GAC	1779
Gly Val Cys Lys Gly Thr Ile Val Lys Ala Ile Arg Glu Asn Gly Leu Leu Ser Val Asp	440
GAG GTG AAG AAG CAC ACC AAG GCC GCC AGT TCc TGC GGC TCC TGC GCC AGG CTG GTC GAA	1839
Glu Val Lys Lys His Thr Lys Ala Ala Ser Ser Cys Gly Ser Cys Ala Arg Leu Val Glu	460
CAG ATT CTG ATC AAC ACC GTC GGC GGC GCC GAC GTC AAA CCC AAG AGC GAG AAG CCG GTG	1899
Gln Ile Leu Ile Asn Thr Val Gly Gly Ala Asp Val Lys Pro Lys Ser Glu Lys Pro Val	480
TGC GGC TGC ACC GAC CTC AAC CAC GGC CAG GTA CGC CAG GCG ATC CGC GAA CAG CGT CTG	1959
Cys Gly Cys Thr Asp Leu Asn His Gly Gln Val Arg Gln Ala Ile Arg Glu Gln Arg Leu	500
ACC GGC ATG GGC GAG GCC ATG AAG GCC ATG GAA TGG CGC AGC CCC GAT GGC TGC GCC ACC	2019
Thr Gly Met Gly Glu Ala Met Lys Ala Met Glu Trp Arg Ser Pro Asp Gly Cys Ala Thr	520
TGC CGC CCG GCG CTG AAC TAC TAC CTG ATC TCC ACC TGG CCG GGC GAG GCC AAG GAC GAT	2079
Cys Arg Pro Ala Leu Asn Tyr Tyr Leu Ile Ser Thr Trp Pro Gly Glu Ala Lys Asp Asp	540
CCG CAG TCG CGC CTG ATC AAC GAG CGT GCC CAC GCC AAC ATC CAG AAG GAC GGC ACC TAC	2139
Pro Gln Ser Arg Leu Ile Asn Glu Arg Ala His Ala Asn Ile Gln Lys Asp Gly Thr Tyr	560
TCG GTG GTG CCG cGC ATG TGG GGC GGC GTG ACC AGC CCC GCC GAG CTG CGG CGC ATC GCC	2199
Ser Val Val Pro Arg Met Trp Gly Gly Val Thr Ser Pro Ala Glu Leu Arg Arg Ile Ala	580
GAC GTG GCC GAG AAG TAC AAG GTG CCG ATG GTC AAG GTC ACC GGC GGC CAG CGC ATC GAC	2259
Asp Val Ala Glu Lys Tyr Lys Val Pro Met Val Lys Val Thr Gly Gly Gln Arg Ile Asp	600
CTG CTC GGC GTG AAG AAG GAA GAC CTG CCG AAC GTG TGG CGC GAG CTG GGC ATG CCT TCC	2319
Leu Leu Gly Val Lys Lys Glu Asp Leu Pro Asn Val Trp Arg Glu Leu Gly Met Pro Ser	620
GGC CAT GCC TAC GGC AAA TCC ATC CGC ACC GTG AAG ACC TGC GTC GGC AGC <u>GAA TTC</u> TGC	2379
Gly His Ala Tyr Gly Lys Ser Ile Arg Thr Val Lys Thr Cys Val Gly Ser Glu Phe Cys	640
CGC TTC GGC ACC CAG AAT TCG ACG CAG ATG GGT ATC GAC <u>CTC GAG</u> CAT GCG CTG TTC GGC	2439
Arg Phe Gly Thr Gln Asn Ser Thr Gln Met Gly Ile Asp Leu Glu His Ala Leu Phe Gly	660
ATG TGG TCG CCG CAC AAG GTC AAG CTG GCG GTT TCC GGC TGC CCG CGC AAC TGC GCC GAG	2499
Met Trp Ser Pro His Lys Val Lys Leu Ala Val Ser Gly Cys Pro Arg Asn Cys Ala Glu	680

**Figura6 (cont.).** Secuencia de nucleótidos del fragmento *Eco47III-SphI* que contiene los genes *nasAB-nasH* (parte superior) y secuencias de aminoácidos de las proteínas que codificarían.

Secuencia de nucleótidos de *nasAB-nasH*

TCG GGC ATC AAG GAT GTC GGC GTC ATC GGC GTG GAT TCG GGC TGG GAG ATC TAC ATC GGC	2559
Ser Gly Ile Lys Asp Val Gly Val Ile Gly Val Asp Ser Gly Trp Glu Ile Tyr Ile Gly	700
GGC AAC GGC GGC ATC AAG ACC GAG GCC GGC GAG TTC TTC GTC AAG GTC GGG AGC GCC GGC	2619
Gly Asn Gly Gly Ile Lys Thr Glu Ala Gly Glu Phe Phe Val Lys Val Gly Ser Ala Gly	720
GAA GTC ATG GAG TAC AGC CTG GCC TTC CTC CAG CTC TAT CGC GAG GAA GCC TTC TAC CTG	2679
Glu Val Met Glu Tyr Ser Leu Ala Phe Leu Gln Leu Tyr Arg Glu Glu Ala Phe Tyr Leu	740
GAG CGC ACC GTG CAC TAC CTG CAC CGC GTC GGC CTG GAG CAC ATC AGG CAG GCG GTG CTG	2739
Glu Arg Thr Val His Tyr Leu His Arg Val Gly Leu Glu His Ile Arg Gln Ala Val Leu	760
GAG GAC GGG GAA CGG CGC AAG GCC CTG CAC CAG CGC CTG CTG TTC GCC CTG TCC TTC GAG	2799
Glu Asp Gly Glu Arg Arg Lys Ala Leu His Gln Arg Leu Leu Phe Ala Leu Ser Phe Glu	780
<i>EcoRI</i>	
CAG GAC CCG TGG CAG CAG CAG ATC GGC AAC CCG GCC CTG AAG AAG <u>GAA TTC</u> GCT CCT GCA	2859
Gln Asp Pro Trp Gln Gln Gln Ile Gly Asn Pro Ala Leu Lys Lys Glu Phe Ala Pro Ala	800
ACC AAT CCG CAA CGT ATT GAG CGA GGA ATA TCG ATG AAC TGG CTG GAT ATC TGT GCC CTG	2919
Thr Asn Pro Gln Arg Ile Glu Arg Gly Ile Ser Met Asn Trp Leu Asp Ile Cys Ala Leu	820
GAC GAG ATC AAC GTG CTC GGC GCG CGC ATC GTC GCC GGC CCC AGG GGC GAC ATC GCC ATC	2979
Asp Glu Ile Asn Val Leu Gly Ala Arg Ile Val Ala Gly Pro Arg Gly Asp Ile Ala Ile	840
TTC CGT ACC GCC CGC GAC GAG GTT TTC GCT CTC GAC GAC CGT TGC CCG CAC AAA GGC GGT	3039
Phe Arg Thr Ala Arg Asp Glu Val Phe Ala Leu Asp Asp Arg Cys Pro His Lys Gly Gly	860
CCG CTG TCG CAG GGA CTG ATC TAC GGC AAG CGG GTG GCC TGC CCG CTG CAC AAC TGG CAG	3099
Pro Leu Ser Gln Gly Leu Ile Tyr Gly Lys Arg Val Ala Cys Pro Leu His Asn Trp Gln	880
ATC GAT CTG GAA AGC GGC GAG GCG CTG GAA CCG GAT GTC GGC TGC TCG CAC AAG TAT CCG	3159
Ile Asp Leu Glu Ser Gly Glu Ala Leu Glu Pro Asp Val Gly Cys Ser His Lys Tyr Pro	900
GTC AAG ATC GAG GGC GGG CGC GTA CTG CTG GCC CTG AAA TCC CTG AAG GAC TGC GCC TGA	3219
Val Lys Ile Glu Gly Gly Arg Val Leu Leu Ala Leu Lys Ser Leu Lys Asp Cys Ala TER	919
SD	
ACCCCGCAGGAGCGAGTTCATTCGCGCCCCCACGCCATCGCGGATGAATCCGCTCGTGCCGACGGAGAAACGACCATG	3298
	Met 1
GCC CAC CAG ACC ACC GCC TCC ACC TGC TGT TAC TGC GGC GTC GGC TGC GGC GTG CTG	3355
Ala His Gln Thr Thr Ala Ser Thr Cys Cys Tyr Cys Gly Val Gly Cys Gly Val Leu	20
ATC GAG CAC GAC GGC GAA CAG ATC ACC GGC GTC GCC GGC GAC CCG GCA CAT CCG GCC AAT	3415
Ile Glu His Asp Gly Glu Gln Ile Thr Gly Val Ala Gly Asp Pro Ala His Pro Ala Asn	40
CAC GGC CGC CTG TGC AGC AAG GGC TCG ACC CTG CAC CTG ACC GGC GAT CTG GCG CCC GCG	3475
His Gly Arg Leu Cys Ser Lys Gly Ser Thr Leu His Leu Thr Gly Asp Leu Ala Pro Ala	60
CGC TCC ATC CCG AAC TtG CGC TCG GGC AAG GCG CTG CCC CGT GAC CGT ACC GAC TGG GAC	3535
Arg Ser Ile Pro Asn Leu Arg Ser Gly Lys Ala Leu Pro Arg Asp Arg Thr Asp Trp Asp	80
AAT GCG CTG GAT CAC GCG GCT GCG GTT TTC GCC GAA ACC ATC CGC GAG CAC GGC CCG GAC	3595
Asn Ala Leu Asp His Ala Ala Ala Val Phe Ala Glu Thr Ile Arg Glu His Gly Pro Asp	100
AGC GTG GCC TTC TAT ATC TCC GGG CAA CTC CTG ACC GAA GAC TAC TAC GCC TTC AAC AAG	3655
Ser Val Ala Phe Tyr Ile Ser Gly Gln Leu Leu Thr Glu Asp Tyr Tyr Ala Phe Asn Lys	120
CTG GCG CGC GCG CTG GTC GGC ACC AAC AAC ATC GAC AGC AAC TCG CGG CTG TGC ATG TCC	3715
Leu Ala Arg Ala Leu Val Gly Thr Asn Asn Ile Asp Ser Asn Ser Arg Leu Cys Met Ser	140

Figura6 (cont.). Secuencia de nucleótidos del fragmento *Eco47III-SphI* que contiene los genes *nasAB-nasH* (parte superior) y secuencias de aminoácidos de las proteínas que codificarían.

## Secuencia de nucleótidos de *nasAB-nasH*

TCG	GCG	GTG	GTC	GGC	TAC	AAG	CGC	AGC	CTG	GGC	GCC	GAT	GCC	CCG	CCC	TGC	GCC	TAC	GAG	3775
Ser	Ala	Val	Val	Gly	Tyr	Lys	Arg	Ser	Leu	Gly	Ala	Asp	Ala	Pro	Pro	Cys	Ala	Tyr	Glu	160
GAC	GTC	GAG	CAG	AGC	CAT	TGC	CTG	CTG	ATC	GCC	GGC	AGC	AAC	ATG	GCC	TAC	GCC	CAT	CCG	3835
Asp	Val	Glu	Gln	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Ile	Ala	Gly	Ser	Asn	Met	Ala	Tyr	Ala	His	Pro	180
GTT	CTG	TTC	CGT	CGC	CTG	GAA	GCG	GCC	AAG	GCC	CGC	CGT	CCA	GAG	ATG	AAG	ATC	ATC	GTG	3895
Val	Leu	Phe	Arg	Arg	Leu	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Arg	Arg	Pro	Glu	Met	Lys	Ile	Ile	Val	200
GTC	GAT	CCG	CGA	CGC	ACC	GAT	ACC	TGT	GAG	TTG	GCT	GAT	CTA	CAC	CTG	GCG	ATC	TTG	CCG	3955
Val	Asp	Pro	Arg	Arg	Thr	Asp	Thr	Cys	Glu	Leu	Ala	Asp	Leu	His	Leu	Ala	Ile	Leu	Pro	220
GGC	ACC	GAT	GTG	GCG	CTG	TTC	CAC	GGC	ATT	CTG	CAC	ATC	CTC	TTG	TGG	GAA	GGC	TGG	ATC	4015
Gly	Thr	Asp	Val	Ala	Leu	Phe	His	Gly	Ile	Leu	His	Ile	Leu	Leu	Trp	Glu	Gly	Trp	Ile	240
GAC	CGC	GCC	TGG	ATC	GAG	GCC	CAC	ACC	GAG	GGC	TTC	GAC	GAA	TTG	AAG	AAA	CTG	GTG	CGC	4075
Asp	Arg	Ala	Trp	Ile	Glu	Ala	His	Thr	Glu	Gly	Phe	Asp	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Val	Arg	260
GAC	TAC	AGC	CCG	GCG	GCG	GTG	GCG	GAT	ATC	TGC	GGC	ATC	TCG	GTT	GGC	AGC	CTG	CAG	ACC	4135
Asp	Tyr	Ser	Pro	Ala	Ala	Val	Ala	Asp	Ile	Cys	Gly	Ile	Ser	Val	Gly	Ser	Leu	Gln	Thr	280
TGC	GCC	GAG	CTG	ATC	GGC	AAG	GCG	CCC	AGC	TTC	CTG	TCG	CTG	TGG	TGC	ATG	GGG	CTC	AAC	4195
Cys	Ala	Glu	Leu	Ile	Gly	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Leu	Trp	Cys	Met	Gly	Leu	Asn	300
CAG	TCC	ACA	TCG	GGT	AGC	GCC	AAG	AAC	AGT	GCG	CTG	ATC	AAC	CTG	CAC	CTG	GCC	ACC	GGA	4255
Gln	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Ala	Lys	Asn	Ser	Ala	Leu	Ile	Asn	Leu	His	Leu	Ala	Thr	Gly	320
CAG	ATC	GGC	AAG	CCC	GGC	GCC	GGC	CCC	TTC	TCG	CTG	ACC	GGC	CAG	CCC	AAC	GCC	ATG	GGC	4315
Gln	Ile	Gly	Lys	Pro	Gly	Ala	Gly	Pro	Phe	Ser	Leu	Thr	Gly	Gln	Pro	Asn	Ala	Met	Gly	340
GGC	CGC	GAG	ACC	GGC	AGC	CTG	GCC	AAC	CTG	CTG	CCC	GGT	CAC	CGC	GAA	GCC	GGC	AAT	GCC	4375
Gly	Arg	Glu	Thr	Gly	Ser	Leu	Ala	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	His	Arg	Glu	Ala	Gly	Asn	Ala	360
GGG	CAC	CGT	GCC	GAA	GTC	GCC	GAC	TAC	TGG	CGC	ATC	GAC	GCT	CTG	CCG	GAA	AGC	ACC	GGC	4435
Gly	His	Arg	Ala	Glu	Val	Ala	Asp	Tyr	Trp	Arg	Ile	Asp	Ala	Leu	Pro	Glu	Ser	Thr	Gly	380
CTG	ACC	GCC	ATC	GAG	CTG	TTC	GAG	GCC	GTG	CGC	ATC	GGC	CGC	ATC	AAG	GCC	TTG	TGG	ATC	4495
Leu	Thr	Ala	Ile	Glu	Leu	Phe	Glu	Ala	Val	Arg	Ile	Gly	Arg	Ile	Lys	Ala	Leu	Trp	Ile	400
GCC	TGC	ACC	AAC	CCG	GCG	CAG	TCG	CTG	CCT	GAC	CAG	CAG	AAG	ATC	CAC	GAG	GCC	CTT	GCC	4555
Ala	Cys	Thr	Asn	Pro	Ala	Gln	Ser	Leu	Pro	Asp	Gln	Gln	Lys	Ile	His	Glu	Ala	Leu	Ala	420
GCC	TGC	CCG	TTC	GTG	GTG	GTG	CAG	GAG	GCC	TAC	GCC	ACC	ACC	GAG	ACC	TGT	CGC	TAC	GCC	4615
Ala	Cys	Pro	Phe	Val	Val	Val	Gln	Glu	Ala	Tyr	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Cys	Arg	Tyr	Ala	440
GAC	CTG	TTG	CTG	CCC	GCC	GCG	GCT	GAC	GAA	AAG	GAA	GGC	ATG	GTG	ACC	AAC	TCC	GAA	CGG	4675
Asp	Leu	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Asp	Glu	Lys	Glu	Gly	Met	Val	Thr	Asn	Ser	Glu	Arg	460
CGC	CTC	AGC	CAT	GTG	CGC	CGG	GCC	GTG	CCG	GCA	CCG	GGC	GAG	GCG	CGG	GCG	GAC	TGG	GCG	4735
Arg	Leu	Ser	His	Val	Arg	Arg	Ala	Val	Pro	Ala	Pro	Gly	Glu	Ala	Arg	Ala	Asp	Trp	Ala	480
ATC	GTC	TGC	GAC	TTC	GCC	CGT	CGC	CTG	GAA	AAA	CAC	CTG	CGC	CCC	GGC	CGA	CCC	AGC	CTG	4795
Ile	Val	Cys	Asp	Phe	Ala	Arg	Arg	Leu	Glu	Lys	His	Leu	Arg	Pro	Gly	Arg	Pro	Ser	Leu	500
TTC	GAG	TTC	GCC	GAC	CCG	GCC	GCG	CTG	TTC	GAT	GAA	TAC	AAA	CAA	CTG	ACC	GCC	GGT	CGC	4855
Phe	Glu	Phe	Ala	Asp	Pro	Ala	Ala	Leu	Phe	Asp	Glu	Tyr	Lys	Gln	Leu	Thr	Ala	Gly	Arg	520
GAC	CTC	GAC	CTG	TCC	GGT	CTG	AGC	CAC	GCC	CTG	ATC	GAC	GAA	CTC	GGT	CCC	CAG	CAA	TGG	4915
Asp	Leu	Asp	Leu	Ser	Gly	Leu	Ser	His	Ala	Leu	Ile	Asp	Glu	Leu	Gly	Pro	Gln	Gln	Trp	540

**Figura 6 (cont.).** Secuencia de nucleótidos del fragmento *Eco47III-SphI* que contiene los genes *nasAB-nasH* (parte superior) y secuencias de aminoácidos de las proteínas que codificarían.





## Secuencia de nucleótidos de *nasAB-nasH*

CCC GAA TTG CTG ACG CTC AAG GCC GTG CGT GCC CTG GGC GAG GCG GAG GTG GTG CTG ATC	6198
Pro Glu Leu Leu Thr Leu Lys Ala Val Arg Ala Leu Gly Glu Ala Glu Val Val Leu Ile	34
<i>XhoI</i>	
GAC GAC CTG GTC AAT CCG GCG GTG <u>CTC GAG</u> CAC TGC CCG CAG <u>GCC CCG</u> GTG ATC GGC GTG	6258
Asp Asp Leu Val Asn Pro Ala Val Leu Glu His Cys Pro Gln Ala Arg Val Ile Gly Val	54
<i>SmaI</i>	
GGC AAG CGC GGC GGC TGC CGC TCC ACG CCA CAG GAT TTC ATC CAC CGC CTG ATG CTG CGC	6318
Gly Lys Arg Gly Gly Cys Arg Ser Thr Pro Gln Asp Phe Ile His Arg Leu Met Leu Arg	74
TAT GCC CGC CAG GGA AAA TGC GTG GCG CGC CTG AAG GGG GGC GAT CCC TGC ATC TTC GGC	6378
Tyr Ala Arg Gln Gly Lys Cys Val Ala Arg Leu Lys Gly Gly Asp Pro Cys Ile Phe Gly	94
CGT GGC AGC GAA GAG GCA GAC TGG CTG GCG AGC CAC GGC ATC GCC ACG GAA ATC GTC AAC	6438
Arg Gly Ser Glu Glu Ala Asp Trp Leu Ala Ser His Gly Ile Ala Thr Glu Ile Val Asn	114
GGC ATC ACG GCG GGC CTG GCC GGC GCC ACC CAA TGC GGC ATT CCA CTG ACC CTG CGC GGC	6498
Gly Ile Thr Ala Gly Leu Ala Gly Ala Thr Gln Cys Gly Ile Pro Leu Thr Leu Arg Gly	134
GTG GCG CGT GGC GTG ACC CTG GTC ACG GCC CAC ACC CAG GAC GAC AGC AGC CTG AAC TGG	6558
Val Ala Arg Gly Val Thr Leu Val Thr Ala His Thr Gln Asp Asp Ser Ser Leu Asn Trp	154
CAG GCG CTG GCC CGG AGC GGC ACC ACC CTG GTG GTC TAC ATG GGC GTG GCA AGC TGG CCG	6618
Gln Ala Leu Ala Arg Ser Gly Thr Thr Leu Val Val Tyr Met Gly Val Ala Ser Trp Pro	174
<i>SphI</i>	
AGA TAC GCG ATG GCC TGC TGG CAG GCG <u>GCA TGC</u>	6651
Arg Tyr Ala Met Ala Cys Trp Gln Ala Ala Cys	185

**Figura 6 (cont.).** Secuencia de nucleótidos del fragmento *Eco47III-SphI* que contiene los genes *nasAB-nasH* (parte superior) y secuencias de aminoácidos de las proteínas que codificarían.

## 3. 1. 2. Análisis de la proteína NASA

La primera ORF completa del fragmento *Eco47III-SphI* corresponde al gen *nasA* que codifica la nitrito reductasa, NASA. Está compuesta por 919 aminoácidos, tiene un peso molecular de 99851. 20 Da y un pI de 6.51. La comparación con las secuencias de aminoácidos encontradas en los bancos de datos disponibles, utilizándose el programa TFASTA (Pearson y Lipman, 1988) mostró una gran similitud con las proteínas NASB y NASD de *Bacillus subtilis* (Ogawa *et al.*, 1995), NASB de *Klebsiella pneumoniae* M5al (Lin *et al.*, 1993) y NIRB de *E. coli* (Peakman *et al.*, 1990a). En la tabla III, se muestran los porcentajes de similitud e identidad obtenidos mediante el programa BESTFIT de alineamiento de secuencias (Smith y Waterman, 1981).

**Tabla III.** Proteínas de mayor semejanza a NASA de *A. vinelandii* según el programa TFASTA. Se indica el porcentaje de similitud, de identidad y el solapamiento, según el programa BESTFIT de alineamiento de secuencias (Smith y Waterman, 1981).

PROTEINA	PROCEDENCIA	% SIMILITUD	% IDENTIDAD	HUECOS	SOLAPAMIENTO
NASD	<i>B. subtilis</i>	69.17	51.88	6	820 aa
NASB	<i>B. subtilis</i>	60.39	39.34	10	801 aa
NASB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	59.37	36.18	24	972 aa
NIRB	<i>E. coli</i>	57.83	33.04	17	851 aa

NASD de *B. subtilis*, un polipéptido de 805 aminoácidos, corresponde a una de las dos subunidades que componen la nitrito reductasa asimilatoria de esta bacteria, mientras que NASB de 770 aminoácidos, parece estar implicada

en el transporte de electrones a la nitrato reductasa (NASC). Ambas proteínas NASB y NASD contienen sitios de unión tanto al FAD como al NAD(P)H y NASD tiene además un sitio de unión al sirohemo (Ogawa *et al.*, 1995).

La proteína NASB de *K. pneumoniae* corresponde a la nitrito reductasa asimilatoria (Lin *et al.*, 1993). Esta proteína tiene 957 aminoácidos y un peso molecular de 104 KDa. La secuencia de la región *nasBA* de *K. pneumoniae* mostró que estos dos genes se cotranscriben siendo el primer gen *nasB* (nitrito reductasa) y el segundo *nasA* (nitrato reductasa) y que solapan en la secuencia (TGATG) que contiene los codones de terminación e iniciación de la traducción de *nasB* y *nasA*, respectivamente.

La nitrito reductasa citoplásmica y dependiente de NADH de *E. coli* tiene una estructura peculiar, está formada por dos subunidades, NIRB y NIRD. NIRB está compuesta por 839 aminoácidos, tiene un peso molecular de 90 kDa y corresponde a la apoenzima mientras que NIRD es un polipéptido de 12 Kda que copurifica con NIRB y es necesario para la actividad enzimática. Este pequeño polipéptido tiene una alta homología con los extremos C-terminales de las nitrito reductasas de *A. nidulans* y de *K. pneumoniae* (Harborne *et al.*, 1992 y Lin *et al.*, 1993).

En la figura 7 se muestra el alineamiento de la proteína NASA de *A. vinelandii* con NASB, NASD de *B. subtilis*, NASB de *K. pneumoniae*, y NIRB de *E. coli* aplicando el programa PILEUP de alineamiento de secuencias (Feng y Doolittle, 1987). Los sitios conservados de unión al FAD (aa 10 al 15), al NAD(P)H (aa 152-157) de las cinco proteínas, y el sitio de unión al sirohemo de todas salvo NASB de *B. subtilis*, están subrayados en la secuencia de aminoácidos.

	1				50
EconirB	MSKVRLAII G	NGMVGHRFIE	DLLDKSDAAN	FDITVFCEEP	RIAYDRVHLS
kpnnasB	MTKPVLVLVG	HGMVGHFFLE	QCVSRLDHQQ	YRIVVFCEER	YAAVDRVHLT
BsunasD	MGKKQLVLVG	NGMAGVRAIE	EILL.SVAKDE	FQITIFGAEP	HPNYNRILLS
AvinasA	MEKLKLVMI G	NGMAGVRTLE	ELL.KLAPDL	YEIAVFGAEP	HPNYNRILLS
BsunasB	MKQRLVLVAG	<u>NGMAGI</u> RCIE	EVL.KLNRHM	FEIVIFGSEEP	HPNYNRILLS
	51				100
EconirB	SYFSSHHTA. E	ELSLVREGFY	EKHGIKVLVG	ERAITINRQE	KVIHSSAGRI
kpnnasB	EYFAGRSA. E	SLSLVEGDFE	TQHGIELRLS	ESVASIDREA	RVVRDAFGHE
BsunasD	KVLQGDTDIK	DITLNDWDWY	EENN IQLYTN	ETVIKVDTEN	KTVITDADRI
AvinasA	PVLAGEQTFE	EIVLNDLDWY	RDNGIDLRLG	CKVVDIDREN	RGVTASDGSQ
BsunasB	SVLQGEASLD	DITLNSKDWY	DKHGITLYTG	ETVIQIDTDQ	QQVITDRKRI
	101				150
EconirB	VFYDKLIMAT	GSYPWIPPIK	GSDTQDCFVY	RTIEDLNAIE	SCARRSKRGA
kpnnasB	THWDKLVLAT	GSYPFVPPVP	GHNLEGCFVY	RTLDLDQIA	ARAATARRGV
BsunasD	QPYDELLLAT	GSSVPFILPIP	GADKKGVTAPE	RDIKDIDTML	AASKQYKKA
AvinasA	AEYDRLLVAT	GSSPFILPIP	GKDLQGVIGY	RDIAIDTRAMM	ETARSHRHAL
BsunasB	LSYDKLIVAT	GSSPHILPIP	GADKKGVYGF	RTIEDCQALM	NMAQHFOKAA
	151				200
EconirB	VVGGGLLGLE	AAGALKNLGI	ETHVIEFAPM	LMAEQLDQMG	GEQLRRKIES
kpnnasB	VIGGGLLGLE	AANALKQLGL	ETHVVEFAPN	LMAVQLDNGG	AAMLREKISE
BsunasD	VIGGGLLGLE	AARGLLNLGM	DVSVIHLAPF	IMERQLDATA	GRLLQNELEK
AvinasA	VIGGGLLGLE	AANGLRLRGM	EVTVHLGDW	LLDXQLDRTA	GKLLQNAAGXT
BsunasB	<u>VIGAGLLGLE</u>	AAVGLQHLGM	DVSVIHHSAG	IMQKQLDQTA	ARLLQTELEQ
	201				250
EconirB	MGVRVHTSKN	TLEIVQEGVE	ARKTMRFADG	SELEVDFIVF	STGIRPRDKL
kpnnasB	LGVGVHTSKA	TTEIVRNEQG	LQ..LNFDRG	SSLATDMLVF	SAGIRPDAL
BsunasD	QGMTFLLEKQ	TEEIV..GDD	RVEGLRFKDG	TSIEADLVVM	AVGIRPNITL
AvinasA	XASKFRLNTN	TAALLDDGQG	RVASAHFSDG	EECPADLVVM	AAGIRPNVEL
BsunasB	KGLTFLLEKD	TVSI..SGAT	KADRIHFKDG	SSLKADLIVM	AAGVKNIEL
	251				300
EconirB	ATQCGLDVAP	RGGIVINDSC	QTSDDPIYAI	GECAWNNRV	FGLVAPGYKM
kpnnasB	ARSGGLSVGE	RGGICIDNQC	RTSDDPDLAI	GECAWENKI	YGLVAPGYQM
BsunasD	GAESGIPVNR	..GII VNDYM	QTEIPHIIYAV	GECAEHRGIA	YGLVAPLYEQ
AvinasA	AERAGLACDR	..GIRVDDYL	RADPAIYAV	GECAHRGIA	YGLVAPLFEQ
BsunasB	AVSAGIKVNR	..GII VNDFM	QTSEPNIIYAV	GECAEHNQTV	YGLVAPLYEQ
	301				350
EconirB	AQVAVDHILG	.SENAFEGAD	LSAKLKLGV	DVGGIGDAHG	RTPGARSYVY
KpnnasB	AARRAATLAG	.EAGSFGAD	MSTKLKLVG	DVASFGDAQG	RTPGCQSYQW
BsunasD	AKVLAKHMCG	IETKPYEGSV	LSTQLKVS	EVFSAGDFNE	.SEEKAIKV
AvinasA	ARVCADHLAR	LGNARYEGSV	TSTKLKVTGI	DLFSAGDFMG	.GEGTETITF
BsunasB	GKALASHICG	VPCEEYQGSA	PSAALKIAGI	DWSAGKIQE	.DERTTSIKI

Figura 7. Comparación de la proteína NASA de *A. vinelandii* con las proteínas más parecidas según el programa TFASTA, aplicando el programa de alineamiento de secuencias PILEUP (Feng y Dolittle, 1987). En rojo aparecen los residuos conservados en todas las proteínas y en azul los presentes en, por lo menos tres de ellas. Se encuentran subrayados los sitios conservados de unión al FAD (aa 10-15), al NAD(P)H (aa 152-157) y al sirohemo.

Análisis de la proteína NASA

	351				400
EconirB	LDESKEI <b>YKR</b>	LIVSEDNKTL	LGAVLVGDTS	DYGNLLQLVL	NAIELPENPD
KpnnasB	THGPQQ <b>VYKK</b>	IWVSADGKNL	LGGVLVGDAG	DYATLLQOML	NGMALPKHPE
BsunasD	FDEQDGI <b>YKK</b>	I VLRGNQ..I	VGAVLFGDSS	EGNRLFSMIQ	KEADISETSK
AvinasA	SDPIGG <b>VYRA</b>	GV.RTTA..G	RAAV.....	RTGWYFRQIR	EQHNVAEIRD
BsunasB	YDEQAG <b>VYKK</b>	ALFVDDK..L	R.VILFGDTR	DKQRLLDSSL	KQRDISIAKK
	401				450
EconirB	SLILPAHSGS	GKPSIG...V	DKLPDSAQ <b>IC</b>	S <b>CFDVTK</b> GD <b>L</b>	I <b>AAI</b> .NKACH
kpnnasB	SLILPALEGS	RPKALG...V	AALPDGAQ <b>IC</b>	S <b>CHNVK</b> KG <b>I</b>	CQ <b>AV</b> .SGGAG
BsunasD	ISILQ....P	LSQEAGTSIT	AAMSDEI <b>IC</b>	G <b>CNGVS</b> KGA <b>I</b>	IQA <b>IQEK</b> GCS
AvinasA	LIMFGENAIG	DAGHQGDKA	MAMSDMEV <b>C</b>	G <b>CNGVC</b> KG <b>I</b>	VKA <b>IRE</b> NGLL
BsunasB	QII.....	.EPETSGPLF	ESMPSSET <b>IC</b>	Q <b>CNTVT</b> KG <b>I</b>	ED <b>AVHT</b> NSLT
	451				500
EconirB	TVAAL <b>KAE</b> TK	AGTG <b>CGG</b> CI <b>P</b>	L <b>VTQVL</b> NAEL	AKQGIEV..N	NNL <b>CEH</b> FAYS
kpnnasB	DMAAI <b>KSR</b> TK	AATG <b>CGG</b> CSA	L <b>VKQV</b> MEYQL	AEQGVV..K	KDI <b>CEH</b> FPWS
BsunasD	STDEI <b>KAC</b> TG	ASR <b>SCGG</b> CK <b>P</b>	L <b>VVEI</b> LQHTL	GSDFDASAQK	EAI <b>CGC</b> TTL <b>S</b>
AvinasA	SVDE <b>VKKH</b> TK	AAS <b>SCG</b> SCAR	L <b>VEQI</b> LINTV	GGADVKKPSE	KPV <b>CGC</b> TDLN
BsunasB	TVE <b>EVKHC</b> TK	ATG <b>SCGG</b> CK <b>P</b>	L <b>VEDL</b> LRYMT	NSEYTKPAST	PSF <b>CS</b> CTD <b>FT</b>
	501				550
EconirB	RQELFHLIRV	EGIKTFEELL	AKHG..KGY <b>G</b>	CE <b>VCKP</b> TVGS	L <b>LASC</b> WNEYI
kpnnasB	RQEIYHLVRV	NHIRTFEQLI	ARYG..QGH <b>G</b>	CE <b>VCKP</b> LVAS	V <b>LASC</b> WNEYL
BsunasD	RDEVVEE IKA	KGLSHTRVEM	NVL <b>GWK</b> TPEG	CS <b>KCR</b> PALNY	Y <b>LGM</b> INPTKY
AvinasA	HGQVRQAIRE	QRLTGMGEAM	KAMEWRSPDG	CAT <b>CR</b> PALNY	Y <b>LIS</b> TWPGEA
BsunasB	EDDIIAELQR	RPFTNPAEVM	NQLD <b>WKT</b> KN <b>G</b>	C <b>STCV</b> PAIQY	Y <b>LEML</b> YPGFV
	551				600
EconirB	LKPEHTPLQD	SNDNFLANIQ	KDG <b>TYSV</b> IPR	SPG <b>GEIT</b> PEG	L <b>MAVGR</b> IARE
kpnnasB	LKPAHLPLQD	TNDRYFANIQ	KDG <b>TYSV</b> VPR	MAA <b>GEVT</b> PDG	L <b>IAIGQ</b> IAKR
BsunasD	EDDRTSRF..	VNERMHANIQ	KDG <b>TYSV</b> VPR	MY <b>GGV</b> TNS <b>TD</b>	L <b>RK</b> IADVVDK
AvinasA	KDDPQSRL..	INERAHANIQ	KDG <b>TYSV</b> VPR	MW <b>GGV</b> TS <b>PAE</b>	L <b>RR</b> IADVAEK
BsunasB	QPEPAT....	.....	.EE <b>TCIL</b> IPQ	MY <b>GGR</b> TNAEQ	L <b>RTIAN</b> IEA
	601				650
EconirB	FNL.YTKI <b>TG</b>	SQRLAMF <b>GAQ</b>	KDDL <b>PEI</b> WRQ	LIEAG <b>FET</b> GH	AYAKAL <b>RMAK</b>
KpnnasB	YQL.YSKV <b>TG</b>	GQRIDLF <b>GAR</b>	LEQL <b>PAI</b> WRE	LAEAG <b>FET</b> GH	AYGKSL <b>RTVK</b>
BsunasD	YEIPLVKM <b>TG</b>	GQRIDLI <b>GVK</b>	KEDLP <b>KV</b> WED	LDMPS... <b>GY</b>	AYGRTL <b>RTVK</b>
AvinasA	YKVP <b>PMKV</b> TG	GQRIDLL <b>GVK</b>	KEDLP <b>NV</b> WRE	LGMPS... <b>GH</b>	AYGKSI <b>RTVK</b>
BsunasB	YSIP <b>DSI</b> TH	GQRLKLS <b>GIK</b>	PADLP <b>NM</b> KKD	L <b>KMPV</b> ..TN	EHRHAL <b>QSIK</b>
	651				700
EconirB	<b>TCV</b> GSTWCRY	GVGDSVGLGV	E <b>LEN</b> RYK <b>GIR</b>	T <b>PHK</b> M <b>KFG</b> VS	G <b>CTRE</b> C <b>SEAQ</b>
KpnnasB	<b>SCV</b> GSTWCRY	GVQDSTGLAV	T <b>LEH</b> RYK <b>GLR</b>	A <b>PHK</b> I <b>KMA</b> VS	G <b>CTRE</b> C <b>AEAQ</b>
BsunasD	<b>TCV</b> GEQFCRF	GTQDSMALGI	A <b>LEK</b> K <b>FEL</b> GN	T <b>PHK</b> V <b>KMA</b> VS	A <b>CPRN</b> C <b>AESG</b>
AvinasA	<b>TCV</b> GSEFCRF	GTQNSTOMGI	D <b>LEH</b> AL <b>FG</b> MW	S <b>PHK</b> V <b>KLA</b> VS	G <b>CPRN</b> C <b>AESG</b>
BsunasB	A <b>CTC</b> GQ....	.NRSIQQLAA	QI <b>ERQ</b> LEMLP	L <b>PAPIS</b> ISLS	. <b>CETD</b> C <b>TEAA</b>

Figura 7 (cont.). Comparación de la proteína NASA de *A. vinelandii* con las proteínas más parecidas según el programa TFASTA, aplicando el programa de alineamiento de secuencias PILEUP (Feng y Dolittle, 1987). En rojo aparecen los aminoácidos conservados en todas las secuencias y en azul los presentes en, por lo menos, tres de ellas.

## Análisis de la proteína NASA

	701				750
EconirB	GKDVGI IATE	KGNLYVCGN	GGMKPRHADL	LAADIDRETL	IKYLDRFMMF
KpnnasB	GKDIGVIATE	KGNLYVCGN	GGMKPRHADL	FASDLDEATL	IRSIDRLIMF
BsunasD	IKDLGVGID	GGWELYVGN	GGPHLRAGDL	LMKVKTNEEV	LEYAGAYLOY
AvinasA	IKDVGIVGVD	SGWEIYIGGN	GGIKTEAGEF	FVKVGSAGEV	MEYSLAFLQL
BsunasB	LQDVGAIRTQ	AGWDIHIGGV	RGTHARSGAL	FCVTENEDST	AGMIKGLIQY
	751				800
EconirB	YIRTADKLTR	TAPWLENLEG	GIDYLKAVII	DDKLGLNAHL	EEEMARLREA
KpnnasB	YIRTADRLQR	TSTWMDNLEG	GVDYLREMIL	EDSLGIGEEEL	EQEMARVVES
BsunasD	YRETANYLER	TSAWLERV..	GLSHV.QSVL	NDP.EKRQEL	NGRMNETLSV
AvinasA	YREEAFYLER	TVHYLHRV..	GLEHIRQAVL	EDG.ERRKAL	HQRLLFALSF
BsunasB	YRETDHYLEG	VHQWIDRL..	GIVHIRVFLF	EE..DLRAQL	LESLOTDLSL
	801				850
EconirB	VLCEWPE TVN	TPSAQTRFKH	FINSDKRDPN	VQMPEREQH	R.....
KpnnasB	YQCEWQTLN	DPQRLALFRS	YVNSDEPDET	VQRQTLRGQP	QLAPFAAQGE
BsunasD	HKDPWKDFLE	DKQTSKEL..	.....FENV	VITS.....	.....
AvinasA	EQDPWQQQIG	NPALKKEFAP	ATNPQRIERG	ISMNWLIDICA	LDEINVLGAR
BsunasB	IQNP...TVE	TGAYKKG...	.....	.....	.....
	851				900
EconirB	PATPMNVSQ.	.....	.....	.....	.....
KpnnasB	PALPSRPWQA	ICDLDAIPOQ	AGIGARLGER	QIALFRFGDQ	VYALDNLEPG
BsunasD	.....	.....	.....	.....	.....
AvinasA	IVAGPRGDIA	IFRTARDEVF	ALDDRCPHKG	GPLSQGLIYG	KRVACPLHNW
BsunasB	.....	.....	.....	.....	.....
	901				950
EconirB	.....	.....	.....	.....	.....
KpnnasB	SEANVLSRGL	LG DAGGEP IV	ISPLYKQRIR	LRDGRQCDGG	EQAVRAWPVK
BsunasD	.....	.....	.....	.....	.....
AvinasA	QIDLESGEAL	EPDVGCSHKY	PVKIEGGRVL	LALKSLKDCA	.....
BsunasB	.....	.....	.....	.....	.....
	951		970		
EconirB	.....	.....	.....	.....	.....
KpnnasB	VENGKVWVGN	QQLLARA EAS	.....	.....	.....
BsunasD	.....	.....	.....	.....	.....
AvinasA	.....	.....	.....	.....	.....
BsunasB	.....	.....	.....	.....	.....

**Figura 7 (cont.).** Comparación de la proteína NASA de *A. vinelandii* con las proteínas más parecidas según el programa TFASTA, aplicando el programa de alineamiento de secuencias PIEUP (Feng y Dolittle, 1987). En rojo aparecen los residuos conservados en todas las proteínas y en azul los presentes en, por lo menos, tres de ellas.

### 3. 1. 3. Análisis de la proteína NASB

La segunda ORF completa del fragmento *Eco47III-SphI* corresponde al gen *nasB* que codifica la apoenzima de la nitrato reductasa denominada NASB. Está compuesta por 900 aminoácidos, tiene un pI de 7.19 y un peso molecular de 97.351 Da. La comparación con las secuencias de aminoácidos encontradas en los bancos de datos disponibles, utilizándose el programa TFASTA (Pearson y Lipman, 1988), mostró una gran similitud con las proteínas NASA de *K. pneumoniae* M5a1 (Lin *et al.*, 1993) y *narB* de *Synechococcus sp.*PCC7942 (Andriessse *et al.*, 1990). En la tabla IV se muestran los porcentajes de similitud e identidad obtenidos mediante el programa BESTFIT de alineamiento de secuencias (Smith y Waterman, 1981).

**Tabla IV.** Proteínas de mayor semejanza a NASB de *A. vinelandii* según el programa TFASTA. Se indica el porcentaje de similitud, de identidad y el solapamiento, según el programa BESTFIT de alineamiento de secuencias (Smith y Waterman, 1981)

PROTEINA	PROCEDENCIA	% SIMILITUD	% IDENTIDAD	HUECOS	SOLAPAMIENTO
NARB	<i>Synechococcus</i> <i>sp</i> PCC 7942	61.6	43.69	8	727aa
NASA	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	57.63	36.09	18	909aa

La proteína NASA corresponde a la nitrato reductasa asimilatoria de *K. pneumoniae* (Lin *et al.*, 1993). Está constituida por 861 aminoácidos y tiene un peso molecular de 92 KDa. El gen *nasA* que la codifica forma parte junto con los genes *nasFEDCB* del operón *nasFEDCBA* que contiene todos los componentes del sistema de asimilación de nitrato (Lin *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994). Las proteínas NASF, NASE y NASD han mostrado una gran homología con las proteínas NRTA, NRTB y NRTD, respectivamente. Estas

últimas están implicadas en el transporte de nitrato en la cianobacteria *Synechococcus sp* (Omata *et al.*, 1993). La proteína NASC probablemente está implicada en la transferencia de electrones a la nitrato reductasa mientras que *nasB* es el gen estructural de la nitrito reductasa (Lin *et al.*, 1993, 1994).

La proteína NARB corresponde a la nitrato reductasa asimilatoria de la cianobacteria *Synechococcus sp* PCC7942. Esta proteína está constituida por 729 aminoácidos y tiene un peso molecular de 79.871 Da. El gen *narB* que la codifica junto con *nirA*, gen estructural de la nitrito reductasa (Suzuki *et al.*, 1993) y *nrtABCD*, genes estructurales de los componentes del sistema de transporte de nitrato (Omata, 1991; Omata *et al.*, 1993) forman parte del mismo operón *nirA-nrtABCD-narB* (Suzuki *et al.*, 1993; Omata *et al.*, 1995).

En la figura 8 se muestra el alineamiento de la proteína NASB de *A. vinelandii* con NARB de *Synechococcus sp*.PCC7942 y NASA de *Klebsiella pneumoniae*, aplicando el programa PILEUP de alineamiento de secuencias (Feng y Doolittle, 1987).



	1					50
AvinasB	.....	...MAHQTTA	STCCYCGVGC	GV.....	.....	LIEHDG
SysnarB	MFDLSKFLPV	ITPLMIDTAK	TLCPYCGVGC	GLEAVPPAQP	GRATVRDREG	
KpnnasA	.....	.....MTETR	TTCPYCGVGC	GV.....	.....	IASRAP
	51					100
AvinasB	EQITGVAGDP	AHPANHGRLC	SKGSTLHLTG	DLAPARSI PN	LRS GKALPRD	
SysnarB	TPIWQIRGDR	QHPSSQGMVC	VKGATVAESV	SKSRLK.YPM	FRASLDDPFT	
KpnnasA	HGQVSVRGDE	QHPANFGRLC	VKGAAALGETV	GLEGRMLF PE	VDG.....E	
	101					150
AvinasB	RTDWDNALDH	AAAVFAETIR	EHGPDVAFY	ISGQLLTEDY	YAFNKLARAL	
SysnarB	EISWDEALDR	LCDRIQQTQA	DYKDGICFY	GSGQFQTEDY	YIAQKLVKGC	
KpnnasA	RATWPQAGGG	RFAPAGDYRS	ARGQAVR..F	TSGQLLTEDY	YAANKLMKGF	
	151					200
AvinasB	VGTNNIDNS	RLCMSSAVVG	YKRS LGADAP	PCAYEDVEQS	HCLLIAGSNM	
SysnarB	LGTNNFDTNS	RLCMSSAVSA	YSLCLGSDGP	PACYEDLDLA	DCLLIVGSNT	
KpnnasA	IGAANIDTNS	RLCMSSAVTG	YKRARWGTVV	PCSYEDVENS	DLVVLVGSNA	
	201					250
AvinasB	AYAHPVLFRR	LEAAKARRPE	MKIIVVDPRR	TDTCELADLH	LAILPGTDVA	
SysnarB	AECHPILFNR	YR.KRHKQGG	TNLIVVDPRC	TPTAEVADLH	LALKPGSDVA	
KpnnasA	AWAHPVLYQR	LAQAKRDNPQ	MRVVVIDPRR	TATCDIADRH	LALAPGSDGG	
	251					300
AvinasB	LFHGILHILL	WEGWIDRAWI	EAHTEGFDEL	KKLVRDYSPA	AVADICGISV	
SysnarB	LLNGLGWLLY	QMGYVKKDFI	ANQTEGFEDW	LAIIEDYPPQ	RTAELTGLAV	
KpnnasA	LFVGLLNAIA	ASRRISDDFN	DAQRA.....	LITIAQDWDLD	KVAQFCGLPR	
	301					350
AvinasB	GSLQTCAE LI	GKAPSFLSLW	CMGLNQSTSG	SAKNSALINL	HLATGQIGKP	
SysnarB	AELVRAADLI	ASAQRWLSLW	SMGVNQSIQG	TAKATSLINL	HLLTRQIGLP	
KpnnasA	QQIADFYREF	IAAPRAITLY	TMGINQSASG	SDKCNAINV	HLACGKYGRP	
	351					400
AvinasB	GAGPFSLTGQ	PNAMGGRETG	SLANLLPGHR	EAGNAGHRAE	VADYW..RID	
SysnarB	GCGPFSLTGQ	PNAMGGRETG	GLAHL LPGYR	KVIDPQHRAD	VETIWGLPMG	
KpnnasA	GCGPFSLTGQ	PNAMGGREVG	GLATMLAAHM	NFEPDDLRRP	A...RFWGSE	
	401					450
AvinasB	ALPESTGLTA	IELFEAVRIG	RIKALWIAC T	NPAQSLPDQQ	KIHEALAACP	
SysnarB	SISPOPGRTA	WQMI EGLEQG	AVGFLWVAAT	NPAVSLPDVK	RAQAALKRSP	
KpnnasA	RLAQTGGLTG	LELFAAIGRG	EVKAVWIMGT	NAMVSLPGTS	HAVTEPWPVS	
	451					500
AvinasB	FVVWQEAYAT	TETCRYADLL	LPAAA.DEKE	GMVTNSERRL	SHVRRAVPAP	
SysnarB	FTVLQDAYHP	TETTTYAHLL	LPAAQWS EKT	GTMNSERRV	TLCQAFRQPP	
KpnnasA	LVIISDV.AD	TD TGRFAHIR	F PALAWGEKS	GTVTNSERRI	SLQRAFMPPP	
	501					550
AvinasB	GEARADWAIV	CDFARRLEKH	LRPGRPSLFE	FADPAALFDE	YKQLTAGRDL	
SysnarB	GEARADWQIF	AEVGRRLG..	.....FAFD	YTDAAAVFAE	YVQVTAGRLC	
KpnnasA	GEARAA.GGL	SPAGRGLASA	LPGSIRT..R	CSANTPRFQG	MKTMASGRLL	

Figura 8. Comparación de la proteínas NASB de *A. vinelandii* con las proteínas más parecidas según el programa TFASTA, aplicando el programa de alineamiento de secuencias PILEUP (Fenf y Dolittle, 1987). En rojo aparecen los residuos conservados en todas las proteínas y en azul los presentes en dos de ellas.

Análisis de la proteína NASB

	551				600
AvinasB	DL.SGL <b>S</b> HAL	IDEL <b>G</b> PQ <b>Q</b> WP	FPT <b>G</b> AS <b>A</b> ARH	ACMPMEYSPP	PAAVPTSMPI
SysnarB	DL.SGL <b>S</b> HEL	LAQ <b>A</b> G <b>P</b> Q <b>Q</b> WP	FP <b>A</b> GA <b>E</b> PTTE	.SKRLYTK <b>H</b> H	FAYADGRARF
KpnnaSA	SADWRI <b>S</b> AAT	WIALE <b>P</b> VR <b>W</b> P	VSRSEAA...	.....WSV <b>H</b> K	GWHRD <b>G</b> KL <b>R</b> M
	601				650
AvinasB	RTGRRRK <b>G</b> AK	RA...IHL <b>L</b> L	NT <b>G</b> RLRD <b>Q</b> WH	GMS <b>R</b> T <b>G</b> ..TV	ARLFG <b>H</b> VE <b>E</b> A
SysnarB	QPFHHL <b>G</b> V <b>A</b> E	PPDDRYPL <b>V</b> L	TV <b>G</b> RLYP <b>D</b> WH	TQT <b>R</b> T <b>G</b> ..RI	DKINKL <b>H</b> PS <b>A</b>
KpnnaSA	V <b>P</b> VAPQ <b>P</b> TRA	TTVASIA <b>I</b> LN	AD <b>P</b> Q <b>Q</b> RAD <b>P</b> R	S <b>M</b> A <b>H</b> H <b>D</b> PH <b>P</b> A	V <b>R</b> LM <b>Q</b> H <b>I</b> NE <b>P</b>
	651				700
AvinasB	V <b>L</b> GL <b>H</b> P <b>D</b> ELR	RRRI <b>A</b> G <b>D</b> LA	RL <b>R</b> SRR <b>G</b> SLI	L <b>P</b> VQ <b>A</b> DESIR	<b>P</b> Q <b>A</b> FL <b>P</b> M <b>H</b> W
SysnarB	F <b>V</b> E <b>I</b> H <b>P</b> RDAD	R <b>Y</b> NI <b>S</b> E <b>G</b> QAV	VI <b>R</b> SRR <b>G</b> E <b>G</b> C	F <b>P</b> AKVTT <b>A</b> IS	<b>P</b> G <b>V</b> LF <b>V</b> P <b>M</b> H <b>W</b>
KpnnaSA	V <b>V</b> EV <b>P</b> <b>P</b> A <b>E</b> PQ	R <b>Y</b> HL <b>L</b> E <b>G</b> E <b>L</b> A	R <b>V</b> R <b>S</b> PK <b>G</b> VMV	AKVT <b>I</b> GE <b>A</b> NG	<b>P</b> G <b>S</b> LF <b>V</b> P <b>M</b> H <b>W</b>
	701				750
AvinasB	<b>G</b> DRFLK <b>G</b> L <b>G</b> T	N <b>V</b> L <b>T</b> L <b>P</b> AC <b>D</b> P	L <b>S</b> K <b>Q</b> PE <b>L</b> KHA	<b>G</b> VE <b>V</b> E <b>K</b> VELP	<b>W</b> OLFAL <b>V</b> E <b>G</b> D
SysnarB	<b>G</b> AL <b>W</b> GDR <b>T</b> E <b>A</b>	N <b>A</b> L <b>T</b> H <b>P</b> A <b>A</b> C <b>P</b>	I <b>S</b> GE <b>P</b> E <b>L</b> K <b>A</b> C	<b>A</b> V <b>Q</b> I <b>E</b> AAS <b>T</b>	FTI.....
KpnnaSA	NN <b>Q</b> FAR <b>Q</b> GRV	NN <b>L</b> LA <b>A</b> V <b>T</b> D <b>P</b>	H <b>S</b> Q <b>Q</b> P <b>E</b> S <b>K</b> Q <b>T</b>	<b>A</b> V <b>A</b> I <b>A</b> T <b>W</b> L <b>P</b> A	<b>W</b> K <b>G</b> E <b>L</b> F <b>S</b> R <b>Q</b> P
	751				800
AvinasB	V <b>Q</b> QR <b>F</b> AELRP	LLD <b>G</b> F <b>A</b> YASL	TL <b>A</b> GRER <b>P</b> AL	LVKAASAV <b>P</b> P	ESGL <b>L</b> ARIDV
SysnarB	.....	.....	.....	.....	.....
KpnnaSA	V <b>P</b> LPCR <b>C</b> TGG	G <b>R</b> PR <b>A</b> LS <b>I</b> F	R <b>W</b> P <b>G</b> D <b>T</b> PSRD	WLVE <b>W</b> C <b>Q</b> R <b>Q</b> G	W <b>Q</b> M <b>Q</b> V <b>A</b> E <b>G</b> G <b>K</b>
	801				850
AvinasB	LL <b>G</b> L <b>D</b> E <b>G</b> PIL	AYDD <b>P</b> GR <b>S</b> VG	K <b>R</b> VR <b>I</b> EN <b>G</b> R <b>I</b>	T <b>A</b> LRL <b>A</b> GE <b>T</b> A	<b>A</b> RD <b>W</b> L <b>K</b> AL <b>W</b> N
SysnarB	.....	.....	.....	.....	.....
KpnnaSA	V <b>W</b> N <b>L</b> LA <b>W</b> RAG	EL <b>M</b> L <b>G</b> W <b>W</b> SDA	SE <b>P</b> A <b>I</b> SAS <b>W</b> I	H <b>A</b> R <b>F</b> V <b>P</b> P <b>Q</b> NA	<b>A</b> RA <b>H</b> .....
	851				900
AvinasB	EG <b>R</b> T <b>D</b> AELRR	W <b>M</b> L <b>A</b> P <b>L</b> G <b>G</b> PL	<b>G</b> SD <b>G</b> A <b>I</b> K <b>D</b> R <b>T</b>	V <b>C</b> S <b>C</b> M <b>N</b> V <b>G</b> E <b>A</b>	<b>A</b> IR <b>A</b> G <b>I</b> ER <b>G</b> L
SysnarB	.....	.....	.....	.....	.....
KpnnaSA	.....	... <b>A</b> L <b>S</b> GR <b>K</b>	<b>G</b> G <b>V</b> EM <b>P</b> R <b>G</b> R <b>I</b>	<b>I</b> C <b>S</b> C <b>F</b> S <b>V</b> G <b>E</b> A	<b>A</b> I <b>G</b> E <b>A</b> I <b>A</b> G <b>G</b> C
	901			937	
AvinasB	DL <b>D</b> <b>G</b> ..L <b>K</b> Q <b>E</b>	L <b>G</b> C <b>G</b> T <b>G</b> C <b>G</b> S <b>C</b>	V <b>P</b> E <b>I</b> R <b>R</b> L <b>L</b> AR	P <b>M</b> T <b>A</b> N <b>S</b>	
SysnarB	.....	.....	.....	.....	
KpnnaSA	R <b>S</b> P <b>G</b> R <b>L</b> G <b>G</b> K	L <b>K</b> C <b>G</b> T <b>N</b> C <b>G</b> S <b>C</b>	<b>I</b> P <b>E</b> L <b>K</b> AL <b>L</b> AA	N <b>V</b> A <b>Q</b> A	

Figura 8 (cont.). Comparación de la proteína NASB de *A. vinelandii* con las proteínas más parecidas según el programa TFASTA, aplicando el programa de alineamiento de secuencias PILEUP (Feng y Dolittle, 1987). En rojo aparecen los aminoácidos conservados en todas las proteínas y en azul los presentes en dos de ellas.

## 3. 1. 4. Análisis de la cuarta ORF

Se ha comparado la secuencia de aminoácidos de la cuarta fase de lectura abierta con las encontradas en los bancos de datos disponibles, utilizándose el programa TFASTA (Pearson y Lipman, 1988). Se ha obtenido una gran similitud con los productos de los genes *cysG* de *E coli* (Peakman *et al.*, 1990a), *cysG* de *S. typhimurium* (Wu Jer-Y *et al.*, 1991), *cobA* de *P. fluorescens* (De Mot R *et al.*, 1994) y *cobA* de *P. denitrificans* (Crouzet *et al.*, 1990). En la tabla V se muestran los porcentajes de similitud e identidad obtenidos mediante el programa BESTFIT de alineamiento de secuencias (Smith y Waterman, 1981).

**Tabla V.** Proteínas de mayor semejanza a la cuarta ORF según el programa TFASTA. Se indica el porcentaje de similitud, de identidad y el solapamiento, según el programa BESTFIT de alineamiento de secuencias (Smith y Waterman, 1981).

PROTEINA	PROCEDENCIA	% SIMILITUD	% IDENTIDAD	HUECOS	SOLAPAMIENTO
COBA	<i>P. fluorescens</i>	85.71	78.4	2	171aa
CYSG	<i>E. coli</i>	68.39	46.1	2	165aa
COBA	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	65.45	45.3	4	172aa
CYSG	<i>Salmonella typhimurium</i>	64.67	45.1	2	165aa

El gen *cobA* de *P denitrificans* es el gen estructural de la S-adenosilo-L-metionina (SAM): uroporfirinógenoIII metiltransfe-rasa (SUMT), que cataliza la transferencia de dos grupos metilos de la SAM al urógeno III en las posiciones C-2 y C-7, dando como producto final la precorrina-2, un intermediario común de la síntesis de corrinoïdes, sirohemo y F430 (Gilles *et*

*al.*, 1983; Leeper, 1989). Forma parte junto con los genes *cobB*, *cobC* y *cobD* una agrupación génica implicada en la biosíntesis de la cobalamina (Crouzet *et al.*, 1990). Los homólogos de *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* también se han aislado y secuenciado (De Mot R *et al.*, 1994). COBA es un dímero formado por dos subunidades de 29.000 Da de PM (Blanche *et al.*, 1989). Presenta más de un 40% de identidad con la proteína CYSG de *E. coli* (Peakman *et al.*, 1990). Esta homología se extiende a todo lo largo de la secuencia de COBA y a los 200 últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal de CYSG. Esta última proteína tiene un peso molecular de 49.000 Da e interviene en la síntesis de la cobalamina y del sirohemo. Cataliza la transferencia de los grupos metilo al urógenoIII para la síntesis de la precorrina-2 y la oxidación y posterior quelación del hierro que transforma la precorrina-2 en sirohemo (Crouzet *et al.*, 1990). *cysG* forma parte del operón *nir* de *E. coli* que incluye los genes *nirBDEC-cysG* implicados en la reducción anaeróbica de nitrito por la NADH-nitrito reductasa citoplásmica (Peakman *et al.*, 1990b; Harborne *et al.*, 1992). Una agrupación similar (*nasABCDEF*) se ha descrito en la bacteria Gram-positiva *B. subtilis*, pero en este caso el homólogo de *cysG*, *nasF*, va asociado a los genes estructurales de la nitrato reductasa (*nasC*) y la nitrito reductasa (*nasD* y *nasE*) asimilatorias (Ogawa *et al.*, 1995).

Puesto que la cuarta ORF incompleta presenta homología con genes implicados en la síntesis del cofactor de la nitrito reductasa, y en nuestro caso se trata de una nitrito reductasa asimilatoria, la denominaremos a partir de ahora *nasH*.

En la figura 9 se muestra el alineamiento de los aminoácidos que se deducen de la secuencia del gen *nasH* de *A. vinelandii* con las proteínas que aparecen en la tabla V. Como se observa, la homología se extiende a todo lo largo de los genes *cobA* de *Pseudomonas* y a partir del aminoácido 210 de los genes *cysG* de *E. coli* y *S. typhimurium*.

	1				50
EcocysG	MDHLP	IFCQL	RDRDCLIVGG	GDVAEPKARL	LLDAGARLTV NALAFIPQFT
StycysG	VDHLP	IFCQL	RDRDCLIVGG	GDVAERKARL	LLEAGARLTV NALTFIPQFT
AvinasH	.....	.....	.....	.....	.....
Psfcoba	.....	.....	.....	.....	.....
Psdcoba	.....	.....	.....	.....	.....
	51				100
EcccysG	AWADAGMLTL	VEGPFDESLL	DT CWLAIAAT	DDDALNQRVR	QAAEARRIFC
StycysG	VWANE GMLTL	VEGPFDETL	DSCWLAIAAT	DDDTV NQRVS	DAAESRRIFC
AvinasH	.....	.....	.....	.....	.....
Psfcoba	.....	.....	.....	.....	.....
Psdcoba	.....	.....	.....	.....	.....
	101				150
EcocysG	NVVDAPKAAS	FIMPSIIDRS	PLMVAVSSGG	TSPV LARLLR	EKLESLLPLH
StycysG	NVVDAPKAAS	FIMPSIIDRS	PLMVAVSSGG	TSPV LARLLR	EKLESLLPQH
AvinasH	.....	.....	.....	.....	.....
Psfcoba	.....	.....	.....	.....	.....
Psdcoba	.....	.....	.....	.....	.....
	151				200
EcocysG	LGQVAK YAGO	LRGRVKQ QFA	TMGERRRFE	KL FVNDRLAQ	SLANNDQKAI
StycysG	LGQVAR YAGO	LRARVKK QFA	TMGERRRFE	KF FVNDRLAQ	SLANA DE KAV
AvinasH	.....	.....	.....	.....	.....
Psfcoba	.....	.....	.....	.....	.....
Psdcoba	.....	.....	.....	.....	.....
	201				250
EcocysG	TETTEQLINE	PLDHRGE VWL	VGAGPGDAGL	LTLKGLQQIQ	QADV VVY DRL
StycysG	NATTERLFSE	PLDHRGE VWL	VGAGPGDAGL	LTLKGLQQIQ	QADI VVY DRL
AvinasH	.....	...MSAK VWL	I GAGPGDPEL	LTLKAVRALG	EAEV VLI DDL
Psfcoba	.....	...MSAK VWL	VGAGPGDPEL	LTLKAVRALH	AADV VLI DDL
Psdcoba	.MIDDLFAGL	PALEKGS VWL	VGAGPGDPGL	LTLHAANALR	QADVI VH DAL
	251				300
EcocysG	VSDDIMNLVR	RDADRV FVGK	RAGYHCVQE	E INQI LLREA	QKGKRVVR..
StycysG	VSDDIMNLVR	RDADRV FVGK	RAGYHCVQE	E INQI LLREA	QKGKRVVR..
AvinasH	VNPAVLEHC.	PQARVIGVGK	RGGCRSTPQD	F IHRMLLRYA	RQGKCVAR..
Psfcoba	VNPRVLEHC.	PDARVITVGK	RGGCRSTPQD	F IHRMLL..A	MRAKANAWCD
Psdcoba	VNE DCLKLAR	PGAVLE FAGK	RGGKPSPKQR	D ISLRLVELA	RAGNRVLR..
	301				350
EcocysG	LKGGDPFIFG	RGGEEL TLC	NAGIPFSVVP	GITAASGCSA	YSGIPLTHR D
StycysG	LKGGDPFIFG	RGGEEL TLC	HAGIPFSVVP	GITAASGCSA	YSGIPLTHR D
AvinasH	LKGGDPC IFG	RGS EEADWLA	SHGIATEI VN	GITAGLAGAT	QCGIPLTLRG
Psfcoba	IRAAT PC IFG	RGGEELWLR	ERGVEVEL VN	GITAGLAGAT	NCDIPLTLRG
Psdcoba	LKGGDPFV FG	RGGEEL TLV	EHQV PFRI VP	GITAGI GGLA	YAGI PVTHRE

Figura 9. Comparación de los nucleótidos que se deducen de la secuencia del gen *nasH* de *A. vinelandii* con las proteínas más parecidas según el programa TFASTA, aplicando el programa de alineamiento de secuencias PILEUP (Feng y Dolittle, 1987). En rojo aparecen los aminoácidos conservados en todas las proteínas, en azul los presentes en, por lo menos, tres de ellas y en letra verde los residuos conservados en el extremo N-termina de las proteínas CYSG de *E. coli* y *S. typhimurium*.

	351				400
EcocysG	YAQSVRLI <b>TG</b>	HLKTG...GE	LDWENL <b>LAEK</b>	QTLV <b>FYMGLN</b>	QAATIQQKLI
StycysG	YAQSVRLV <b>TG</b>	HLKTG...GE	LDWENL <b>LAEK</b>	QTLV <b>FYMGLN</b>	QAATIQEKLI
AvinasH	VARGV <b>TLVTA</b>	HTQDD...SS	LN <b>WQAL</b> ARSG	T <b>TLVW</b> YMGVA	SWPRYAMACW
Psfcoba	VSRGV <b>TLVTA</b>	HTQDD...SS	LN <b>WRAL</b> AEGG	T <b>TLVW</b> YMGVA	KLEEIRQQLL
Psdcoba	VNHA <b>VTFLTG</b>	HDSSGLVPDR	IN <b>WQGI</b> ASGS	PVI <b>VMY</b> MAMK	HIGAITANLI
	401				450
EcocysG	EH <b>GMPG</b> EMPV	AI <b>VENGT</b> AVT	QRVIDG <b>TLTQ</b>	LGEL <b>AQ..QM</b>	N <b>SPSLII</b> IIGR
StycysG	AF <b>GMQAD</b> MPV	AL <b>VENGT</b> SVK	QRV <b>VHGV</b> L <b>TQ</b>	LGEL <b>AQ..QV</b>	E <b>SPALI</b> IIVGR
AvinasH	QAAC.....	.....	.....	.....	.....
Psfcoba	EGAMA <b>ADTPV</b>	AM <b>IENAS</b> LPQ	QR <b>ECRS</b> TLAH	M <b>HTDAQ</b> VFAL	K <b>SPAIL</b> VI <b>GS</b>
Psdcoba	AGGR <b>SPDEPV</b>	AF <b>VCNA</b> ATPQ	QA <b>VLET</b> TLAR	AEAD <b>VAAAGL</b>	EP <b>PAIV</b> VVGE
	451				484
EcocysG	V <b>VGLRD</b> KLNW	FSNH.....	.....	.....	.....
StycysG	V <b>VALRD</b> KLNW	FSNH.....	.....	.....	.....
AvinasH	.....	.....	.....	.....	.....
Psfcoba	VAGAGQAASI	TVSASA...	.....	.....	.....
Psdcoba	V <b>VRLRA</b> ALDW	IGALDGRKLA	ADPFANRILR	NPA.	.....

**Figura 9 (cont.).** Comparación de los aminoácidos deducidos de la secuencia del gen *nasH* de *A. vinelandii* con las proteínas más parecidas según el programa TFASTA, aplicando el programa de alineamiento de secuencias PILEUP (Feng y Dolittle, 1987). En rojo aparecen los residuos conservados en todas las proteínas y en azul los presentes en, por lo menos, tres de ellas.

### 3. 2. Función del gen *nasH* de *A. vinelandii*

Como hemos visto en el párrafo anterior, la secuencia de aminoácidos resultante de traducir la secuencia del fragmento de 554 pb del gen *nasH* de *A. vinelandii*, ha mostrado una gran homología con los productos de los genes *cysG* de *E. coli* (Peakman *et al.*, 1990), *cysG* de *S. typhimurium* (Wu Jer-Y *et al.*, 1991), *cobA* de *P. denitrificans* (Crouzet *et al.*, 1990) y *cobA* de *P. fluorescens* (De Mot R. *et al.*, 1994). Aunque la proteína de *Azotobacter* por su tamaño se parece más a COBA de *Pseudomonas* que a CYSG de las enterobacterias, su localización cromosómica (en el mismo operón que el gen estructural de la nitrito reductasa, o en todo caso muy cerca) se parece más a la localización de *cysG* de enterobacterias que a la de *cobA*. Por tanto, la hipótesis de que *nasH* estuviera implicado en la biosíntesis del sirohemo parecía razonable.

Para probar esta hipótesis construimos un mutante en *nasH* y medimos su actividad nitrito reductasa. Hemos partido del plásmido pPNS2KIXX que tiene insertado el cassette KIXX (que presenta el gen de resistencia a kanamicina) en el punto *XhoI* del gen *nasH*. Este plásmido se transfirió a la estirpe silvestre UW136 seleccionando colonias resistentes a kanamicina. Puesto que este plásmido no puede replicarse en *A. vinelandii* la única forma de obtener resistencia al antibiótico es que se produzca un doble hecho de recombinación entre los fragmentos cromosómicos y plasmídicos del gen *nasH*. El mutante se analizó mediante Southern para comprobar que el cassette de kanamicina se había insertado en el fragmento cromosómico deseado. En la figura 10 se muestra la estrategia de la construcción del plásmido pPNS2KIXX.

En la tabla VI se muestran las actividades nitrato- y nitrito-reductasa de la estirpe AS513 que tiene insertado el cassette KIXX en el punto *XhoI* del gen *nasH*. Esta estirpe presenta un nivel basal de actividad nitrito reductasa, el mismo que el de la estirpe silvestre UW136 crecida fijando nitrógeno atmosférico o el de la estirpe AS270 que tiene Tn5 insertado en el gen *nasA*. Los resultados muestran que *nasH* es necesario para la actividad nitrito

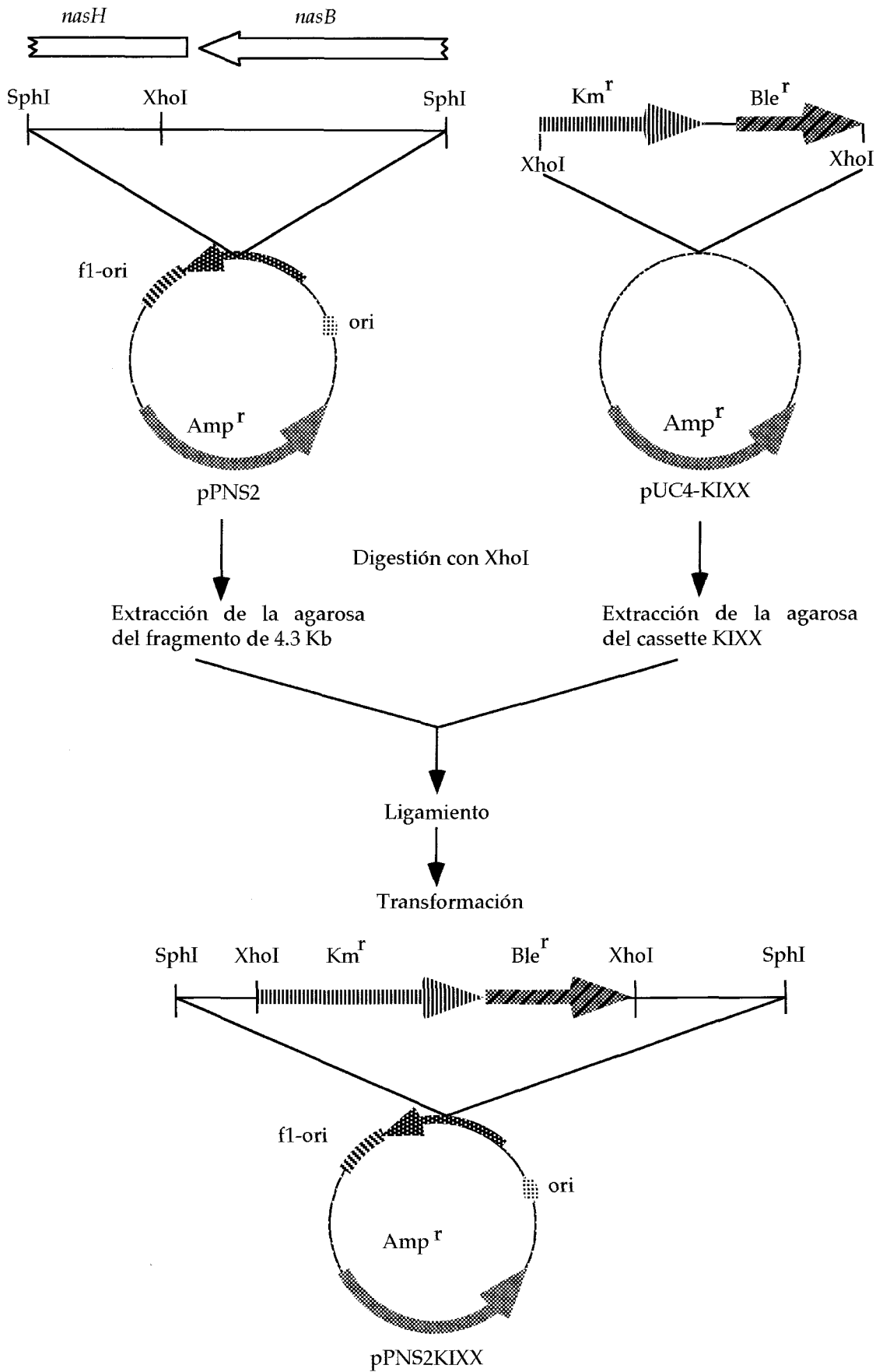


Figura 10. Construcción del plásmido pPNS2KIXX



reductasa y probablemente la estirpe AS513 esté afectada en la síntesis del sirohemo. Los valores de la actividad nitrato reductasa de la estirpe AS513 son algo más bajos que los de la estirpe silvestre UW136 y los de la estirpe AS270, esto podría explicarse porque el promotor de la kanamicina del cassette KIXX, que apunta hacia *nasAB*, dificulta la transcripción del gen *nasB* que se hace en la dirección contraria.

**Tabla VI.** Actividad nitrato y nitrito reductasa de las estirpes UW136, AS270 y AS 513.

Estirpe	NAS	NIS
UW136 N <sub>2</sub>	0.81	7.88
UW136 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10.76	31.22
AS270 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	12.16	9.16
AS513 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6.69	8.84

Las actividades se expresan en nanomoles de nitrito producido o consumido por miligramo de proteína y por minuto. Los ensayos se hicieron a partir de inóculos que crecieron en presencia de amonio y se pasaron a medio con nitrato o en condiciones de fijación de nitrógeno, cultivándose durante 15 horas.

### 3. 3. Mutagénesis dirigida en el gen *nasB*: cambio de las cisteínas 10 y 13 a alaninas.

La nitrato reductasa de las plantas superiores es un complejo multiredox formado por dos subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene tres grupos prostéticos unidos a tres dominios diferentes (véase Wray y Kinghorn, 1989; Crawford y Arst, 1993). La mutagénesis dirigida en los distintos dominios de la nitrato reductasa de algunos organismos eucarióticos ha puesto de manifiesto la importancia de ciertos aminoácidos tanto en la estructura como en la actividad catalítica del enzima. Por este procedimiento se han identificado ciertas cisteínas como sitios a los que se puede unir el Mo-co (Meyer *et al.*, 1995; Garde *et al.*, 1995). El papel de las cisteínas en la unión del Mo-co parece ser general en las enzimas que contienen molibdeno como es el caso de la sulfito oxidasa (Garrett y Rajopalan, 1996).

La comparación de la secuencia de la proteína NASB de *A. vinelandii* con las de las proteínas NARB de *Synechoococcus sp* y NASA de *K. pneumoniae*, muestra algunos aminoácidos muy conservados en el extremo N-terminal. Entre estos aminoácidos se encuentran 4 cisteínas en las posiciones 10, 13, 17 y 45. Con objeto de probar la posible implicación de las cisteínas en la actividad catalítica y/o reguladora del enzima nitrato reductasa de *A. vinelandii*, las cisteínas 10 y 13 se han cambiado, mediante mutagénesis dirigida, por alaninas. Para ello hemos utilizado dos oligonucleótidos: uno de selección, en el que se quita el punto de corte *Bam*HI de la región de múltiples dianas para la clonación del plásmido pRM21R, y otro en el que las cisteínas en las posiciones 10 y 13 se sustituyen por alaninas, generando así un sitio de corte de *Sph*I que sirve como control del cambio de los aminoácidos mencionados. La mutagénesis se ha hecho sobre el plásmido pRM21R y el plásmido que lleva los cambios de las cisteínas por alaninas se ha llamado pPNC10,13A, tabla VII.

Tabla VII. Secuencia de ADN y de aminoácidos correspondientes a la región C10 y C13 del gen *nasB*.

	Secuencias de ADN y aminoácidos correspondientes
pRM21R	5' ACC TGC TGT TAC TGC GGC 3' T C C Y C G
pPNC10,13A	5' ACC <u>GCA TGC</u> TAC GCC GGC 3' T A C Y A G
	<i>SphI</i>
Sitio de clonación multiples del plásmido pRM21R	<i>SalI</i> <i>BamHI</i>
	5' <u>GTCGACTCTAGAGGATCCCC</u> 3'
oligonucleótido de selección	<i>SalI</i>
	5' <u>GTCGACTCTAGAGGGCCCCC</u> 3'

Como la transferencia del plásmido pPNC10,13A (que lleva los aminoácidos cambiados) a las células de *A. vinelandii* no se puede seleccionar, se tuvo que construir previamente la estirpe AS500 que presenta una sustitución del fragmento cromosómico *XhoI* de 4Kb del operón *nasAB* por el cassette *sacB-sacR-nptI* del plásmido pUM24. Este cassette provoca en las células sensibilidad a la sacarosa (las células no pueden crecer cuando la sacarosa en el medio esta a una concentración de 5% (p/v)), y resistencia a kanamicina (Jeffrey y Collmer, 1987). Para ello, hemos construido el plásmido pRM21X ver figura 11, este plásmido se transfirió a las células de *A. vinelandii*, seleccionando colonias resistentes a kanamicina y a la vez sensibles a sacarosa.

El plásmido pPNC10,13A se transfirió a la estirpe AS500 por transformación, seleccionándose colonias resistentes a sacarosa sobre las que se probaba posteriormente su sensibilidad a kanamicina. De esta forma nos aseguramos que los transformantes habían intercambiado el fragmento silvestre (con las cisteínas) por el fragmento mutante (con alaninas). Uno de los transformantes se denominó AS510.

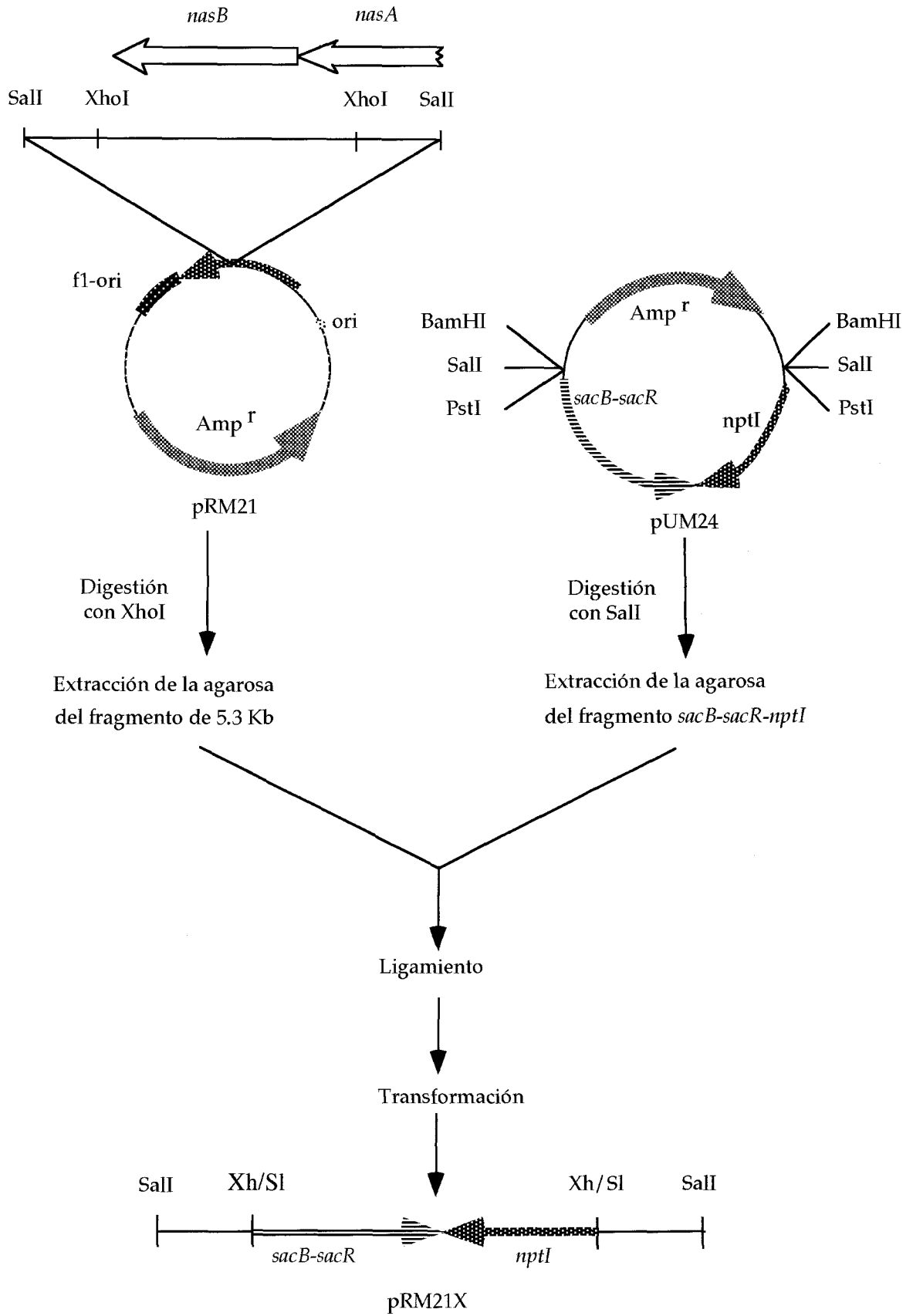


Figura 11. Construcción del plásmido pRM21X.

En la tabla VII se muestran las actividades nitrato y nitrito reductasa de las estirpes AS510, UW136 y AS512 (que tiene insertado el cassette KISS en el punto *KpnI* de *nasB*) cultivadas en presencia de nitrato, amonio y en condiciones de fijación de nitrógeno atmosférico.

**Tabla VIII.** Actividades nitrato y nitrito reductasa de la estirpe AS510, AS512 y UW136 cultivadas en las distintas fuentes de nitrógeno.

<u>Estirpes</u>	<u>-N</u>		<u>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></u>		<u>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></u>	
	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>
UW136	0.89	5.3	12,3	32.1	0.75	4.7
AS510	0.21	4.9	0.19	28.7	0.15	4.0
AS512	0.91	28.6	0.74	28.3	0.81	5.2

Las actividades se expresan en nanomoles de nitrito producido o consumido por miligramo de proteína y por minuto. Los ensayos se hicieron a partir de inóculos que crecieron en presencia de amonio y se pasaron a medios con las distintas fuentes de nitrógeno durante 15 horas.

Los resultados de la Tabla VIII muestran que los cambios de las cisteínas 10 y 13 por alaninas afectan a la actividad nitrato reductasa, mientras que los niveles de actividad de la nitrito reductasa en las distintas fuentes de nitrógeno son parecidos a los de la estirpe silvestre UW136. Estos datos sugieren que este mutante presenta una nitrato reductasa no funcional pero que sigue regulando el operón *nasAB*. En *A. vinelandii* es el primer mutante en el gen de la nitrato reductasa con este fenotipo que se describe. En los estudios llevados a cabo previamente en nuestro laboratorio todos los mutantes en *nasB*, así como los mutantes del cofactor de molibdeno, carecían de actividad catalítica y además expresaban el operón *nasAB* en ausencia de nitrato, por lo que se propuso que la nitrato reductasa tiene un papel regulador, directa o indirectamente, sobre su propia síntesis (Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993).

Las fusiones del operón *nasAB* de *A. vinelandii* con el gen de la  $\beta$ -galactosidasa ha permitido aclarar mucho sobre el modelo de la regulación de la asimilación de nitrato. Una de estas fusiones, la del plásmido pPN12, ha sido una buena herramienta para estudiar la actividad promotora de este operón en las distintas fuentes de nitrógeno y en distintos fondos genéticos. Este plásmido se construyó a partir del vector pCB267 al que se ha insertado la zona promotora del operón *nasAB*, de manera que el gen *lacZ* de este vector se encuentra bajo control del promotor mencionado (Gutierrez *et al.*, 1995), figura 12.

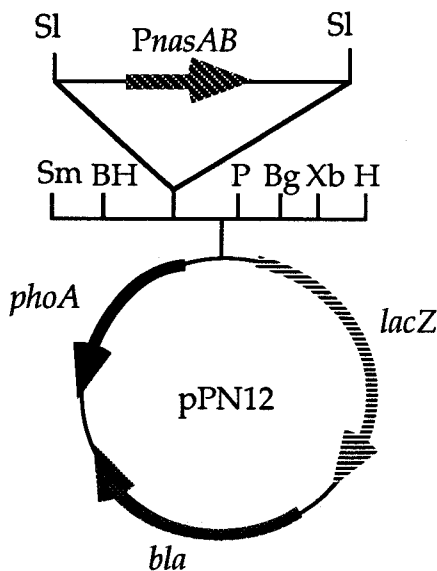


Figura 12. Plásmido pPN12, orientación del *PnasAB* dentro del vector

Para confirmar los datos anteriores sobre la expresión del operón *nasAB* en la estirpe AS510, hemos transformado esta estirpe con el plásmido pPN12, seleccionando colonias resistentes a ampicilina, el marcador del vector. Debido a que el vector pCB267 no se puede mantener en *Azotobacter*, la única posibilidad de obtener resistentes a este antibiótico es que se produzca un único hecho de recombinación entre el fragmento que tiene clonado el pPN12 y el fragmento cromosómico homólogo, dando lugar a una duplicación de esta región. La estirpe resultante se ha llamado AS511, y se ha utilizado para medir los niveles de expresión del promotor en las distintas fuentes de nitrógeno. Como controles se utilizaron las estirpes AS440, en la que la fusión se encuentra en un fondo silvestre y la AS446, en la que la fusión se encuentra en un fondo mutante en el gen *nasB*. Las células se cultivaban en medio mínimo hasta que alcanzaban una densidad óptica de



### 3. 4. Discusión.

Las inserciones de los cassettes  $\Omega$  y KISS en la región *nasAB*, así como los estudios de fusiones de *lacZ* con *nasA* mostraron que los genes *nasA* y *nasB* así como la zona promotora se localizaban en un fragmento *Eco47III-SmaI* de 6.3 Kb (F. Ramos *et al.*, 1993).

En este trabajo se han secuenciado 6651 nucleótidos que abarcan a dicho fragmento, figura 6. Del análisis de la secuencia de nucleótidos se deduce que esta región contiene, al menos, cuatro fases de lectura abierta: una primera ORF incompleta a la que le siguen, a 274 nucleótidos de su extremo 3', *nasA*, el gen estructural de la nitrito reductasa, *nasB*, el gen estructural de la nitrato reductasa y una cuarta ORF que está incompleta, que presenta homología con genes implicados en la síntesis del sirohemo, el cofactor de la nitrito reductasa.

Se ha localizado una posible secuencia promotora por delante de *nasA*. Como se esperaba se trata de una típica secuencia dependiente de sigma 54, figura 6. Esto confirma resultados previos (Santero *et al.*, 1986) consistentes en que los mutantes en el gen *ntrA* carecían de actividad nitrato- y nitrito-reductasa y de los que se dedujo que la expresión de ambas reductasas dependía de sigma 54. Sin embargo los posibles sitios de unión de NTRC están menos claros, la secuencia consenso correspondiente no está completa, sólo la mitad. Entre *nasA* y *nasB* no aparece ninguna secuencia promotora, confirmándose los resultados de Ramos *et al.*, 1993, según los cuales *nasA* y *nasB* debían formar un operón. Entre *nasB* y la cuarta fase de lectura abierta, aparece una posible secuencia promotora dependiente, también, de sigma-54; si esta secuencia representa realmente un promotor queda por demostrar así como, en caso afirmativo, si éste se regula por la fuente de nitrógeno. Este ordenamiento de genes en el que los genes estructurales de la nitrito- y nitrato-reductasa forman parte de la misma unidad transcripcional que un gen implicado en la síntesis del sirohemo ya se ha descrito en *B. subtilis* como se discutirá más adelante (Ogawa *et al.*, 1995).

En *E. coli*, los genes estructurales de las dos subunidades de la nitrito reductasa citoplásmica dependiente de NADH también forman parte del mismo operón que el gen responsable de la síntesis de su cofactor, *cysG*, y en este caso, como aparentemente ocurre en *A. vinelandii*, se puede transcribir a



partir de un segundo promotor situado por detrás de los genes estructurales de la nitrito reductasa como describiremos más adelante (Peakman *et al.*, 1990a).

Un dato muy interesante, derivado del estudio de la secuencia es que entre el posible sitio de unión de la ARN-polimerasa y el presunto codón de iniciación de la traducción del gen *nasA*, se encuentra una repetición invertida capaz de formar un lazo en el ARNm, 5'AAAAGGCGTCCN<sub>20</sub>GGACGCCTTTT3'. Dicha estructura podría actuar como un terminador de la transcripción independiente de Rho. Una estructura parecida se ha descrito en el operón *nasFEDCBA* de *K. pneumoniae* (Lin y Stewart, 1996). En *Klebsiella* se ha propuesto que en ausencia de nitrato se formaría dicha estructura terminadora interrumpiéndose prematuramente la transcripción del operón y que, en presencia de nitrato, el regulador positivo NASR se uniría a dicha estructura actuando como un antiterminador. Sería interesante comprobar si la inducción por nitrato del operón *nasAB* de *A. vinelandii* se lleva a cabo por un mecanismo similar. A parte de este antiterminador no hemos encontrado ningún otro, independiente de Rho, entre *nasA* y *nasB*, ni entre *nasB* y la cuarta fase de lectura abierta incompleta.

La proteína que se deduce de traducir el gen *nasA* de *A. vinelandii* comprende 919 aminoácidos, presenta un peso molecular de 99.851. Da y un pI de 6.51. Al comparar la secuencia de aminoácidos de NASA con las secuencias de proteínas presentes en los bancos de datos disponibles, se comprobó que las proteínas que presentaban mayor grado de identidad eran NASB y NASD de *B. subtilis* (Ogawa *et al.*, 1995), NASB de *K. pneumoniae* M5al (Lin *et al.*, 1993 y 1994), y NIRB de *Escherichia coli* (Peakman *et al.*, 1990a, Harborne *et al.*, 1992), tabla III y figura 7.

En *B. subtilis* la secuencia de la región cromosómica de los genes implicados en la asimilación de nitrato, comprende seis ORFs, *nasA*, *nasB*, *nasC*, *nasD*, *nasE* y *nasF*. Las ORFs *nasB* hasta *nasF* se cotranscriben en la misma orientación a partir del promotor P1, mientras que *nasA* se transcribe en la orientación contraria a partir del promotor P2, también se ha encontrado un tercer promotor P3 delante de *nasD* (Ogawa *et al.*, 1995).

Tanto NASB como NASD de *Bacillus* presentan los dominios de unión al FADH y al NAD(P)H, y NASD presenta además el sitio de unión al sirohemo. El producto del gen *nasE* tiene similitud con la proteína NIRD de *E. coli*, esta última es una subunidad de la nitrito reductasa respiratoria y dependiente de NADH (Peakman *et al.*, 1990a, Harborne *et al.*, 1992) y tiene una alta homología con los extremo C-terminales de las nitrito reductasas de *A. nidulans* y de *K. pneumoniae* (Lin *et al.*, 1993). El extremo N-terminal de la proteína NASF es homólogo al extremo C-terminal de la proteína CYSG de *E. coli* (Peakman *et al.*, 1990a; Warren *et al.*, 1990), a COBA de *P. denitrificans* (Crouzet *et al.*, 1990) y a COBA de *Bacillus megaterium* (Robin *et al.*, 1991), enzimas que intervienen en la síntesis del sirohemo. Estos datos, junto con otros estudios genéticos y fisiológicos, sugieren que las proteínas NASD, NASE y NASF están implicadas en la reducción de nitrito, siendo NASD y NASE las subunidades de la nitrito reductasa, y NASF la enzima necesaria para la síntesis del sirohemo. Sin embargo, a pesar de la homología de la nitrito reductasa de *A. vinelandii* con la proteína NASB de *Bacillus*, esta última no está implicada en la reducción de nitrito sino en la transferencia de electrones a la nitrato reductasa, el producto del gen *nasC*; por último la proteína NASA parece estar implicada en el transporte de nitrato (Ogawa *et al.*, 1995).

El operón *nirBDEC-cysG* de *E. coli* contiene los genes necesarios para el metabolismo del nitrito. *nirB* y *nirD* son los genes estructurales de las dos subunidades que componen la nitrito reductasa, de 90 y 12 kDa, respectivamente (Peakman *et al.*, 1990a; Harborne *et al.*, 1992). CYSG es necesario para la síntesis del sirohemo, el grupo prostético de la nitrito-y sulfito-reductasa (Jackson *et al.*, 1981; Warren *et al.*, 1990). Estudios fisiológicos y experimentos de complementación han puesto de manifiesto que los genes *nirB*, *nirD* y *CysG* son necesarios y suficientes para la actividad de esta nitrito reductasa respiratoria. Aparentemente *nirE* no se traduce y no es necesario para la reducción de nitrito, su función no se conoce (Harborne *et al.*, 1992). La proteína NIRC tampoco es necesaria para la actividad nitrito reductasa (Harborne *et al.*, 1992), pero su hidrofobicidad permite proponer que es una proteína integral de membrana. La homología de secuencia de la proteína NIRC con el producto de la ORF que precede al gen *pfl* de *E. coli* que interviene en el transporte de formiato, sugiere que NIRC está implicada en el transporte de nitrito: (i) al interior celular para su posterior reducción

gracias a la nitrito reductasa respiratoria o, (ii) al exterior celular para eliminar el nitrito acumulado en el citoplasma procedente de la reducción de nitrato.

En anaerobiosis los genes *nirBDEC* y *CysG* se cotranscriben en la misma orientación a partir de un promotor dependiente de la proteína FNR. No obstante, se ha identificado un segundo promotor dentro del extremo 3' de *nirC* que es independiente de FNR y permite la transcripción del gen *CysG* en aerobiosis y tanto en presencia como en ausencia de nitrato en el medio.

La proteína NASB de *K. pneumoniae* tiene 975 aminoácidos, un peso molecular de 104 KDa, y corresponde a la nitrito reductasa asimilatoria. Esta proteína tiene los sitios de unión al FADH, al NAD(P)H y al sirohemo igual que las proteínas NASA de *A. vinelandii*, NASD de *B. subtilis* y NIRB de *E. coli*. El gen *nasB* que la codifica pertenece a una agrupación génica *nasFEDCBA* cuyos genes forman parte del mismo operón (Lin *et al.*, 1993 y 1994; Lin y Stewart, 1996). El gen *nasA* es el gen estructural de la nitrato reductasa, NASA. Esta proteína contiene el sitio de unión del molibdopterina guanina dinucleótido, sin embargo, carece de sitio de unión al FADH y al NADH (Lin *et al.*, 1993). Análisis mutacionales, la falta de sitio de unión al NADH en NASA y la alta homología de NASC con óxido-reductasas dependientes de NADH, sugieren que ambas NASA y NASC se requieren para la reducción de nitrato, siendo esta última la que transfiere los electrones desde el NADH a la nitrato reductasa. Las proteínas NASF, NASE y NASD son altamente homólogas a las proteínas NRTA, NRTB y NRTD de *Synechococcus* sp. PCC7942 (Lin *et al.*, 1994), estas tres últimas forman parte del sistema multicomponente de transporte de nitrato en dicha cianobacteria (Omata *et al.*, 1993). Por extrapolación de lo descrito en *Synechococcus* sp, se ha propuesto que los genes *nasFED*, están implicados en el transporte de nitrato en la enterobacteria *K. pneumoniae* (Lin *et al.*, 1994).

La secuencia de aminoácidos de la proteína NASB de *A. vinelandii* mostró una alta homología con la proteína NASA de *K. pneumoniae* (Lin *et al.*, 1993) y NARB de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Andriessse *et al.*, 1990), las nitrato reductasas de dichos organismos. El tamaño de la proteína que se deduce a partir de la secuencia, 97.352 Da, coincide con los 105 kDa asignados al enzima purificada (Gangeswaran *et al.*, 1993). En la secuencia no aparecen sitios posibles de unión al FADH ni al NAD(P)H lo que confirma los datos bioquímicos que se conocían, es decir que este enzima no puede utilizar los

piridín ni flavín nucleótidos como donadores directos de electrones. Desafortunadamente, en la secuencia analizada no nos hemos encontrado ninguna ORF con homología a óxido-reductasas que pudiera actuar como intermediario en la transferencia de electrones. Habrá que analizar la secuencia que sigue a la cuarta ORF y comprobar si, como en el caso de *Klebsiella* y *Bacillus*, la agrupación de genes de la asimilación de nitrato en *Azotobacter* incluye dicha proteína.

La secuencia de aminoácidos de la cuarta ORF, que está incompleta, mostró una homología muy alta con los productos de los genes *CobA* de *Pseudomonas fluorescens* (DeMot R *et al.*, 1994), *CobA* de *P. denitrificans* (Crouzet *et al.*, 1990), *cysG* de *S. typhimurium* (Wu *et al.*, 1991) y *CysG* de *E. coli* (Peakman *et al.*, 1990a).

*cobA* es el gen estructural de la S-adenosilo-L-metionina (SAM): uroporfirinógeno III (urógeno III) metiltransferasa (SUMT), enzima que cataliza la transferencia de dos grupos metilo de la S-adenosilo-L-metionina al urógeno III en las posiciones C-2 y C-7, generando así la precorrina-2, un intermediario común de la síntesis del sirohemo, corrinoideas y F430 (Gilles *et al.*, 1983; Leeper, 1989). El gen *cobA* de *P. denitrificans* forma una agrupación génica con los genes *cobB*, *cobC* y *cobD*, genes estructurales de enzimas que intervienen en la síntesis de la cobalamina o Vitamina B12 (Crouzet *et al.*, 1990). Estos genes junto a otros genes de la biosíntesis de cobalamina están repartidos en cuatro regiones distintas del genoma (Cameron *et al.*, 1989), al contrario de *S. typhimurium* donde la mayoría de los genes de esta ruta están localizados en la misma región (Jeter *et al.*, 1984 y 1987).

La proteína CYSG de *E. coli* tiene dos actividades distintas, una actividad SUMT necesaria para la síntesis de precorrina-2 y una segunda actividad necesaria para la conversión de la precorrina-2 en sirohemo. Estas dos funciones la llevan a cabo dos dominios distintos: el dominio N-terminal cataliza la conversión de la precorrina-2 en sirohemo y el dominio C-terminal la síntesis de precorrina-2. De hecho la proteína COBA de *P. denitrificans* es de menor tamaño que CYSG y no parece necesaria para la conversión de la precorrina-2 en sirohemo puesto que los mutantes *cobA*, con una actividad SUMT muy baja, crecen en medio mínimo sin cisteína y tienen por tanto actividad sulfito reductasa (Blanche *et al.*, 1989). La región de homología entre COBA y CYSG se limita al dominio con actividad metil transferasa. Esto

explica porqué la estirpe B5548 de *E. coli* que está afectada en el gen *cysG*, al complementarse con el gen *cobA* de *P. denitrificans*, no era capaz de sintetizar el sirohemo en medio mínimo M9 (Crouzet *et al.*, 1990).

En *S. typhimurium* se ha clonado y secuenciado un fragmento cromosómico de 5.3 Kb que contiene el gen *cysG*. La comparación de su secuencia con la del fragmento cromosómico que contiene el gen *cysG* de *E. coli*, ha mostrado la presencia de los genes *nirBC* en el orden *nirB-nirC-cysG*, así como otras ORFs detrás de *cysG* cuya función no se conoce (Wu *et al.*, 1991). Estudios hechos en *E. coli* sobre la expresión de la NADPH-sulfito reductasa, enzima que presenta el cofactor sirohemo en su subunidad  $\beta$  (Murphy *et al.*, 1973a y 1973b; Siegel *et al.*, 1973 y 1974) han mostrado que el holoenzima se sobreexpresa cuando los plásmidos que llevan los genes *cysII* (genes estructurales de la subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la NADPH-sulfito reductasa, respectivamente) tienen clonado el gen *cysG* de *S. typhimurium*, lo que confirmaría la implicación de este gen en la síntesis del sirohemo (Wu *et al.*, 1991).

Dada la alta homología entre la cuarta ORF de *A. vinelandii* y proteínas implicadas en la síntesis del sirohemo, así como su estrecha asociación a los genes de la asimilación de nitrato, la hemos denominado *nasH*. Los ensayos de actividad nitrato y nitrito reductasa en el mutante AS513 que tiene insertado el cassette KIXX en el gen *nasH* han mostrado que está afectado específicamente en la actividad nitrito reductasa; estos resultados, junto a la homología de secuencia con *cysG*, sugieren fuertemente que *nasH* es necesario para la síntesis del cofactor de la nitrito reductasa. La disminución de los niveles de actividad nitrato reductasa en el mutante AS513 puede deberse a que la onda de transcripción a partir del promotor de la kanamicina del cassette KIXX interfiere con la transcripción a partir del promotor *nasAB*. Aunque la secuencia de *nasH* no está completa, cuando se compara con las de *cysG* y *cobA* la homología se localiza en el dominio C-terminal que supuestamente tiene la actividad metiltransferasa (SUMT) y no en el dominio N-terminal implicado en el último paso de la síntesis del sirohemo. No obstante, el fenotipo del mutante en *nasH*, que carece de actividad nitrito reductasa y que no necesita cobalamina, unido a la estrecha asociación de *nasH* a los genes de asimilación de nitrato le asemejan más a la función catalítica de transformación de la precorrina-2 en sirohemo de *cysG* que a la actividad SUMT de *cobA*. Finalmente, puesto que el mutante en *nasH* es

capaz de crecer en sulfato, hay que asumir que la síntesis del sirohemo de la sulfito reductasa debe estar controlada por otro gen distinto de *nasH*.

La nitrato reductasa de plantas superiores está formada por dos polipéptidos idénticos, cada uno de los cuales contiene tres dominios donde se localizan los tres grupos prostéticos que intervienen sucesivamente en la transferencia de electrones desde el NADH hasta el nitrato: el FAD, el hemo y el Mo-co. El dominio de unión del Mo-co está localizado en el extremo N-terminal, el del FAD en el C-terminal y el hemo entre ambos (Wray and Kinghorn, 1989; Rouze y Caboche, 1992).

En bacterias, la actividad NAD(P)H-óxido reductasa (que actúa como intermediaria en la transferencia de electrones desde el NAD(P)H) y la actividad reductora del nitrato la llevan a cabo polipéptidos diferentes, como se ha discutido anteriormente. Se ha localizado el dominio de unión de los piridines nucleótidos a la óxido reductasa. En cambio no se tiene información sobre la estructura de la nitrato reductasa, ni sobre cuales son los aminoácidos implicados en la unión del Mo-co o esenciales para la actividad catalítica. La comparación de la secuencia de la nitrato reductasa de *A. vinelandii* con las de las nitrato reductasas de *K. pneumoniae* y de *Synechococcus* sp muestra una serie de aminoácidos muy conservados. En concreto, en el extremo N-terminal se encuentran 4 cisteínas en las posiciones 10, 13, 17 y 45 que aparecen en todos los casos. Con objeto de determinar si estas cisteínas son importantes para la actividad catalítica y/o reguladora de la nitrato reductasa, se ha obtenido, mediante mutagénesis dirigida, una estirpe (AS510) en la que las cisteínas 10 y 13 se han sustituido por alaninas. El cambio de estos dos aminoácidos da lugar a una proteína inactiva que conserva, no obstante, su propiedad reguladora. Es el primer mutante en *nasB* que presenta este fenotipo. En estudios previos se había demostrado que los mutantes en *nasB*, o los mutantes en el cofactor de molibdeno expresaban el operón *nasAB* independientemente de la presencia o no de nitrato en el medio, atribuyéndose a la nitrato reductasa un papel como regulador negativo de su propio operón en ausencia de nitrato. (Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993). Este fenómeno se ha descrito también en hongos (Crawford y Arst, 1993) y algas. El papel regulador de la nitrato reductasa es un tema actualmente muy controvertido (Maloy y Stewart, 1993). Entre los detractores de la hipótesis del papel autoregulador de la nitrato reductasa sobre su propia expresión, se argumenta que al perderse la actividad catalítica el enzima no puede eliminar

las hipotéticas trazas contaminantes de nitrato, las cuales estarían activando permanentemente a su operón. Los resultados obtenidos con la estirpe AS510 y AS511 permiten descartar dicho argumento y, lejos de arrinconar la hipótesis de la autorregulación, son un estímulo para, en trabajos sucesivos, tratar de localizar los aminoácidos de la secuencia de la nitrato reductasa implicados en la autorregulación.

### 3. 5. Caracterización del transporter de nitrato en *A. vinelandii*

#### 3. 5. 1. Consumo de nitrato en *A. vinelandii*

La asimilación de nitrato es la suma de tres procesos: (i) entrada de nitrato al interior celular, (ii) reducción hasta amonio por la acción secuencial de las reductasas del nitrato y nitrito e (iii) incorporación de éste a esqueletos carbonados vía glutamato deshidrogenasa y/o empleando la ruta glutamina sintetasa y glutamato sintetasa. Si bien las etapas de reducción de nitrato e incorporación de amonio a esqueletos carbonados han sido ampliamente estudiadas en numerosos organismos, el proceso por el cual el nitrato es transportado al interior celular, atravesando la membrana plasmática, se conoce muy poco. En *A. chroococcum* el transporte de nitrato al interior celular se realiza probablemente a través de un complejo multienzimático formado por tres polipéptidos de 52, 49 y 44 kDa, respectivamente. Este sistema de transporte es inducible por nitrato y reprimible por amonio (Muñoz-Centeno *et al.*, 1993). La existencia de sistemas de transporte multicomponentes se ha demostrado en otros microorganismos, como en la cianobacteria *Synechococcus* PCC 7942 (Omata *et al.*, 1993) y en la enterobacteria *K. pneumoniae* M5al (Lin *et al.*, 1994).

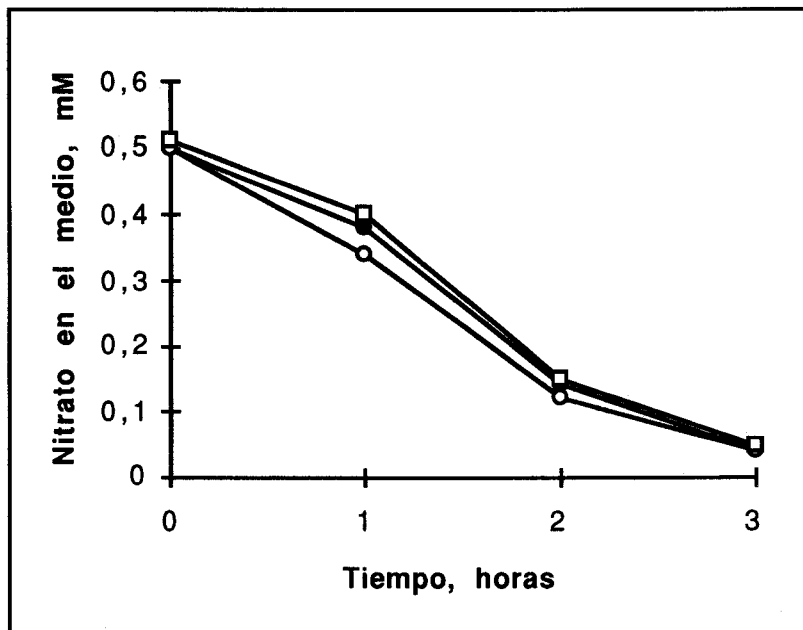
El estudio del transporte de nitrato al interior celular en *A. vinelandii*, se ha llevado a cabo siguiendo su desaparición del medio (consumo) según el método descrito por Muñoz-Centeno *et al.*, (1993). Aunque este método no permite distinguir el transporte de las etapas posteriores de reducción y asimilación, es una aproximación que, junto con el empleo de mutantes, permite llegar a algunas conclusiones. Las células se cultivaron en medio BS suplementado con distintas fuentes de nitrógeno hasta una  $DO_{560}=0.5-0.7$ , se lavaron, se resuspendieron en tampón MOPS-KOH 50mM, pH 7.5, suplementado con sacarosa al 1% (p/v), y tras incubación 15 minutos a 30 C° y agitación a 100 rpm se les añadió el nitrato a una concentración final de 0.5 mM. La desaparición del nitrato se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

En la figura 13 se muestra como la cinética de la desaparición de nitrato en células de *A. vinelandii* crecidas en distintas fuentes de nitrógeno es la



misma en todos los casos y, aparentemente, muy poco eficaz, necesitándose tres horas para su completa desaparición.

**Figura 13.** Consumo de nitrato en la cepa silvestre UW136 de *A. vinelandii*. cultivada en distintas fuentes de nitrógeno.



Células cultivadas en medio Burk sacarosa (BS) suplementado con 8mM de KNO<sub>3</sub> (○), con 10mM de CINH<sub>4</sub> (□) o en N<sub>2</sub> atmosférico (●), se recogieron por centrifugación a una DO<sub>560</sub>=0.7, se lavaron y resuspendieron en tampón MOPS-KOH 50mM, pH7.5, suplementado con sacarosa al 1% (p/v). El experimento comenzó añadiendo KNO<sub>3</sub> a concentración final de 0.5 mM y la desaparición del ión se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

Una explicación posible era que el tratamiento seguido hubiera afectado a la actividad nitrato reductasa de las células crecidas en nitrato y se requiriera tiempo para la inducción del sistema de reducción. Para comprobarlo, de cada muestra en la que se medía el consumo se tomó una alícuota para ensayar la actividad nitrato reductasa. Los resultados se presentan en la Tabla X. Como se observa, a tiempo cero, las células crecidas en condiciones de fijación de N<sub>2</sub>, o en medio suplementado con NH<sub>4</sub>, carecen de actividad nitrato reductasa que se induce a partir de la primera hora tras la adición de nitrato. En cambio, las células crecidas en nitrato conservan un nivel elevado de actividad nitrato

reductasa tras el tratamiento. Es decir, que en este caso la baja eficacia del consumo no se puede atribuir a la falta de actividad nitrato reductasa.

**Tabla X. Actividad nitrato reductasa de la estirpe UW136 cultivada en distintas fuentes de nitrógeno a lo largo del ensayo de consumo de nitrato.**

ESTIRPE	0 HORA	1 HORA	2 HORAS	3 HORAS
UW136 N <sub>2</sub>	0.43	5.24	8.78	12.65
UW136 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	8.34	9.64	12.16	13.06
UW136 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.34	4.86	8.22	11.9

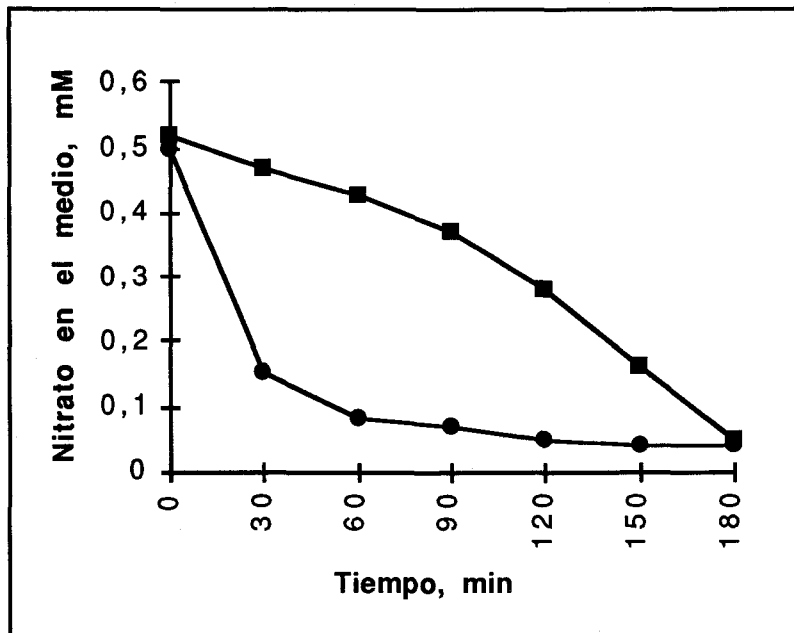
Las actividades se expresan en nanomoles de nitrito producido por miligramo de proteína y por minuto. El ensayo se hizo a lo largo de las tres horas que duró el experimento de consumo de nitrato.

### 3. 5. 2. Consumo de nitrato en las estirpes UW136 de *A. vinelandii* y ATCC4412 de *A. chroococcum*

Para comprobar que el procedimiento seguido para medir la desaparición de nitrato era correcto, utilizamos *A. chroococcum* como control. Las células de ambas estirpes se cultivaron en medio BS-nitrato (8mM) hasta DO<sub>560</sub>=0.5-0.7, se lavaron, se resuspendieron en tampón MOPS-KOH, 50mM, pH7.5, suplementado con sacarosa al 1% (p/v) y se procedió como se indica en la figura 13.

En la figura 14, se presentan las cinéticas del consumo de nitrato en ambas estirpes. Como se muestra, las células de *A. chroococcum* consumen el ión en cuestión de una hora mientras que células de *A. vinelandii* lo consumen muy lentamente.

Figura 14. Cinética comparativa del consumo de nitrato en *A. vinelandii* y *A. chroococcum*.



Células de *A. vinelandii* (■) y *A. chroococcum* (●), cultivadas en medio BS suplementado con 8mM de  $\text{KNO}_3$  se recogieron por centrifugación a  $\text{DO}_{560}=0.7$ , se lavaron y resuspendieron en tampón MOPS-KOH 50mM, pH7.5 más sacarosa al 1% (p/v). La desaparición de nitrato se determinó como se indica en la figura 13.

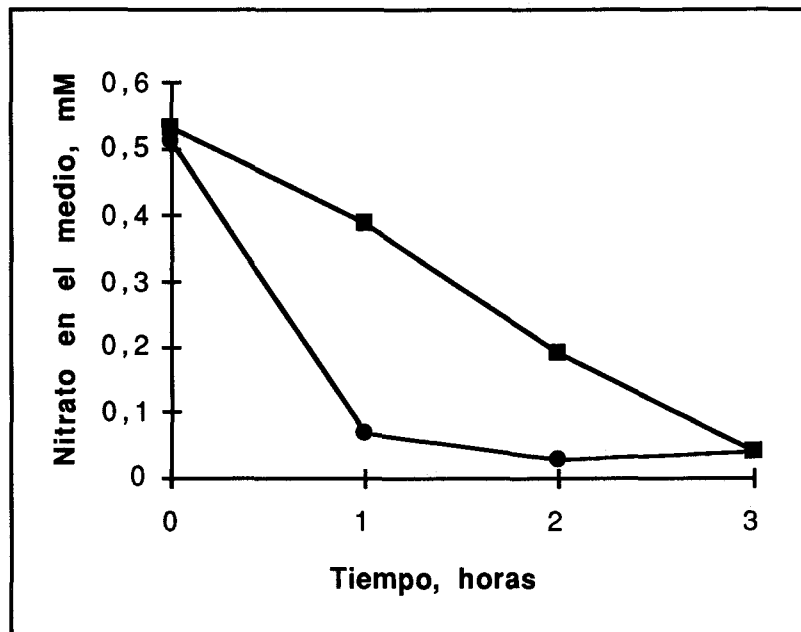
### 3. 5. 3. Efecto del lavado sobre el consumo de nitrato en *A. vinelandii*

En el apartado (3. 5. 1.) se comprobó que la baja eficacia en el consumo de nitrato de células crecidas en presencia de dicho ión no se debe a que el tratamiento afecte a la actividad nitrato reductasa. Nos planteamos la posibilidad de que el procedimiento seguido para medir el consumo de nitrato afectara, de alguna manera, al transporte de nitrato en *A. vinelandii*. Uno de los pasos seguidos en este tratamiento consiste en el lavado de las células previo a la adición del nitrato. Para comprobar el efecto del lavado sobre el transporte, hemos hecho un estudio comparativo entre el consumo de nitrato en células lavadas y sin lavar. En este último caso las células se cultivaron en medio BS suplementado con nitrato a una concentración de 3 mM, suficientemente baja como para que una vez crecido el cultivo

( $DO_{560}=0.7$ ) el nitrato restante en el medio no interfiriera con la concentración del nitrato añadido en el experimento.

En la figura 15 se muestra que las células no lavadas consumen dicho ión desde el tiempo cero y a una mayor velocidad que las células lavadas.

Figura 15. Consumo de nitrato en células de *A. vinelandii* lavadas y sin lavar.



Células de *A. vinelandii* cultivadas en medio BS suplementado con nitrato 3mM hasta  $DO_{560}=0.7$ . Células lavadas y resuspendidas en MOPS-KOH 50 mM, pH 7.5 más 1% (p/v) de sacarosa (■), células sin lavar. El consumo de nitrato comenzó con la adición de 0.5mM de  $N_03K$  y su desaparición se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

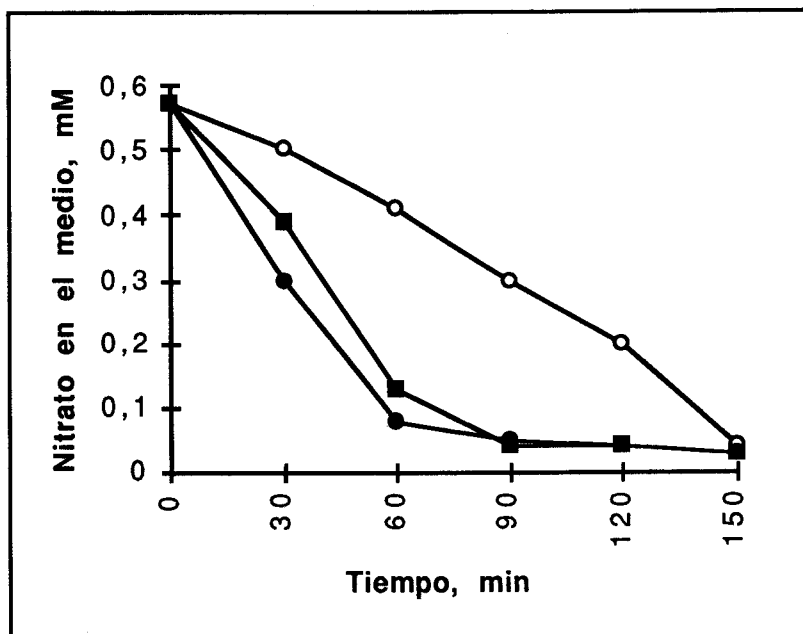
### 3. 5. 4. Efecto del sobrenadante sobre el consumo de nitrato en *A. vinelandii*

La diferencia entre las cinéticas del consumo de nitrato de células lavadas y células sin lavar sugiere que el lavado con el tampón afecta a la maquinaria de transporte de nitrato puesto que, como se vió en la Tabla X la actividad nitrato reductasa no se altera tras el lavado. Una posibilidad era que al lavar y resuspender las células en el tampón mencionado se perdiera algún

factor extracelular que es necesario para el transporte del anión. Para probar esta hipótesis, hicimos un experimento en el que las células se cultivaron en medio BS-KNO<sub>3</sub> 3mM hasta DO<sub>560</sub>=0.7, se lavaron con tampón MOPS-KOH 50mM, pH7.5 más sacarosa al 1%(p/v) pero en vez de resuspenderlas en el mismo tampón se resuspendieron en su propio sobrenadante. El experimento comenzó añadiendo nitrato a concentración final de 0.5 mM tras preincubar 15 minutos a 30°C, como se indica en Materiales y Métodos.

En la figura 16 se observa que las células lavadas y resuspendidas en su propio sobrenadante consumen el nitrato casi de la misma manera que las células sin lavar, mientras que las resuspendidas en el tampón mencionado lo consumen lentamente. Llegamos a la conclusión de que el efecto negativo del lavado sobre el transporte de nitrato en *A. vinelandii* se debe a la pérdida de algún factor extracelular, que se acumula en el sobrenadante, que es necesario para el transporte de dicho ión.

Figura 16. Consumo de nitrato en células de la cepa UW136 lavadas con MOPS-KOH 50mM pH 7.5 más sacarosa al 1% (p/v) y resuspendidas en su propio sobrenadante.



Las células se cultivaron en medio BS-KNO<sub>3</sub>, 3mM, y se sometieron a distintos tratamientos: sin lavar (●), se lavaron y resuspendieron en tampón MOPS-KOH 50mM, pH7.5, más 1% (p/v) de sacarosa (○), se lavaron en el mismo tampón pero

resuspendieron en su propio sobrenadante (■). El consumo de nitrato comenzó añadiendo 0.5mM de  $\text{KNO}_3$  y su desaparición se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

### 3. 5. 5. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el consumo de nitrato en *A. vinelandii*.

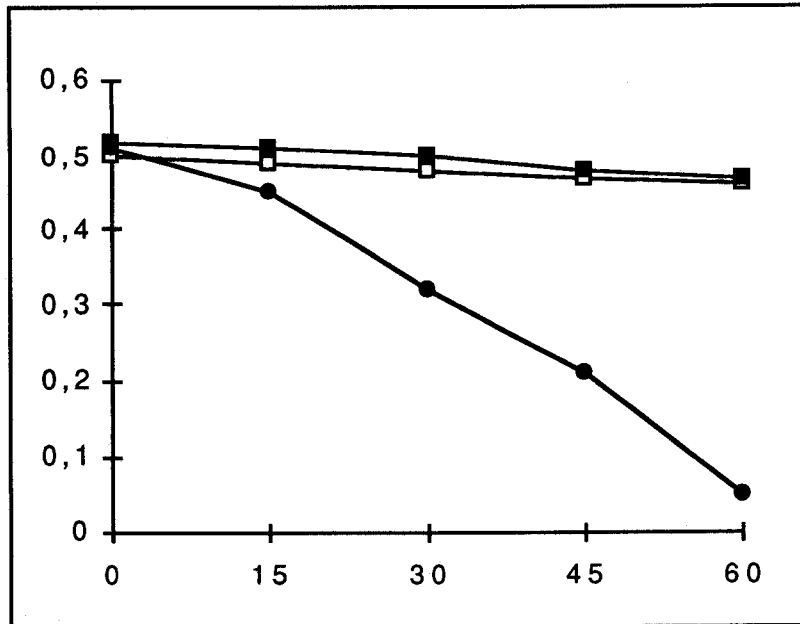
#### 3. 5. 5. 1. Consumo de nitrato en la estirpe UW136 cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno

El estudio del transporte de nitrato en la bacteria *A. chroococcum*, como en otras bacterias y cianobacterias, mostró que estos sistema de transporte se regulan por la fuente del nitrógeno, es decir se inducen por nitrato y se reprimen por amonio (Zevenboom y Mur, 1981; Betlach *et al.*, 1981; Jackson *et al.*, 1981; Thayer y Huffaker, 1982; Revilla *et al.*, 1985; Muñoz-Centeno *et al.*, 1993). Para ver el papel de la fuente de nitrógeno en el transporte de nitrato en *A. vinelandii*, hemos utilizado la estirpe silvestre UW136. Las células se cultivaron, hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento, (i) en condiciones de fijación de nitrógeno atmosférico, (ii) en presencia de 10mM de amonio, y (iii) de 3mM de nitrato. A continuación se les añadió el nitrato a concentración final de 0.5 mM, y se siguió la desaparición del anión del medio extracelular.

En la figura 17 se observa que las células cultivadas en presencia de nitrato consumen el anión en una hora, mientras que las células crecidas en amonio o fijando  $\text{N}_2$  no consumen nitrato durante el tiempo que duró el ensayo. No obstante, la falta de consumo no se puede atribuir al sistema de transporte puesto que estas células no tienen inducida la actividad nitrato reductasa.

Para solventar la falta de actividad nitrato reductasa en las células provenientes de amonio o de condiciones de fijación de nitrógeno, cultivamos las células de la estirpe UW136 en presencia de nitrato hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento. A continuación las células se centrifugaron, se lavaron en MOPS-KOH y se resuspendieron en sobrenadantes de cultivos de la misma estirpe crecidos en presencia de amonio, nitrato o  $\text{N}_2$ . El ensayo comenzó al añadir 0.5 mM de nitrato, y la desaparición del anión se siguió como se describe en Materiales y Métodos.

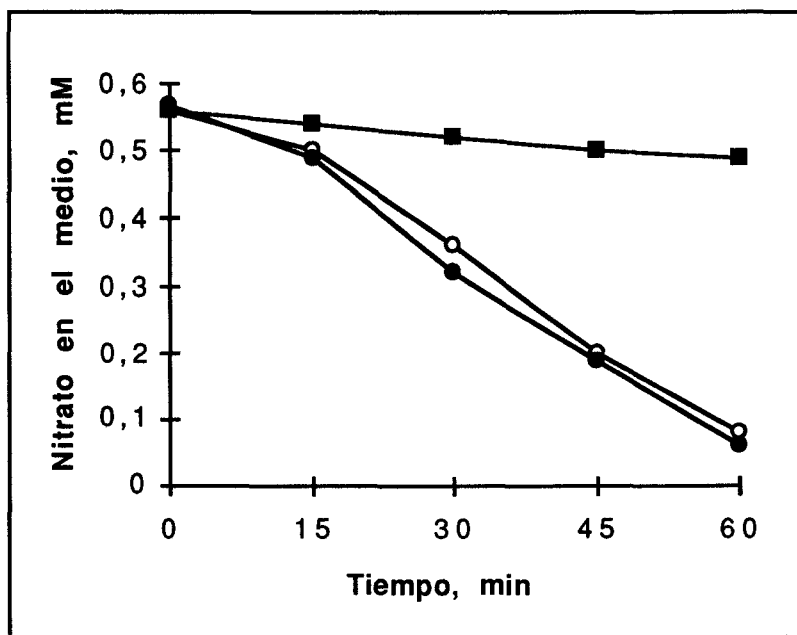
Figura 17. Consumo de nitrato en la estirpe UW136 cultivadas en las distintas fuentes de nitrógeno



Células de la estirpe UW136 cultivadas en medio BS, fijando nitrógeno (■), en presencia de amonio (□) o de 3 mM de nitrato (●), hasta  $DO_{560}=0.7$ , se les añadió nitrato a concentración final de 0.5 mM. El consumo del anión se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

En la figura 18 se observa que las células crecidas en nitrato, lavadas en MOPS-KOH y resuspendidas en sobrenadantes de cultivos provenientes de nitrato o de  $N_2$  consumen el anión en una hora, mientras que las resuspendidas en el sobrenadante del cultivo de amonio, no son capaces de consumirlo. Este resultado demuestra que la acumulación en el sobrenadante del factor extracelular implicado en el transporte no depende de nitrato. El efecto negativo del sobrenadante proveniente del cultivo en amonio sobre el consumo de nitrato se puede explicar de diversas maneras. Bien dicho sobrenadante contiene aún restos de amonio que inhiben al sistema de transporte, bien el amonio reprime la síntesis del factor extracelular por lo que no se puede acumular en el sobrenadante correspondiente, o bien ocurren los dos efectos simultáneamente.

Figura 18. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el transporte de nitrato en la cepa UW136 de *A. vinelandii*



Células cultivadas en medio BS-KNO<sub>3</sub> 3mM hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento se recogieron por centrifugación, se lavaron en MOPS-KOH y se resuspendieron en: el sobrenadante de un cultivo en nitrato(●), el sobrenadante de un cultivo proveniente de amonio (■), en el sobrenadante de un cultivo en N<sub>2</sub> (○). El experimento comenzó añadiendo KNO<sub>3</sub> a concentración final de 0.5mM, y el consumo de dicho ión se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

### 3. 5. 5. 2. Consumo de nitrato en la estirpe AS270 cultivada en distintas fuentes de nitrógeno

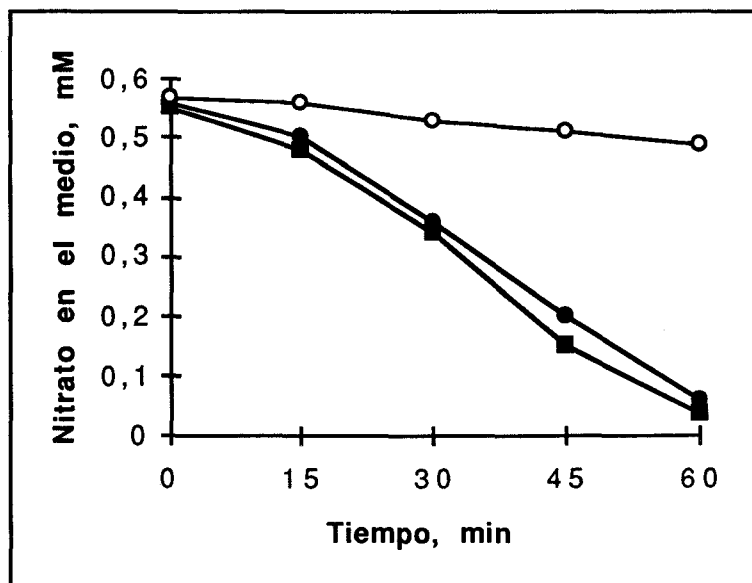
La estrecha relación entre el consumo de nitrato y la actividad de la nitrato reductasa constituye un obstáculo a la hora de determinar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la expresión del sistema de transporte porque las células, al crecer en presencia de amonio o en condiciones de fijación de nitrógeno, carecen de actividad nitrato reductasa y no podemos atribuir la falta de consumo de nitrato al sistema de transporte. Para solventar este obstáculo, hemos utilizado la estirpe AS270 (*nasA::Tn5*) que expresa la nitrato reductasa de forma constitutiva, independientemente de la fuente de



nitrógeno, a partir del promotor de Tn5 insertado en el gen de la nitrito reductasa (*nasA*). Las células se cultivaron en medio BS suplementado con 3 mM de nitrato, amonio o fijando el nitrógeno atmosférico hasta  $DO_{560}=0.7$ , a continuación se les añadió nitrato a concentración final de 0.5 mM y la desaparición del ión se siguió como se describe en Materiales y Métodos.

En la figura 19 se ve que las células cultivadas en presencia de nitrato o en condiciones de fijación de nitrógeno consumen el anión en una hora, mientras que las cultivadas en presencia de amonio no son capaces de consumirlo. Puesto que en esta estirpe la nitrato reductasa está permanentemente inducida en todos los medios, las diferencias observadas en el consumo de nitrato pueden atribuirse al sistema de transporte directamente. Por lo que estos resultados sugieren que el sistema de transporte de nitrato no necesita esta fuente de nitrógeno para inducirse, y se inhibe y/o reprime por amonio.

Figura 19. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el transporte de nitrato en la cepa AS270



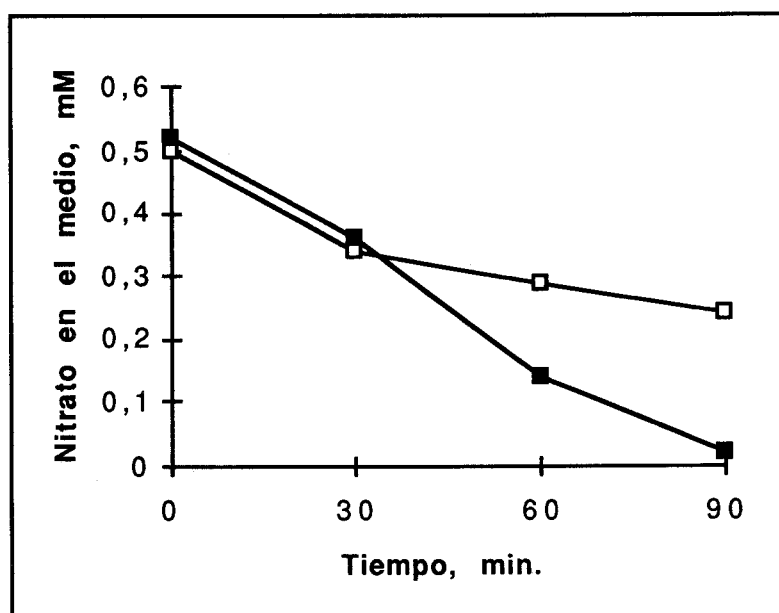
La estirpe AS270 (*nasA::Tn5*) se cultivó hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento en medio BS: sin suplementar (●), suplementado con  $KNO_3$  3mM (■), suplementado con  $CINH_4$  10 mM (○). Se añadió nitrato hasta una concentración final de 0.5 mM y la desaparición de dicho ión se siguió como se indica en Materiales y Métodos.

### 3. 5. 5. 3. Efecto inhibitor del amonio sobre el transporte de nitrato en *A. vinelandii*

Los resultados presentados en la figura 18 mostraron que las células cultivadas en presencia de nitrato, no son capaces de consumir este último cuando se lavan y se resuspenden en el sobrenadante de un cultivo crecido en amonio. Una de las explicaciones posible es que el amonio restante en el medio inhibe la maquinaria de consumo de nitrato. Para probar esta hipótesis, la cepa AS270 se cultivó fijando el nitrógeno atmosférico hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Una vez alcanzada la D.O. apropiada se dividió en dos muestras, a cada una se les añadió 0.5 mM de  $\text{NO}_3\text{K}$  y se inició la medida del consumo de nitrato. A los 30 minutos de que empezara el ensayo, se añadió 2mM de amonio a una de las muestras.

En la figura 20, se muestra que las células a las que añadimos el amonio dejan de consumir el nitrato, lo que sugiere que el amonio ejerce un efecto inhibitor sobre el transporte de nitrato en la bacteria *A. vinelandii*. El efecto inhibitor del amonio sobre el transporte de nitrato se ha descrito en otros organismos como *Anacystis nidulans* (Flores *et al.*, 1980), *Anabaena variabilis* (Bagachi *et al.*, 1985), *Chlamydomonas reinhardtii*. (Florencio y Vega, 1983) y *A. chroococcum* (Revilla *et al.*, 1986b).

Figura 20 Efecto inhibitor del amonio sobre el transporte de nitrato en la bacteria *A. vinelandii*.



Las células de la estirpe AS270, se cultivaron fijando el nitrógeno atmosférico hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento. El cultivo se dividió en dos muestras y el ensayo comenzó al añadir 0.5mM de nitrato a cada una. A los 30 minutos se añadió 2mM de amonio a una de las muestras( □), y a la otra no (■).

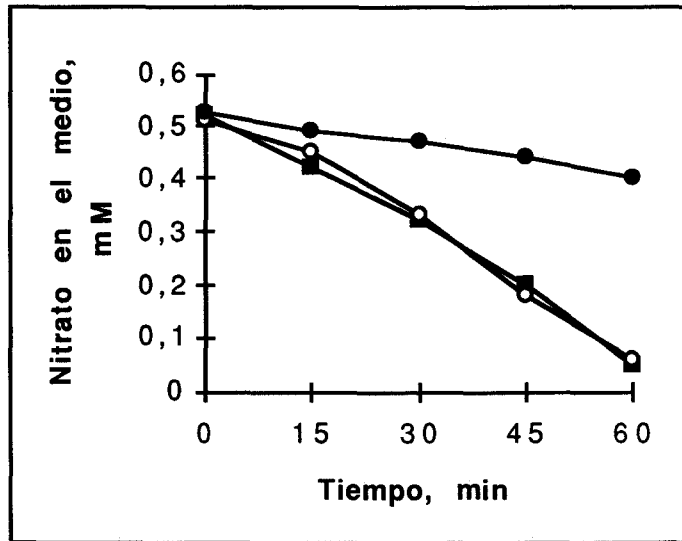
### 3. 5. 6. El papel del operón *nasST* de *A. vinelandii* en el transporte de nitrato

#### 3. 5. 6. 1. El papel del gen *nasS* en el transporte de nitrato.

Del análisis de la secuencia de la proteína NASS y su comparación con las proteínas encontradas en los bancos de datos disponibles, se encontró una gran similitud con proteínas implicadas en el transporte de nitrato: NASF de *K. pneumoniae* y NRTA y NRTC de *Synechococcus* (Gutiérrez *et al.*, 1995). Para averiguar si el gen *nasS* está implicado en dicho transporte, se utilizó la cepa AS602 que tiene una delección en fase en *nasS* de manera que el gen *nasT* se expresa a partir de su propio promotor (Gutiérrez *et al.*, 1995). NASS ejerce un efecto negativo sobre la expresión del operón *nasAB*, por lo que la estirpe AS602 expresa la nitrato reductasa independientemente de la presencia o no de nitrato. Las células se cultivaron en medio BS, suplementado con distintas fuentes de nitrógeno hasta alcanzar una  $DO_{560}=0.7$ , momento en el que se les añadió nitrato a concentración final de 0.5 mM. La desaparición del ión se siguió como se describe en Materiales y Métodos.

La figura 21 muestra que las células cultivadas en presencia de nitrato y en condiciones de fijación de nitrógeno atmosférico consumen el anión en una hora, mientras que las cultivadas en presencia de amonio no. Estos resultados confirman los datos anteriores sobre el efecto de la fuente del nitrógeno en el transporte de nitrato y demuestran que la proteína NASS no está implicada en dicho transporte.

Figura 21. Efecto de la mutación en *nasS* sobre el transporte de nitrato en *A. vinelandii*.



Las células de la cepa AS602 ( $\Delta nasS T^+$ ) se cultivaron en medio BS suplementado con 3mM de KNO<sub>3</sub> (■), CINH<sub>4</sub> 15mM (●) y sin suplementar (○). Cuando alcanzaron una DO<sub>560</sub>=0.7 y se le añadió KNO<sub>3</sub> a concentración final de 0.5 mM. El consumo de dicho ión se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

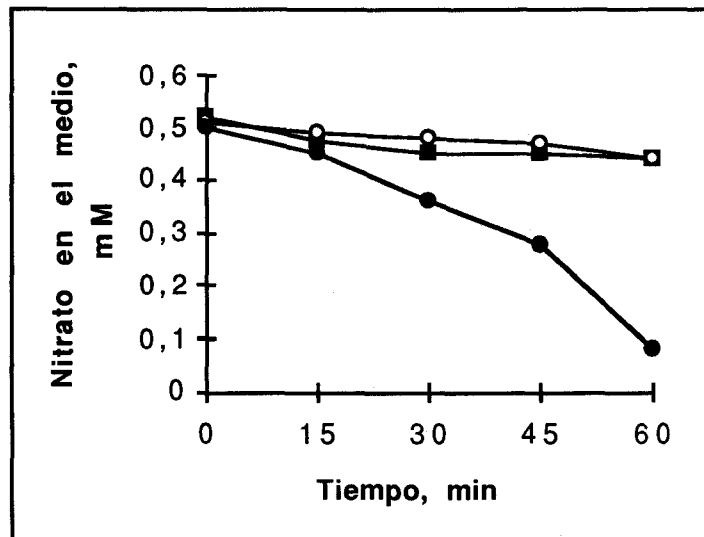
### 3. 5. 6. 2. Efecto de la mutación en *nasT* sobre el transporte de nitrato en *A. vinelandii*.

Los datos anteriormente publicados (Gutiérrez et al., 1994; Gutiérrez et al., 1995) sobre el papel del operón *nasST* en la regulación del operón *nasAB* demostraron que el gen *nasT* es necesario para la transcripción del operón *nasAB*. Para analizar si este gen está también implicado en el transporte de nitrato hemos construido mutantes en el gen *nasT* pero con una nitrato reductasa constitutiva. Para ello hemos transformado las estirpes AS267, y AS270, que tienen insertado Tn5 en distintos puntos del gen *nasA* (por lo que *nasB* se expresa en todas las fuentes de nitrógeno), con ADN cromosómico de la estirpe AS430 (*nasT::Ω*). Los transformantes se seleccionaron en espectinomicina (el marcador de  $\Omega$ ). Los mutantes dobles resultantes (*nasA::Tn5* y *nasT::Ω*) se denominaron AS502, AS503, respectivamente.

Como ya se había demostrado que el nitrato no es necesario para la expresión del sistema de transporte, cultivamos estas estirpes en medio BS hasta DO<sub>560</sub>=0.7, a continuación se les añadió nitrato a concentración final de

0.5 mM y se siguió la desaparición del ión según se describe en Materiales y Métodos. En la figura 22 se muestra que las estirpes AS502 y AS503 no son capaces de consumir el nitrato. Puesto que dichos mutantes tienen actividad nitrato reductasa, llegamos a la conclusión de que NAST es necesario para la expresión del sistema de transporte de nitrato en *A. vinelandii*.

Figura 22. Efecto de la mutación en *nasT* sobre el transporte de nitrato en *A. vinelandii*.



Las estirpes AS270 (●), AS502 (■) y AS503 (○) se cultivaron en medio BS y cuando alcanzaron una  $DO_{560}=0.7$  se les añadió 0.5 mM de nitrato. La desaparición de dicho ión se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

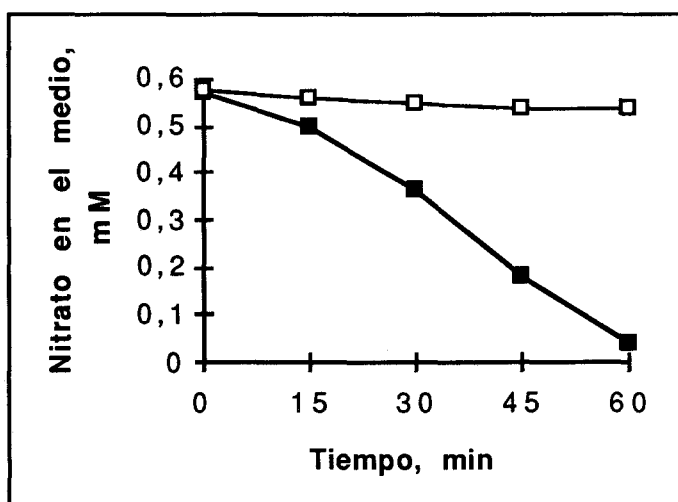
### 3. 5. 7. Efecto de las mutaciones en *ntrA* y en *ntrC* sobre el transporte de nitrato en *A. vinelandii*.

Los datos anteriormente publicados sobre la asimilación de nitrato en la bacteria *A. vinelandii* (Santero *et al.*, 1986; Toukdarian *et al.*, 1986) demostraron que el operón *nasAB* se regula por el sistema *ntr*. Para comprobar si el sistema de transporte de nitrato es dependiente o no del sistema *ntr*, hemos construido dos mutantes, afectados en *ntrA* y en *ntrC*, respectivamente, pero que expresan la nitrato reductasa de forma constitutiva a partir del promotor de Tn5 insertado en *nasA*. Partimos de las estirpes AS441 (*ntrA::Tn5*) y AS435(*ntrC::Tn5*). El primer paso fué sustituir las resistencias a kanamicina de los Tn5 por resistencias a tetraciclina. Para realizar este cambio de resistencias se empleó el transposón Tn5--*tet* que se encuentra en el

plásmido pIZ11. Este último se transfirió a las estirpes AS441 y AS435 seleccionándose colonias resistentes a tetraciclina. Puesto que el plásmido pIZ11 no se replica *A. vinelandii* la única forma de obtener colonias resistentes a tetraciclina es que se produzca un doble hecho de recombinación entre las IS del transposón insertado en el cromosoma y el situado en el plásmido. La sustitución se comprobó por la pérdida de la resistencia a kanamicina y la adquisición de la resistencia a la tetraciclina. Las estirpes *ntrA::Tn5--tet* y *ntrC::Tn5--tet* se denominaron AS506 y AS507 respectivamente. A continuación se transformó la estirpe AS270 (*nasA::Tn5*) con el ADN cromosómico de las estirpes AS506 y AS507, y se seleccionaron colonias resistentes a tetraciclina. Las estirpes *nasA::Tn5*, *ntrA::Tn5--tet* y *nasA::Tn5*, *ntrC::Tn5--tet* se denominaron AS508 y AS509 respectivamente.

Las estirpes AS508 y AS270 (utilizada como control) se cultivaron en medio BS suplementado con urea ya que la AS508 no puede crecer fijando nitrógeno atmosférico. Una vez los cultivos alcanzaron una  $DO_{560}=0.7$  se les añadió nitrato a concentración final de 0.5 mM y se siguió la desaparición del ión como se indica en Materiales y Métodos. En la figura 23 se observa que en la estirpe AS508 no hay transporte de nitrato. Este resultado implica al gen *ntrA* en el transporte de nitrato en *A. vinelandii*.

Figura 23. Efecto de la mutación en *ntrA* sobre el transporte de nitrato en *A. vinelandii*.

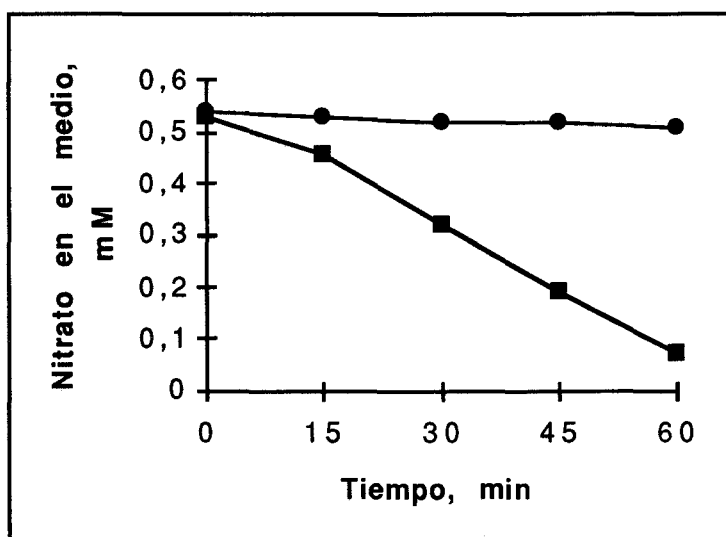


Las estirpes AS270 (*nasA::Tn5*) (■) y AS508 (*nasA::Tn5*, *ntrA::Tn5-tet*) (□) se cultivaron en medio BS suplementado con urea hasta  $DO_{560}=0.7$  y se les añadió

nitrato a concentración final de 0.5 mM. El consumo de dicho ión se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

Como la mutación en el gen *ntrC* no afecta a la fijación de nitrógeno en la bacteria *A. vinelandii*, las estirpes AS270 y AS509 se cultivaron en medio BS hasta  $DO_{560}=0.7$ , se les añadió nitrato a concentración final de 0.5 mM, y se siguió la desaparición del ión. En la figura 24 se observa como la estirpe AS509 no consume nitrato, de lo que se deduce que el gen *ntrC* es necesario para el transporte de nitrato en esta bacteria.

Figura 24 Efecto de la mutación en *ntrC* sobre el transporte de nitrato en *A. vinelandii*.



Las estirpes AS270 (*nasA*:: Tn5) (■) y AS509 (*nasA*:: Tn5, *ntrC* :Tn5-tet) (●) se cultivaron en medio BS hasta alcanzar una  $DO_{560}=0.7$  y luego se les añadió  $KNO_3$  a concentración final de 0.5 mM. El consumo de nitrato se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

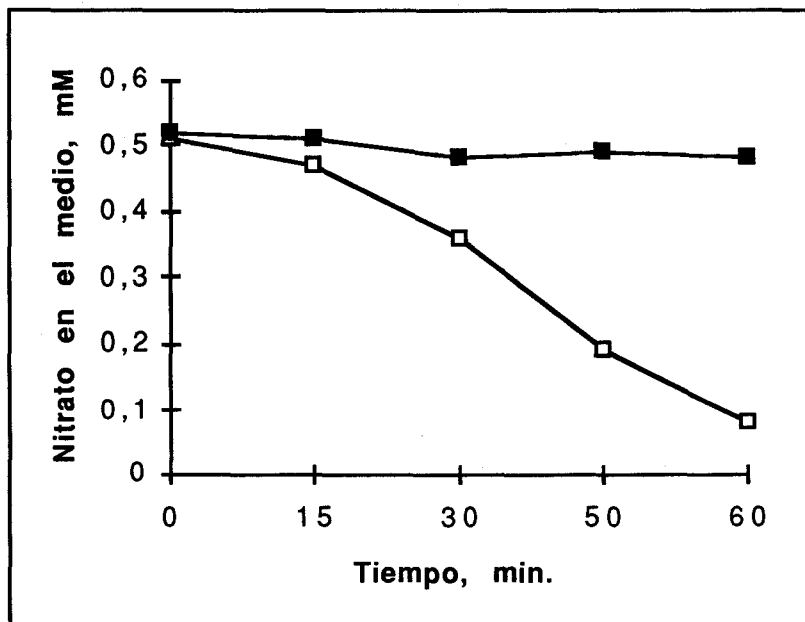
### 3. 5. 8. Consumo de nitrato en los mutantes AS433 ( $\Omega$ insertado detras de *nasT*) y AS513 (*nasH*:: K1XX)

En la Introducción se ha expuesto que en procariotas es frecuente que lo genes estructurales de la nitrito y la nitrato reductasa estén formando agrupaciones génicas con los genes del transporte. En *A. vinelandii* se han identificado dos agrupaciones de genes implicados en la asimilación de

nitrato. Una contiene los genes estructurales de la nitrito y la nitrato reductasa (*nasAB*) así como un gen implicado en la síntesis del sirohemo (*nasH*). La otra contiene dos genes reguladores, un regulador negativo (*nasS*) y un regulador positivo (*nasT*). Pero hasta el momento no se han identificado ni localizado los genes del transporte. Para analizar si están agrupados con *nasABH* o con *nasST* hemos estudiado el consumo de nitrato en la estirpe AS513, mutante *nasH::KIXX* (esta Tesis), y en la estirpe AS433, mutante que lleva una inserción del cassette  $\Omega$  detrás de *nasT* (Gutiérrez, 1994).

Para el estudio de consumo de nitrato en estas estirpes, las células se cultivaron en medio BS-nitrato 3mM hasta alcanzar una  $DO_{560}=0.7$ , a continuación se les añadió nitrato a concentración final de 0.5 mM y se siguió la desaparición del ión como se indica en Materiales y Métodos. En la figura 25 se muestra que la estirpe AS433 no está afectada en el consumo de nitrato mientras que la estirpe AS513 sí lo está. Estos datos demuestran que detrás del gen *nasT* no hay ningún gen implicado en el transporte de nitrato y sugieren que detrás del gen *nasH* podría haber genes implicados en dicho transporte.

Figura 25. Consumo de nitrato en los mutantes AS433 ( $\Omega$  detrás de *nasT*) y AS513 (*nasH::KIXX*)



La estirpes AS433 (□) y AS 513 (■) se cultivaron hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento en medio BS-KNO<sub>3</sub>, 3mM. A continuación se les añadió



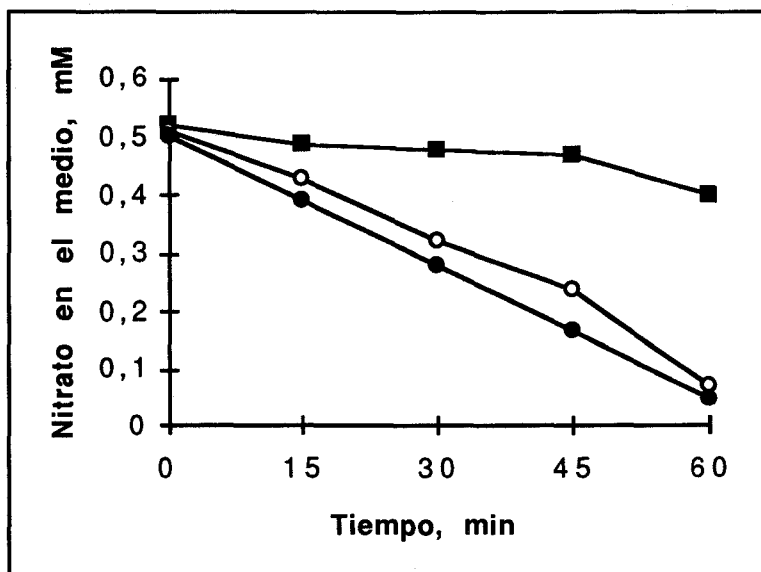
0.5 mM de nitrato, y se siguió la desaparición del ión como se indica en Materiales y Métodos.

### 3. 5. 9. Efecto del choque osmótico sobre el transporte de nitrato en *A. vinelandii*.

Los sistemas de transporte de procariontas se clasifican en dos tipos: (i) sistemas de transporte sensibles a choque osmótico y dependientes de la hidrólisis de ATP y (ii) sistemas resistentes a choque osmótico dependientes energeticamente de gradientes electroquímicos.

En *A. chroococcum* el transporte de nitrato es sensible a choque osmótico (Muñoz-Centeno *et al.*, 1993) y dependiente de ATP (Revilla *et al.*, 1986a; Ruiz *et al.*, 1992). De lo que se ha expuesto en los apartados anteriores sobre las características del transporte de nitrato en *A. vinelandii*, resulta difícil incluirlo en ninguno de los dos tipos de transporte. Puesto que el transporte depende de la acumulación en el sobrenadante de un producto extracelular, cualquier tratamiento de choque osmótico, que implica necesariamente separar la células crecidas de su sobrenadante, va a afectar obviamente al transporte. No obstante nos hicimos la pregunta de si además de dicho producto extracelular era necesario algún componente del periplasma para que el transporte de nitrato se llevara a cabo. Para ello las células de la estirpe silvestre UW136, crecidas hasta la fase exponencial en nitrato, se sometieron a un choque osmótico en sacarosa al 20% siguiendo el procedimiento descrito por Neu *et al.*, (1965) y Muñoz Centeno *et al.*, (1992). Tras este tratamiento una parte se resuspendió en su propio sobrenadante y otra se resuspendió en tampón MOPS-KOH 50mM, pH=7,5 suplementado con sacarosa. El consumo de nitrato se siguió como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 26. Como se observa en esta figura las células sometidas a choque osmótico y resuspendidas en su propio sobrenadante consumen el nitrato en una hora como el control de células no tratadas, mientras que, como se esperaba, las sometidas a choque osmótico pero resuspendidas en tampón no consumen el anión. Estos resultados sugieren que el transporte de nitrato en *A. vinelandii* no es sensible a choque osmótico en el sentido de que no requiere la integridad de la membrana externa sino la acumulación de un producto extracelular.

Figura 26 Consumo de nitrato en células de la cepa UW136 sometidas a choque osmótico



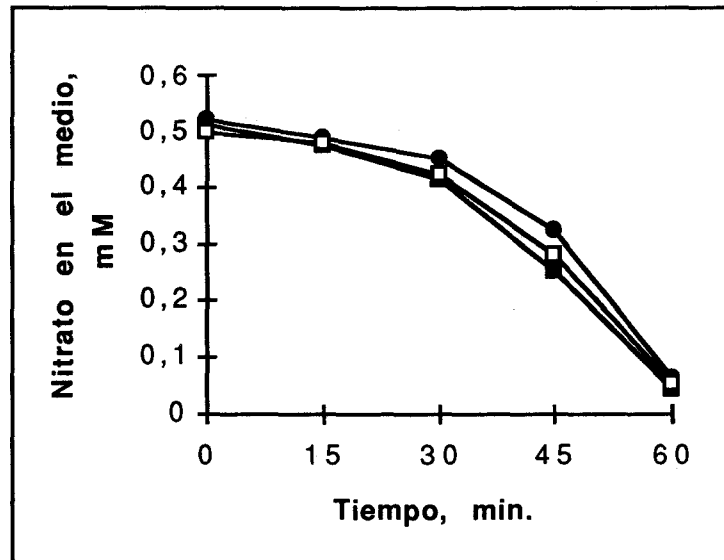
Células de la estirpe UW136, cultivadas en presencia de nitrato hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento, (●) sin tratamiento ninguno, (○) sometidas al choque osmótico y resuspendidas en su propio sobrenadante, (■) sometidas a choque osmótico y resuspendidas en el tampón del ensayo. El consumo de nitrato se inició añadiendo 0,5mM de  $\text{NO}_3\text{K}$  y se siguió su desaparición como se indica en Materiales y Métodos.

### 3. 5. 10. Efecto del DCCD sobre el consumo de nitrato en *A. vinelandii*.

La segunda característica en la que se basa la clasificación de los sistemas de transporte es la dependencia o no de hidrólisis de ATP. Para determinar si el sistema de transporte de nitrato en *A. vinelandii* depende directamente de esta hidrólisis, hemos sometido a la estirpe AS270 a tratamiento con un inhibidor de la ATPasa, el DCCD, y analizado como afecta este tratamiento al consumo de nitrato. Las células se cultivaron en medio BS fijando nitrógeno atmosférico hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento, a continuación el cultivo se dividió en tres partes, una se preincubó en 100  $\mu\text{M}$  de DCCD durante 10 min, otra en etanol absoluto a la concentración en la que se disuelve el DCCD como control y la tercera no se sometió a ningún tratamiento. El ensayo comenzó con la adición a las suspensiones celulares de nitrato a una concentración final de 0.5 mM. El consumo se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

En la figura 27 se muestra que el tratamiento con el DCCD no afecta al transporte de nitrato, de lo que se deduce que el sistema de transporte de nitrato en *A. vinelandii* no depende de la hidrólisis de ATP.

Figura 27 Efecto del DCCD sobre el consumo de nitrato en *A. vinelandii*.



La estirpe AS270 se cultivó en medio BS hasta  $DO_{560} = 0.7$ . La suspensión celular se dividió en tres muestras, a una se le añadió DCCD  $100 \mu\text{M}$  (●), a otra  $30 \mu\text{l}$  de etanol (□), y a la tercera no se le añadió nada (■). El consumo de nitrato se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

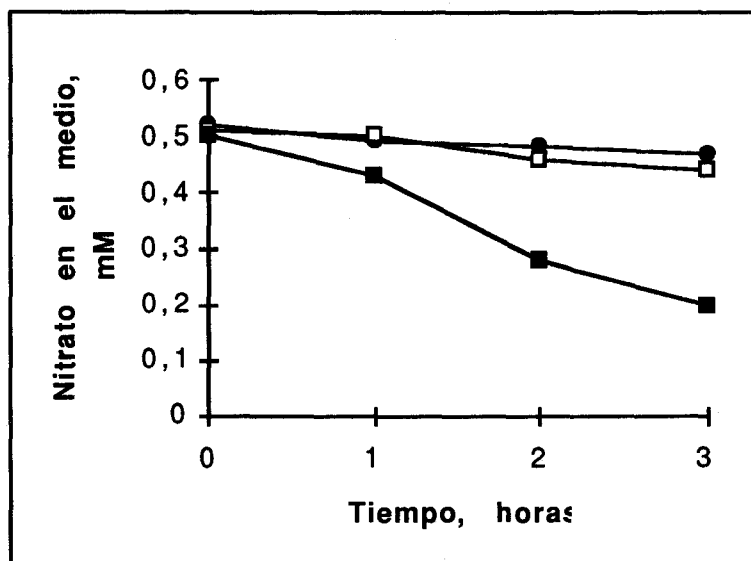
### 3. 5. 11. Efecto del producto extracelular implicado en el transporte de nitrato en *A. vinelandii* sobre el consumo de nitrato en la bacteria *A. chroococcum* sometida a choque osmótico

El transporte de nitrato en *A. vinelandii* depende de un producto que se excreta y acumula en los sobrenadantes de células crecidas fijando nitrógeno o en nitrato. La hipótesis más probable es que este producto capta el nitrato del medio extracelular y lo lleva hasta el sistema de transporte localizado a nivel de membrana plasmática, jugando así un papel parecido al que juegan las proteínas periplásmicas de los sistemas multicomponentes cuando el nitrato se encuentra en el espacio periplásmico. Para probar esta hipótesis estudiamos si dicho factor extracelular podría sustituir al componente periplásmico

perdido en las células de *A. chroococcum* tras tratamiento de choque osmótico. Para ello la estirpe silvestre ATCC4412 de *A. chroococcum* la sometimos a un choque osmótico en sacarosa al 20% (p/v). A continuación las células se resuspendieron en: (i) tampón MOPS-KOH 50mM, pH7.5, más sacarosa al 7% (p/v), (ii) el sobrenadante de un cultivo de la estirpe UW136 de *A. vinelandii* crecido en amonio y suplementado con 7% de sacarosa (iii) el sobrenadante de un cultivo de *A. vinelandii* crecido a expensas del N<sub>2</sub> atmosférico y suplementado con 7% de sacarosa.

En la figura 28 se muestra como las células de *A. chroococcum* resuspendidas en el sobrenadante de un cultivo en condiciones de fijación de nitrógeno atmosférico de células de *A. vinelandii* consumen el nitrato, mientras que las resuspendidas en el tampón o en el sobrenadante del cultivo en presencia de amonio no lo consumen. La reconstitución parcial por parte del producto extracelular de *A. vinelandii* del transporte de nitrato en células de *A. chroococcum* sometidas a choque osmótico apoyan la hipótesis de que el papel de este producto es captar el nitrato y llevarlo hasta el o los componentes de membrana del sistema de transporte.

Figura 28. Efecto del producto extracelular de *A. vinelandii* sobre el consumo de nitrato en células de *A. chroococcum* sometidas a choque osmótico.



Células de *A. chroococcum* se cultivaron en medio BS-KNO<sub>3</sub> 8mM, se sometieron a choque osmótico en sacarosa al 20% (p/v) y a continuación se resuspendieron en: (●)

MOPS-KOH 50mM pH7.5 más sacarosa al 7% (p/v), (■) en el sobrenadante de un cultivo en BS de la estirpe UW136 de *A. vinelandii* más sacarosa al 7% y (□) en el sobrenadante de un cultivo en BS-amonio de la estirpe UW136 de *A. vinelandii* más sacarosa al 7%. El ensayo comenzó añadiendo 0.5 mM de nitrato y la desaparición del ión se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

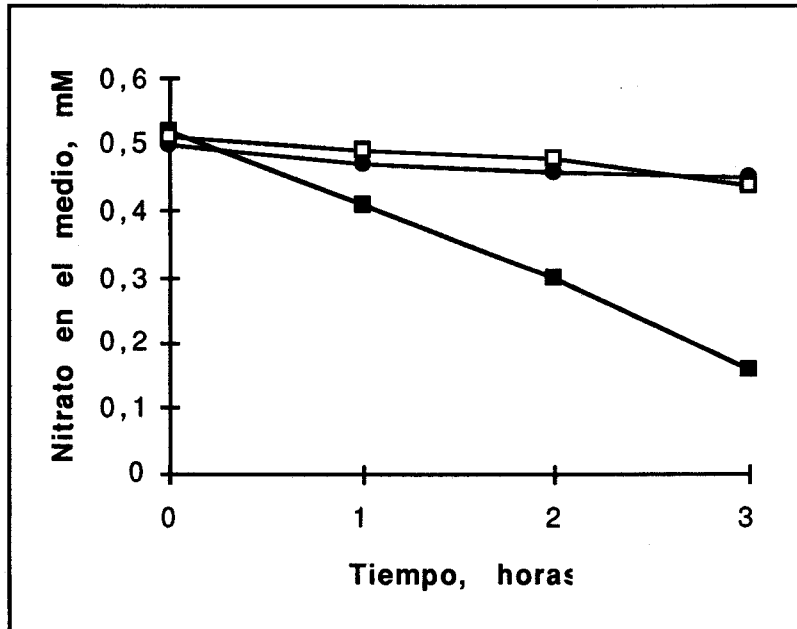
### 3. 5. 12. Papel de los genes *nasT* y *ntrC* en la síntesis de los componentes del sistema de transporte de nitrato en *A. vinelandii*

Asumido que el sistema de transporte de nitrato de *A. vinelandii* comprende un factor extracelular, que equivale al componente periplásmico descrito en otras especies bacterianas, hay que asumir también que se requiere al menos otro componente que debe estar localizado en la membrana, que transporte el nitrato al interior de la célula. Como se dedujo de los resultados presentados en las Figuras 22 y 24 el transporte de nitrato en *A. vinelandii* depende de NAST y de NTRC. En este apartado hemos estudiado el papel de estos genes en la expresión del componente extracelular y del/o de los componente(s) de membrana del sistema de transporte de nitrato.

Para analizar el papel de dichos genes en la expresión del componente extracelular, hemos utilizado el sistema de reconstrucción parcial del transporte en células de *A. chroococcum* sometidas a choque osmótico descrito en el apartado anterior. En este caso la reconstrucción la hemos llevado a cabo con sobrenadantes de la estirpe silvestre y de estirpes mutantes bien en *nasT* bien en *ntrC*. Para ello, la estirpe silvestre UW136 y las estirpes mutantes AS502 (*nasA::Tn5, nasT::Ω*) y AS509 (*nasA::Tn5, ntrC::Tn5-tet*) se cultivaron en condiciones de fijación de nitrógeno hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento, se centrifugaron, y sus sobrenadantes se utilizaron para resuspender las células de *A. chroococcum* sometidas a choque osmótico en sacarosa al 20% (p/v).

En la figura 29, se muestra que las células resuspendidas en los sobrenadantes de las estirpes AS502 y AS509 no son capaces de consumir el nitrato mientras que las resuspendidas en el sobrenadante de la estirpe silvestre UW136 si lo consumen. Estos resultados sugieren que NAST y NTRC son necesarios para la expresión del componente extracelular.

Figura 29. Efecto del sobrenadante de las estirpes AS502 y AS509 sobre el consumo de nitrato en células de *A. chroococcum* sometidas a choque osmótico en sacarosa al 20% (p/v).

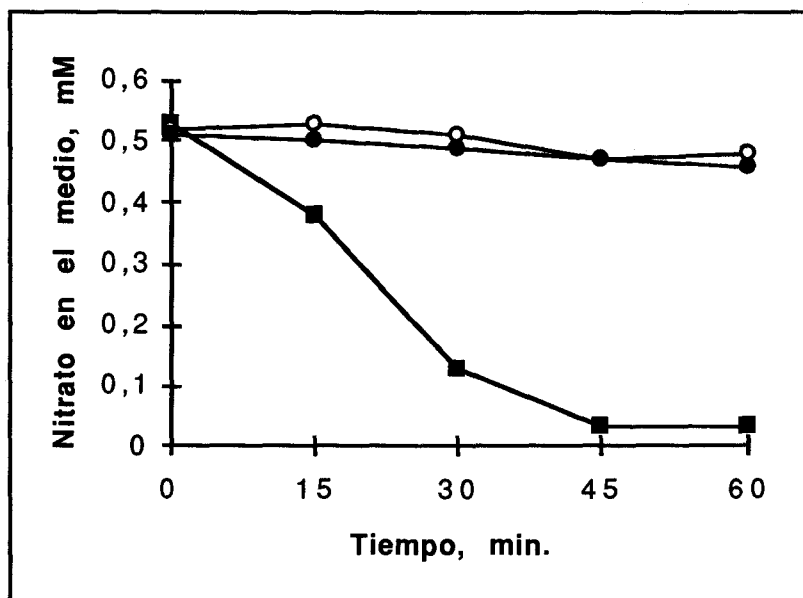


La estirpe ATCC4412 de *A. chroococcum* se cultivó en BS-NO<sub>3</sub>K 8mM, se sometió a un choque osmótico en sacarosa al 20% (p/v). A continuación las células se resuspendieron en los sobrenadantes de cultivos de *A. vinelandii* crecidos fijando el nitrógeno atmosférico, (■) de la estirpe silvestre UW136, (□) de la estirpe AS502 (*nasA::Tn5*, *nasT::Ω*) y (●) de la estirpe AS509 (*nasA::Tn5*, *ntrC::Tn5-tet*). El experimento comenzó añadiendo 0.5mM de nitrato y la desaparición del ion se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

Para analizar el papel de NAST y NTRC en la expresión del o de los componentes de membrana del sistema de transporte hemos utilizado las estirpes AS502 y AS509. Las células se cultivaron fijando nitrógeno atmosférico hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento, se centrifugaron, se lavaron con MOPS-KOH y se resuspendieron en el sobrenadante de un cultivo en las mismas condiciones de la estirpe silvestre UW136. El ensayo del consumo de nitrato comenzó al añadir 0.5 mM de nitrato, la desaparición del ión se siguió como se describe en Materiales y Métodos.

En la figura 30 se observa como las estirpes AS502 y AS509, mutantes en los genes *nasT* y *ntrC*, respectivamente, no consumen el nitrato aunque se les proporcione el componente extracelular presente en el sobrenadante de la estirpe silvestre. Estos resultados sugieren que NAST y NTRC son necesarios también para la expresión del /o de los componente(s) de membrana del sistema de transporte de nitrato de *A. vinelandii*.

Figura 30. Consumo de nitrato en las estirpes AS502 y AS509 suplementadas con el producto extracelular.



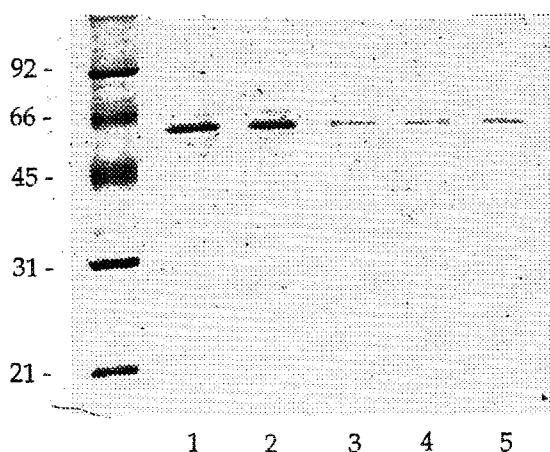
Células de las estirpes AS270 (■), AS502 (●) y AS509 (○), cultivadas fijando nitrógeno atmosférico hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento, se recogieron por centrifugación, se lavaron y resuspendieron en el sobrenadante de células de la estirpe silvestre UW136 cultivadas en las mismas condiciones. El ensayo comenzó añadiendo 0,5 mM de nitrato y la desaparición del anión se siguió como se indica en Materiales y Métodos.

### 3. 5. 13. Precipitación del producto extracelular implicado en el transporte de nitrato en *A. vinelandii*

Los datos anteriores sugieren que el transporte de nitrato en *A. vinelandii* está mediado por un sistema localizado a nivel de membrana y además requiere un producto extracelular. Este último probablemente de

naturaleza proteica capta el nitrato en el medio exterior y lo lleva hasta el sistema de transporte de membrana. Por esta razón queriamos ver si dicho producto podría visualizarse en geles de proteínas. Para ello hemos cultivado las estirpes AS502 y AS509 en medio BS fijando nitrógeno así que la estirpe UW136 en las distintas fuentes de nitrógeno. Los cultivos se recogieron en fase exponencial media de crecimiento, se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para precipitar dicho producto como se indica en materiales y métodos. En la figura 31 se observa un polipéptido de masa molecular 60 KDa abundante en los sobrenadantes de la estirpe UW136 cultivada en medio BS y BS-nitrato (carriles 1-2) y presentes en muy baja cantidad en los sobrenadantes de la misma estirpe cultivada en presencia de amonio como en los de las estirpes AS502 y AS509 cultivadas en medio BS. Este resultado confirma los datos anteriores del papel de los genes *nasT* y *ntrC* en la síntesis del producto extracelular y sugiere que el amonio reprime dicha síntesis.

**Figura 31.** Efecto de la fuente de nitrógeno y de las mutaciones en los genes *nasT* y *ntrC* en la síntesis del producto extracelular de *A. vinelandii*.



Sobrenadantes de los cultivos de la estirpe UW136 cultivada en medio BS (carril 1), BS-nitrato (carril 2) y en BS-amonio (carril 3) así que los de las estirpes AS502 (carril 4) y AS509 (carril 5) cultivadas en medio BS que se precipitaron con mismo volumen de TCA al 20 %.



#### **4. BIBLIOGRAFIA**

- Ali B. H. y C. R. Hipkins**, 1985. Nitrate assimilation in the Basidiomycete yeast *Sporolomyces roseus*. J. Gen. Microbiol, **131**: 1867-1874.
- Ames G.F-L. y Higgins.**, 1983. The organization, mechanism of action, and evolution of periplasmic transport systems. Trends Biochem. Sci., 97-100.
- Ames G.F-L. y Joshi A.**, 1990. Energy coupling in bacterial periplasmic permeases. J. Bacteriol. **172**: 4133-4137.
- Ames G.F-L.**, 1985. The histidine transport system of *Salmonella typhimurium*. Curr. Top. Membr. Transp. **23**: 103-119.
- Ames G.F-L.**, 1986. Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism and evolution. Ann. Rev. Biochem. **55**: 397-425.
- Ames G.F-L.**, 1988. Structure and mechanism of bacterial periplasmic transport systems. J. Bioenerg. Biomembr. **20**: 1-18.
- Andriesse, X., H. Bakker y P. Weisbeek**, 1990. Analysis of nitrate reduction genes in cyanobacteria. En: Inorganic nitrogen in plants and microorganisms. WR Ullrich, C. Rigeno, A. Fuggi y PJ Aparicio (eds.). Springer, Berlin, pp. 303-307.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith y K. Struhl**, 1989. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York.
- Bali A., G. Blanco, S. Hill y C. Kennedy**, 1992. Excretion of ammonium by ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. Appl. Envir. Microbiol., **58**: 1711-1718.
- Bárcena J.A.**, 1980. Enzimas de la asimilación del amonio en *A. chroococcum*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Barea, J.M. y M.G. Brown**, 1974. Effect of plant growth produced by *Azotobacter paspali* related to synthesis of plant growth regulating substances. J. Appl. Bacteriol., **37**: 583-593.
- Bender, R.A. y B. Friedrich**, 1990. Regulation of assimilatory nitrate reductase formation in *Klebsiella aerogenes* W70. J. Bacteriol., **172**: 7256-7259.

- Berger E. A. y Heppel L.A.**, 1974. Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **249**: 7747-7755
- Berger E. A.**, 1973. Different mechanisms of energy coupling for the active transport of proline and glutamine en *Escherichia coli*. *Proc Nalt. Acad. Sci. USA* **70**: 1514-1518.
- Betlach M.R., Tiedje J.M. y Firestone R.B.**, 1981. Assimilatory nitrate uptake in *Pseudomonas fluorescens* studied using nitrogen-13. *Arch. Microbiol.* **129**: 135-140.
- Beynon J., A. Ally, M. Cannon, F. Cannon, M. Jacobson, V. Cash y D. Dean**, 1987. Comparative organization of nitrogen fixation-specific genes from *Azotobacter vinelandii* and *Klebsiella pneumoniae*: DNA sequence of *nifUSV* genes. *J. Bacteriol.*, **169**: 4024-4069.
- Bilbao M.M., Gabas J.M. y Serra J.L.**, 1981. Inhibition of nitrite uptake in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by nitrate, ammonium ions and some L-amino acids. *Biochem. Soc. Trans.* **9**: 476.
- Bischoff D.S. y G.W. Ordal**, 1991. Sequence and characterization of *Bacillus subtilis* CheB, a homolog of *Escherichia coli* CheY, and its role in a different mechanism of chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, **266**: 12301-12305.
- Bishop P.E., D.M.L. Jarlenski y D.R. Hetherington**, 1980. Evidence for alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Nalt. Acad. Sci. USA*, **77**: 7342-7346.
- Bishop P.E. y W.J. Brill**, 1977. Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutants strains unable to fix nitrogen. *J. Bacteriol.*, **130**: 954-956.
- Bishop P.E., J.K. Gordon, V.K. Shah y W.J. Brill**, 1977. Genetic engineering for nitrogen fixation. Holleander (ed.). pp. 67-70. Plenum, Nueva York.
- Bishop P.E., M.A. Supiano y W.J. Brill**, 1977b. Thecnique for isolating phage for *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**: 1007-1008.
- Bishop P.E., M.E. Hawins y R.R. Eady**, 1986a. N<sub>2</sub>-fixation in Mo-deficient continous culture of a strains of *Azotobacter vinelandii* carrying a deletion of the structural genes for nitrogenase (*nifHDK*). *Biochem. J.*, **238**: 437-442.

- Bishop P.E., R. Premakumar, D.R. Dean, M.R. Jacobson y J.R. Chisnell, 1986b.** Nitrogen fixation for *Azotobacter vinelandii* strains having deletions in structural genes for nitrogenase. *Science*, **232**: 92-94.
- Blanco Sicre G., 1989.** Construcción de un mapa de ligamiento de *Azotobacter vinelandii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Blanco G., F. Ramos, J.R. Medina y M. Tortolero, 1990.** A chromosomal linkage map of *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.*, **224**: 241-247.
- Blanco G., F. Ramos, J.R. Medina, J.C. Gutiérrez y M. Tortolero, 1991b.** Conjugal retrotransfer of chromosomal markers in *Azotobacter vinelandii*. *Current Microbiol.*, **22**: 241-246.
- Blanco G., J.C. Gutiérrez, F. Ramos y M. Tortolero, 1991a.** Isolation and characterization of R-primes of *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **80**: 213-216.
- Blanche F., L. Debussche, D. Thibaut, J. crouzet y B. cameron, 1989.** Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: uroporphyrinogenIII methyltransferase from *Pseudomonas denitrificans*. *J. Bacteriol.*, **171**: 4222-4231.
- Blasco F., C. Iobbi, G. Giordano, M. Chippaux y V. Bonnefoy, 1989.** Nitrate reductase of *Escherichia coli*: completion of the nucleotide sequence of the *nar* operon and reassessment of the role of the a and b subunits in iron binding and electron transfer. *Mol. Gen. Genet.*, **218**: 249-256.
- Blasco F., C. Iobbi, J. Ratouchniak, V. Bonnefoy y M. Chippaux, 1990.** Nitrate reductase of *Escherichia coli*: Sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJI* operon. *Mol. Gen. Genet.*, **222**: 104-111.
- Blasco F., F. Nunzi, J. Pommier, R. Brasseur, M. Chippaux y G. Giordano, 1992a.** Formation of active heterologous nitrate reductases between nitrate reductases A and Z of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **6**: 209-219.
- Blasco F., J. Pommier, V. Augier, M. Chippaux y G. Giordano, 1992b.** Involvement of the *narJ* or *narW* gene product in the formation of active nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **6**: 221-230.

- Bothe H. y K.P. Häger**, 1981. Electron transport to asimilatory nitrate reductase in *Azotobacter vinelandii*. Z. Naturforsch., **36**: 1030-1035.
- Brigle K.E., M.C. Weiss, W.E. Newton y D.R. Dean**, 1987. Products of the iron-molybdenum cofactor-specific biosynthetic genes, *nifE* and *nifN*, are structurally homologous to the products of the nitrogenase molybdenum-iron protein genes, *nifD* and *nifK*. J. Bacteriol., **169**: 1547-1553.
- Brock T.D. y M.T. Madigan**, 1988. Biology of microorganisms. Ed. Prentice-Hall, New Jersey. pp. 572-631.
- Brown C.M., McDonald D.S. y Meers J.L.**, 1974. Physiological aspects of microbial inorganic metabolism. Advanc. Microbiol. Physiol. **11**: 1-45.
- Caballero F.J., Moreno-Vivián C., Castillo F. y Cárdenas J.**, 1986. Nitrite uptake system in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* E1F1. B.B.A. **848**: 16-23.
- Cali B.M., J.L. Micca y V. Stewart**, 1989. Genetic regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5al. J. Bacteriol., **171**: 2666-2672.
- Cameron B., K. Briggs, S. Pridmore, G. Brefort y J. Crouzet**, 1989. Cloning and analysis of genes involved in coenzyme B<sub>12</sub> biosynthesis in *Pseudomonas denitrificans*. J. Bacteriol., **171**: 547-557.
- Candau P**, 1979. Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Cawse P.A.**, 1967. The determination of nitrate in soil solution by ultraviolet spectrophotometry. Analyst, **92**: 311-315.
- Clegg R.A.**, 1976. Purification and some properties of nitrate reductase (EC 1.7.99.4) from *Escherichia coli* K12. Biochem. J., **153**: 533-541.
- Contreras A. y J. Casadesús**, 1987. Tn10 mutagenesis in *Azotobacter vinelandii*. Mol. Gen. Genet., **209**: 276-282.
- Contreras A., M. Drummond, A. Bali, G. Blanco, E. García, G. Bush, C. Kennedy y M. Merrick**, 1991a. The product of the nitrogen fixation

regulatory gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* is functionally and structurally homologous to the uridylyltransferase encoded by *glnD* in enteric bacteria. *J. Bacteriol.*, **173**: 7741-7749.

**Contreras A., R. Maldonado y J. Casadesús**, 1991b. Tn5 mutagenesis and insertion replacement in *Azotobacter vinelandii*. *Plasmid*, **25**: 76-80.

**Córdoba F., Cárdenas J. y E. Fernández**, 1986. Kinetic characterization of nitrite uptake and reduction by *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Plant Physiol.* **82**: 904-908.

**Cove D.J.**, 1979. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol. Rev.* **54**: 291-303.

**Crawford N.M., H.N. Arst**, 1993. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu. Rev. Genet.*, **27**: 115-146.

**Crawford N.M. y W.H. Campell**, 1990. Fertile fields. *The Plant Cell*, **2**: 829-835.

**Crouzet J., L. Cauchois, F. Blanche, L. Debussche, D. Thibaut, M-C. Rouyez. S. Rigault, J-F. Mayaux y B. Cameron**, 1990. Nucleotide sequence of a *Pseudomonas denitrificans* 5.4-Kilobase DNA fragment genes encoding S-adenosyl-L-methionine: uroporphyrinogen III methyltransferase and cobyrinic acid a, c-diamide synthase. *J. Bacteriol.*, **172**: 5968-5979.

**Chaudhry G.R. y C.H. MacGregor**, 1983a. Cytochrome *b* from *Escherichia coli* nitrate reductase. Its properties and association with the enzyme complex. *J. Biol. Chem.*, **258**: 5819-5927.

**Chaudhry G.R. y C.H. MacGregor**, 1983b. *Escherichia coli* nitrate reductase subunit A: its role as the catalytic site and evidence for its modification. *J. Bacteriol.*, **154**: 387-394.

**Chisnell J. R., R. Premakumar, P. E. Bishop**, 1988. Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **170**: 27-33.

**David M., Daveran M-L., Batut J., Dedieu A., Domergue O. et al.**, 1988. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell*, **54**: 671-83.

- De Mot R., G. Schoofs, I. Nagy y J. Vanderleyden, 1994. Sequence of the *cobA* gen encoding S-adenosyl-L-methionine: uroporphyrinogen III methyltransferase of *Pseudomonas fluorescens*, *Gene*, **150**:1, 199-200.
- Dean D.R. y K.E. Brigle, 1985. *Azotobacter vinelandii* *nifD*- and *nifE*-encoded polypeptides share structural homology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 5720-5723.
- Devereaux, J., P. Haeberli y O. Smithies, 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.*, **12**: 387-395.
- Devereux J., P. Haeberli y O. Smithies, 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.*, **12**: 387-395.
- Doddena H. y Telkamp G.P., 1979. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. II-Kinetics. *Physiol. Plant.* **45**: 332-338.
- Doran J.L. y W.J. Page, 1983. Heat sensitivity of *Azotobacter vinelandii* genetic transformation. *J. Bacteriol.*, **155**: 159-168.
- Doran J.L., W.H. Bingle, K.L. Roy, K. Mitsuka y W.J. Page, 1987. Plasmid transformation of *Azotobacter vinelandii* OP. *J. Gen. Microbiol.*, **133**: 2059-2072.
- Drew R. y Lowe N., 1989. Positive control of *Pseudomonas aeruginosa* amidase sythesis is mediated by a transcription antitermination mechanism *J. Gen. Microbiol.* **135**: 817-823.
- Duff J.T. y O. Wyss, 1961. Isolation and characterization of a new series of *Azotobacter* bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.*, **24**: 273-289.
- Egan S.M. y V. Stewart, 1991. Mutational analysis of nitrate regulatory gene *narL* in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.*, **173**: 4424-4432.
- Falkowski P.G., 1975. Nitrate uptake in marine phytoplankton: (nitrate, chloride)-activated adenosine triphosphatase from *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **11**: 3223-3226.
- Feng D.F. y R.F. Doolittle, 1987. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. Mol. Evolution*, **25**: 351-360.

- Fernández E., R.A. Schnell, L.P.W. Ranum, S.C. Hussey, C.D. Siflow y P.A. Lefebvre, 1989. Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Nalt. Acad. Sci. USA **86**: 6449-6453.
- Florencio F.J., J.M. Vega, 1983. Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. Photoproduction of ammonium. Planta, **158**: 288-293.
- Flores E., A. Herrero y M.G. Guerrero, 1987. Nitrite uptake and its regulation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. B. B. Acta. **896**: 103-108.
- Flores E., M.G. Guerrero y M. Losada, 1980. Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. Arch. Microbiol., **128**: 137-144.
- Flores E., JL Ramos, A. Herrero y M.G. Guerrero, 1983. Nitrate reductase assimilation by cyanobacteria. En: Photosynthetic Prokaryotes: Cell Differentiation and Function. GC Papageorgiou y L. Parker (eds.). Elsevier, Amsterdam. pp. 363-387.
- Fuggi A., 1985. Mechanism of proton-linked nitrate uptake in *cyanidium caldarium*, an acidophilic non vacuolated alga. B. B. Acta. **815**: 392-398.
- Fuggi A., 1989. Short-term regulation of nitrate uptake by a "pump and leak" mechanism in the acidophilic nonvacuolated alga *Cyanidium caldarium*. B. B. Acta **974**: 141-148.
- Galván A., A. Quesada y E. Fernández, 1996. Nitrate and nitrite are transported by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Biol. Chem., **271**: 2088-2092.
- Gangeswaran R., D.J. Lowe y R.R. Eady, 1993. Purification and characterization of the assimilatory nitrate reductase of *Azotobacter vinelandii*. Biochem. J., **289**: 335-342.
- Garde J., J.R. Kinghorn y A.B. Tomsett, 1995. Site directed mutagenesis of nitrate reductase from *Aspergillus nidulans*. Identification of some essential and some nonessential aminoacids among conserved residues. J. Biol. Chem., **270**: 6644-6650.



- Garrett R.M., K.V. Rajagopalan**, 1996. Site-directed mutagenesis of recombinant sulfite oxidase: identification of cysteine 207 as a ligand of molybdenum. *J. Biol. Chem.*, **271**:13, 7387-91.
- Gilles H. y R.K. Thauer**, 1983. Uroporphyrinogen III, an intermediate in the biosynthesis of the nickel-containing F<sub>430</sub> in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Eur. J. Biochem.*, **135**: 109-112.
- Glick B.R., H.E. Brooks y J.J. Pasternak**, 1985. Transformation of *Azotobacter vinelandii* with plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, **162**: 276-279.
- Goldman B. S., J.T. Lin y V. Stewart**, 1994. Identification and structure of the *nasR* gene encoding a nitrate-and nitrite-responsive positive regulator of *nasFEDCBA* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5al. *J. Bacteriol.* **176**: 5077-5085.
- Goldsmith J., J.P. Lovoni, C.L. Norberg y I.H. Segel**, 1973. Regulation of nitrate uptake in *Penicillium chrysogenum* by ammonium ion. *Plant Physiol.* **52**: 362-367.
- González-Lopez J., V. Salmerón, M.V. Martínez-Toledo, F. Ballesteros y A. Ramos-Cormenzana**, 1986. Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC12837 in chemically defined media and dialyzed soil media. *Soil. Biol. Biochem.*, **18**: 119-120.
- Gordon J.K. y M.R. Jacobson**, 1983. Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutant strains with potential as bacterial fertilizer. *Can. J. Microbiol.*, **29**: 973-978.
- Goyal S.S. y R.C. Huffaker**, 1986. The uptake of NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub> by intact wheat (*Triticum aestivum*) seedling. I-Induction and Kinetics of transport systems. *Plant Physiol.* **82**: 1051-1056.
- Guerrero M.G., J. M. Vega , E. Leadbetter y M. Losada**, 1973. Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Arch. Microbiol.*, **91**: 287-304.
- Gussin G.N., C.W. Ronson y F.M. Ausubel**, 1986. Regulation of nitrogen fixation genes. *Ann. Rev. Genet.*, **20**: 567-591.

- Gutiérrez J.C., F. Ramos, L. Ortner, y M. Tortolero, 1995.** *nasST*, Two genes involved in the induction of the assimilatory nitrite-nitrate reductase operon (*nasAB*) of *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.* **18**: 579-591.
- Gutiérrez J.C., 1994.** Regulación del operón *nasAB* de asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii* y *Rhizobium fredii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Hales B.J., E.E. Case, J.E. Morningstar, M.F. Dzeda y L.A. Mauterer, 1986.** Isolation of a new V-containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, **25**: 7251-7255.
- Hamdi Y.A., 1985.** La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. Boletín de Suelos de la FAO, nº 49 pp 75-82.
- Harborne N.R., L. Griffiths, S.T.W. Busby y Cole J.A., 1992.** Transcriptional control, translation and function of the products of the five open reading frame of the *Escherichia coli nir* operon. *Mol. Microbiol.*, **6**: 2805-2813
- Hattori A., 1962.** Adaptative formation of nitrate reducing system in *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.*, **3**: 371-377.
- Hattori A. y J. Myers, 1967.** Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. II. Reduction of nitrate to nitrite. *Plant Cell Physiol.*, **8**: 371-337.
- Hegazi N.A., M. Edi, R.S. Farag y M. Monib, 1974.** Asymbiotic N<sub>2</sub>-fixation in the rhizosphere of sugarcane planted under semi-arid conditions of Egypt. *Per. Ecol. Biol. Sci.*, **16**: 23-37.
- Herrero A. y M.G. Guerrero, 1986.** Regulation of nitrite reductase in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 2463-2468.
- Herrero A., E. Flores y M.G. Guerrero, 1981.** Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. strain 7119 and *Nostoc* sp. strain 6719. *J. Bacteriol.*, **145**: 175-180.
- Herrero A., E. Flores y M.G. Guerrero, 1985.** Regulation of nitrate reductase cellular levels in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* and *Synechocystis* sp. *FEMS Microbiol. Lett.*, **26**: 21-25.

- Higgins C.F., P.D. Haag, K. Nikaido, F. Ardeshir, G. García y G.F-L. Ames, 1982. Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature* 298: 723-727.
- Higgins C.F., I.D. Hiles, G.P.C. Saldmon, D.R. Gill, J.A. Downie, I.J. Evens, I.B. Holland, L. Gray, S.D. Buckel, A.W. Bell y M.A. Hermodson, 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*, 323: 448-450.
- Hirschman J., P.K. Wong, K. Sei, J. Keener y S. Kustu, 1985. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric activate *glnA* transcription *in vitro*: Evidence that the *ntrA* product is a sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 7525-7529.
- Hochstein L.I. y G.A. Tomlinson, 1988. The enzymes associated with denitrification. *Ann. Rev. Microbiol.*, 42: 231-261.
- Holmes D.S. y M. Quigley, 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Ana. Biochem.*, 114: 193-197.
- Horan N.J., T.R. Jarman y E.A. Dawes, 1983. Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 2985-2990.
- Horan N.J., T.R. Jarman y E.A. Dawes, 1983. Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 2985-2990.
- Ibarlucea J.M., J.M. Macarulla y J.L. Serra, 1981. Characterization of nitrate and nitrite uptake in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Biochem. Soc. Transds.*, 9: 477.
- Ida S. y B. Mikami, 1983. Purification and characterization of assimilatory nitrate reductase from cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol.*, 24: 649-658.
- Imperial J., R.A. Ugalde, V.K. Shah y W.J. Brill, 1985. Mol<sup>-</sup> mutants of *Klebsiella pneumoniae* requiring high levels of molybdate for nitrogenase activity. *J. Bacteriol.*, 163: 1285-1287.

- Iobbi C., C.L. Santini, V. Bonnefoy y G. Giordano, 1987.** Biochemical and immunological evidence for a second nitrate reductase in *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.*, **168**: 451-459.
- Iobbiz-Nivol C., C.L. Santini, F. Blasco y G. Giordano, 1990.** Purification and further characterization of the second nitrate reductase of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.*, **188**: 679-687.
- Iuchi S. y E.C.C. Lin, 1987.** Molybdenum effector of fumarate reductase repression and nitrate reductase induction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **169**: 3720-3725.
- Jackson M.A., J.B. Jackson y S.J. Ferguson, 1981.** Direct observation with an electrode of uncoupler sensitive assimilatory nitrate uptake by *Rhodospseudomonas capsulata*. *FEBS Lett.*, **136**: 275-278.
- Jer-Yuarn Wu, L.M. Siegel y N.M. Kredich, 1991.** High-level expression of *Escherichia coli* NADPH-sulfite reductase: requirement for a cloned *cysG* plasmid to overcome limiting siroheme cofactor. *J. Bacteriol.*, **173**: 325-333.
- Jeter R.M. y J.R. Roth, 1987.** Cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **169**: 3189-3198.
- Jeter R.M., B.M. Olivera y J.R. Roth, 1984.** *Salmonella typhimurium* synthesizes cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) de novo under anaerobic growth conditions. *J. Bacteriol.*, **159**: 206-213
- Joerger R.D. y P.E. Bishop, 1988.** Nucleotide sequence and genetic analysis of the *nifB-nifQ* region from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **170**: 1475-1487.
- Joerger R.D., R. Premakumar y P.E. Bishop, 1986.** Tn5-induced mutants of *Azotobacter vinelandii* effected in nitrogen fixation under Mo-deficient and Mo-sufficient conditions. *J. Bacteriol.*, **168**: 673-682.
- Johann S. y SM. Hinton, 1987.** Cloning and nucleotide sequence of the *chLD* locus. *J. Bacteriol.*, **169**: 1911-1916.
- Johnson J.L., N.R. Bastian y K.V. Rajagopalan, 1990.** Molybdopterin guanine dinucleotide, a modified form of molybdopterin identified in the

- molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* forma specialis denitrificans. Proc. Nalt. Acad. Sci. USA, **87**: 3190-3194.
- Johnstone I.L., P.C. McCabe, P. Greaves, S.J. Gurr, G.E. Cole, M.A.D. Brown, S.E. Unkless, A.J. Clutterbuck, J.R. Kinghorn y M.A. Innis, 1990.** Isolation and characterization of the *crnA-niiA-niaD* gene cluster for the nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. Gene, **90**: 181-192.
- Kaback H.R., 1983.** The *lac* carrier-protein in *Escherichia coli*. J. Membr. Biol. **76**: 95-112.
- Kalman L.V. y R.P. Gunsalus, 1990.** Nitrate- and molybdenum-independent signal transduction mutations in *narX* that alter regulation of anaerobic respiratory genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **172**: 7049-7056.
- Karunakar P.D. y T. Rajgopalan, 1936.** *Azotobacter* inoculation of seeds of cereals-experiments with sorghum. Proc. Econ. Biologists., pp. 1-10.
- Keener J., P. Wong, D. Popham, J. Wallis y S. Kustu, 1987.** A sigma factor and auxiliary proteins required for nitrogen-regulated transcription in enteric bacteria. En: RNA polymerases and the regulation of transcription, pp 159-175. Editado por W.S. Reznikoff *et al.* Elsevier Science Publishing Co.
- Kennedy C. y A. Toukdarian, 1987.** Genetics of *Azotobacter*: Applications to nitrogen fixation and related of metabolism. Ann. Rev. Microbiol., **41**: 227-258.
- Kennedy C., R. Gamal, R. Humphrey, J. Ramos, K. Brigle y D. Dean, 1986.** *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*. Characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. Mol. Gen. Genetic., **205**: 318-325.
- Kerppola R.E., V.K. Shyamala, P. Klebba y G.F-LAmes, 1991.** The membrane-bound proteins of periplasmic permeases from a complex. J. Biol. Chem., **266**: 9857-9865.
- Kikuchi H., M. Aichi, I. Suzuki y T. Omata, 1996.** Positive regulation by nitrite of the nitrate assimilation operon in the cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC7942 and *Plectonema boryanum*. J. Bacteriol., **178**: 5822-5825.

- Laemmli U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lara C., J.M. Romero y M.G. Guerrero**, 1987. Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* **169**: 4376-4378.
- Leeper F.J.**, 1989. The biosynthesis of porphyrins, chlorophylls and vitamin B<sub>12</sub>. *Nat. Prod. Rep.*, **6**: 171-203.
- Lin J.T. y V. Stewart**, 1996. Nitrate and nitrite-mediated transcription antitermination control of *nasF* (Nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *J. Mol. Biol.*, **256**: 423-435.
- Lin L. P. y H. L. Sadoff**, 1968. Encystment and polymer production of *Azotobacter vinelandii* in the presence of b-hidroxibutirato. *J. Bacteriol.*, **95**: 2336-2343.
- Lin L.P. y H.L. Sadoff**, 1968. Encystment and polymer production of *Azotobacter vinelandii* in the presence of  $\beta$ -hidroxibutirato. *J. Bacteriol.*, **95**: 2336-2343.
- Lin J.T., B.S. Goldman y V. Stewart**, 1993. Structures of genes *nasA* and *nasB*, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *J. Bacteriol.*, **175**: 2370-2378.
- Lin J.T., B.S. Goldman y V. Stewart**, 1994. The *nasFEDCBA* operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *J. Bacteriol.*, **176**: 2551-2559.
- Luque Vázquez, F.J.**, 1987. Genética de la asimilación del nitrato en *Azotobacter vinelandii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Luque F., E. Santero, J.R. Medina y M. Tortolero**, 1986. Genetic alteration of glutamine synthetase in *Azotobacter vinelandii*. *Microbios Lett.*, **33**: 29-32.
- Luque F., E. Santero, J.R. Medina y M. Tortolero**, 1987a. Mutants of *Azotobacter vinelandii* altered in the regulation of nitrate assimilation. *Arch. Microbiol.*, **148**: 231-235.

- Luque F., E. Santero, M. Tortolero y J.R. Medina, 1987b.** An effective mutagenic method in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiología SEM*, **3**: 45-48.
- Luque F., J.C. Gutiérrez, M. Tortolero y J.R. Medina, 1990.** Construcción de una bacteria excretora de amoníaco. III Congreso de Nacional de Biotecnología. Murcia. España.
- Luque F., L.A. Mitchenall, M. Chapman, R. Christine y R. Pau, 1993.** Characterization of genes involved in molybdenum transport in *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.*, **7**: 447-459.
- Luque I., A. Herrero, E. Flores y F. Madueño, 1992.** Clustering of genes involved in nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol. Gen. Genet.*, **232**: 7-11.
- Luque I., E. Flores y A. Herrero, 1994.** Nitrate and nitrite transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 are mediated by the same permease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1184**: 296-298.
- Luque I., E. Flores, A. Herrero, 1994.** Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J.*, **13**: 2862-2869.
- Llobell A., J.A. Bárcena, R. Villa y A. Paneque, 1980.** Flavin-mediated photoreduction of nitrate by nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **98**: 271-276.
- Macaluso A., E.A. Best y R. A. Bender, 1990.** Role of the *nac* gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.*, **172**: 7249-7255.
- MacGregor C.H, 1975.** Solubilisation of *Escherichia coli* nitrate reductase by a membrane-bound protease. *J. Bacteriol.*, **121**: 1102-1110.
- MacGregor C.H., C.A. Schnaitman, D.E. Normansell y M.G. Hodgins, 1974.** Purification and properties of nitrate reductase from *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.*, **249**: 5321-5327.
- Madueño F., E. Flores y M.G. Guerrero, 1987.** Competition between nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **896**: 109-112.

- Madueño F., M.A. Vega-Palas, E. Flores y A. Herrero, 1988.** A cytoplasmatic-membrane protein repressible by ammonium in *Synechococcus* R2: Altered expression in nitrate-assimilation mutants. *FEBS Lett.*, **239**: 289-291.
- Magasanik B., 1982.** Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.*, **16**: 135-168.
- Maia M., J.M. Sánchez y G.R. Vela, 1988.** Plasmids of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **170**: 1984-1985.
- Maier R. J. y F. Moshiri, 1992.** Molecular analysis of components responsible for protection of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase from oxygen damage. *en Nitrogen Fixation. Proceedings of the 9th international congress on nitrogen fixation*, p34. Cancun (Mexico).
- Maldonado R., A. Garzón, D.R. Dean y J. Casadesús, 1992.** Gene dosage analysis in *Azotobacter vinelandii*. *Genetics*, **132**: 869-878.
- Maldonado R., J. Jiménez y J. Casadesús, 1994.** Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J. Bacteriol.*, **176**: 3911-3919.
- Maloy S. y V. Stewart, 1993.** Autogenous regulation of gene expression. *J. Bacterio.*, **175**: 307-316.
- Maniatis T., E.F. Fritsh y J. Sambrook, 1982.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Manzano C., P. Candau, C. Gómez-Moreno, M. Relimpio y M. Losada, 1976.** Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of *Anabaena nidulans*. *Mol. Cell. Biochem.*, **10**: 161-169.
- Marigo G., H. Bouyssou, A.M. Pennarum y J.P. Rona, 1989.** Accumulation and vacuolar remobilization of nitrate in *Catharanthus roseus* cells. 2<sup>nd</sup> Advanced Course on Inorganic Nitrogen Metabolism. Book of Abstracts, p.12.
- Markwell M.A.K., S.M. Haas, L.L. Bieber y N.E. Tolbert, 1978.** A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, **87**: 207-210.



- Martín Nieto J., A. Herrero y E. Flores, 1989.** Regulation of nitrate and nitrite reductases in dinitrogen-fixing cyanobacteria and *Nif*<sup>-</sup> mutants. *Arch. Microbiol.*, **151**: 475-478.
- Martín Nieto J., 1991.** Aspectos bioquímicos y genéticos de la asimilación de nitrógeno inorgánico y su regulación en cianobacterias fijadoras de dinitrógeno. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- McClure P.R., T.E. Omholt y G.M. Pace, 1986.** Anion uptake in maize roots: interactions between chlorate and nitrate. *Physiol. Plant.*, **68**: 107-112.
- Mead D.A, E. Szczesna-Skorupa y B. Kemper, 1986.** Single-stranded DNA "blue" T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Engin.*, **1**: 67-74.
- Merchán F., K.L. Kindle, M.J. Llama, J.L Serra y E. Fernández, 1995.** *Plant Mol. Biol.* **28**: 759-766.
- Merrick M.J., 1988.** Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. En: Nitrogen fixation: hundred years after. Proceedings of the 7th international congress on N<sub>2</sub>/N fixation. pp. 293-302.
- Meyer Christian, M. Gonneau, M. Caboche, P. Rouzé, 1995.** Identification by mutational analysis of four critical residues in the molybdenum cofactor domain of eukaryotic nitrate reductase. *FEBS*, **370**: 197-201.
- Mikami B. y S. Ida, 1984.** Purification and properties of ferredoxin-nitrate reductase from cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **791**: 294-304.
- Mishra A.K. y O. Wyss, 1968.** Induced mutation in *Azotobacter* and isolation of an adenine requiring mutant. *Nucleus Calcutta*, **11**: 96-105.
- Moshiri F., J. W. Kim, C. Fu, R. J. Maier, 1992.** Cloning and characterization of the structural gene for the "Fe-SII" protein from *Azotobacter vinelandii*. En Nitrogen Fixation. Proceedings of the 9th international congress on nitrogen fixation, p467 Cancun (Mexico).

- Muñoz-Centeno M.C.**, 1994. Regulación de la asimilación de nitrato y de la fijación de nitrógeno en *Azotobacter chroococcum*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Muñoz-Centeno M.C., F.J. Cejudo, M.T. Ruiz y A. Paneque**, 1993. The *Azotobacter chroococcum* nitrate permease is a multicomponent system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1141**: 75-80.
- Murphy M.J. y L.M. Siegel**, 1973b. Siroheme and sirohydrochlorin: the basis for a new type of porphyrin-related prosthetic group common to both assimilatory and dissimilatory sulfite reductase. *J. Biol. Chem.*, **248**: 6911-6919.
- Murphy M.J., L.M. Siegel, H. Kamin y D. Rosenthal**, 1973a. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteriaceae. II. Identification of a new class of heme prosthetic group: an iron- tetrahydroporphyrin (isobacteriochlorin type) with eight carboxylic groups. *J. Biol. Chem.*, **248**: 2801-2814.
- Nagpal P., S. Jafri, M.A. Reddy y H.K. Das**, 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **171**: 3133-3138.
- Neu H.C. y L.A. Heppel**, 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.*, **240**: 3685-3692.
- Nikaido H. y M. Vaara**, 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.*, **49**: 1-32.
- Ninfa A.J. y B. Magasanik**, 1986. Covalent modification of the *glnG* product NR<sub>I</sub> by the *glnL* product, NR<sub>II</sub> regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 5909-5913.
- Noji S., T. Nohno, T. Saito y S. Taniguchi**, 1989. The *narK* gene product participates in nitrate transport induced in *Escherichia coli* nitrate-respiring cells. *FEBS Lett.*, **252**: 139-143.
- North A.K., K.E. Klose, K.M. Stedman y S. Kustu**, 1993. Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J. Bacteriol.*, **175**: 4267-4273.

- Oelze J., 1991. Diazotrophic mixed culture of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodobacter capsulatus*. En: Nitrogen Fixation Developments in Plant and Soil Sciences. **48**: 509-512. Ed. M. Polsinelli, R. Materassi y M. Vincenzini. Kluwer Academic Publ.
- Ogawa K-I., E. Akagawa, K. Yamane, Z-W. Sun, M. LaCelle, P. Zuber y M.M. Nakano, 1995. The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **177**: 1409-1413.
- Ohmori K. y A. Hattari, 1970. Induction of nitrate and nitrite reductase in *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.*, **11**: 873-878.
- Ohmori K. y A. Hattari, 1970. Induction of nitrate and nitrite reductase in *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.*, **11**: 873-878.
- Omata T., 1995. Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant cell physiol.*, **36**: 207-213.
- Omata T., 1991. Cloning and characterization of the *nrtA* gene that encodes a 45-kDa protein involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Cell Physiol.*, **32**: 151-157.
- Omata T. y T. Ogawa, 1986. Biosynthesis of a 42-kD polypeptide in the cytoplasmic membrane of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* strain R2 during adaptation to low CO<sub>2</sub> concentration. *Plant Physiol.*, **80**: 525-530.
- Omata T., M. Ohmori, N. Arai y T. Ogawa, 1989. Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 defective in nitrate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 6612-6616.
- Omata T., T. Ogawa, Y. Marcus, D. Friedberg y A. Kaplan, 1987. Adaptation to low CO<sub>2</sub> level in a mutant of *Anacystis nidulans* R2 which requires high CO<sub>2</sub> for growth. *Plant Physiol.*, **83**: 892-894.
- Omata T., T.J. Carlson, T. Ogawa y J. Pierce, 1990. Sequencing and modification of the gene encoding the 42-kilodalton protein in the cytoplasmic membrane of *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiol.*, **93**: 305-311.

- Omata T., X. Andriese y A. Hirano**, 1993. Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Mol. Gen. Genet.*, **236**: 193-202.
- Ortega T., F. Castillo y J. Cárdenas**, 1976. Photolysis of water coupled to nitrate reduction by *Nostoc muscorum* subcellular particles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **71**: 885-891.
- Overath P. y J.K. Wright**, 1983. Lactose permease: a carrier on the move. *Trends Biochem. Sci.*, **8**: 404-408.
- Owen D.J. y A.C. Ward**, 1985. Transfer of transposable drug-resistance elements Tn5, Tn7 and Tn76 to *Azotobacter beijerinckii*: use of plasmid RP4, Tn76 as a suicide vector. *Plasmid*, **14**: 162-166.
- Page W.J.**, 1982. Optimal conditions for induction of competence in nitrogen-fixing *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.*, **24**: 209-214.
- Page W.J. y H.L. Sadoff**, 1976. Physiological factors affecting transformation of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **125**: 1080-1087.
- Page W.J. y M. vonTigerstrom**, 1979. Optimal conditions for transformation *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **139**: 1058-1061.
- Page W.J. y M. vonTigerstrom**, 1979. Optimal conditions for transformation *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **139**: 1058-1061.
- Parkinson J.S.**, 1993. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*, **73**: 857-871.
- Pascal M.C. y M. Chippaux**, 1982. Involvement of a gene of the *chlE* locus in the regulation of the nitrate reductase operon. *Mol. Gen. Genet.*, **185**: 334-338.
- Pascal M.C., J.F. Burini, J. Ratouchniak y M. Chippaux**, 1982. Regulation of the nitrate reductase operon: effects of mutations in *chlA, B, D* and *E* genes. *Mol. Gen. Genet.*, **188**: 103-106.
- Pau R.N., L.A. Mitchenall y R.L. Robson**, 1989. Genetic evidence for an *Azotobacter vinelandii* nitrogenase lacking molybdenum and vanadium. *J. Bacteriol.*, **171**: 124-129.

- Peakman T., J. Crouzet, J.F. Mayaux, S. Busby, S. Mohan, N. Harborne, J. Wootton, R. Nicolson y J. Cole, 1990a. Nucleotide sequence, organisation and structural analysis of the products of genes in the *nirB-cysG* region of the *Escherichia coli* K12 chromosome. *Eur. J. Biochem.*, **191**: 315-323.
- Peakman T., S. Busby, J. Cole, 1990b. Transcriptional control of the *cysG* gen of *Escherichia coli* K-12 during aerobic growth. *Eur. J. Biochem.*, **191**: 325-31.
- Pearson W.R. y D.J. Lipman, 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 2444-2448.
- Postgate J.R., C.D.P. Partridge, R.L. Robson, F.B. Simpson y M.G. Yates, 1982. A method for screening for hydrogenase negative mutants of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**: 905-908.
- Prentki P. y H.M. Krisch, 1984. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, **29**: 303-313.
- Prentki P. y H.M. Krisch, 1984. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, **29**: 303-313.
- Prossnitz E., A. Gee y G.F-L. Ames, 1989. Reconstitution of the histidine periplasmic transport system in membrane vesicle. Energy coupling and interaction between the binding protein and the membrane complex. *J. Biol. Chem.*, **264**: 5006-5014.
- Prossnitz E., K. Nikaido, S.J. Ulbrich y G.F-L. Ames, 1988. Formaldehyde and photoactivatable crosslinking of the periplasmic binding protein to a membrane component of the histidine transport system of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, **263**: 17917-17920.
- Quesada A., A. Galván y E. Fernández, 1994. Identification of nitrate transport genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.*, **5**: 407-419.
- Quesada A., A. Galván, R.A. Schnell, P.A. Lefebre y E. Fernández, 1993. Five nitrate assimilation related genes are clustered in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.*, **240**: 387-394.
- Rajagopalan K.V. y J.L. Johnson, 1992. The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.*, **15**: 10199-10202.

- Ramos Morales F.**, 1992. Genética de la regulación de la asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Ramos F., G. Blanco, J.C. Gutiérrez, F. Luque y M. Tortolero**, 1993. Identification of an operon involved in the assimilatory nitrate-reducing system of *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.*, **8**: 1145-1153.
- Rao K.P., D.W. Rains**, 1976. Nitrate absorption in barley. I-kinetics and energetics. *Plant Physiol*, **57**: 55-58.
- Revilla E.**, 1983. Transporte y asimilación de nitrato en la bacteria *Azotobacter chroococcum*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Revilla E., A. Llobell, A. Paneque**, 1986a. Energy-dependence of the assimilatory nitrate uptake in *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 917-923.
- Revilla E., F.J. Cejudo, A. Llobell y A. Paneque**, 1986b. Short-term ammonium inhibition of nitrate uptake by *Azotobacter chroococcum*. *Arch. Microbiol.*, **144**: 187-190.
- Revilla E., A. Llobell y A. Paneque**, 1985. The assimilatory nitrate uptake in *Azotobacter chroococcum*. Induction by nitrate and by cyanate. *J. Plant. Physiol.*, **118**: 165-176.
- Revilla E., A. Llobell y A. Paneque**, 1986a. Energy dependence of the assimilatory nitrate uptake in *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 917-923.
- Ried J.L. y A. Collmer**, 1987. An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. *Gene*, **57**: 239-246.
- Robertson L.A. y J.G. Kuenen**, 1984. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch. Microbiol.*, **139**: 351-354.
- Robin C., F. Blanche, L. Cauchois, B. Cameron, M. Couder y J. Crouzet**, 1991. Primary structure, expression in *Escherichia coli*, and properties of S-adenosyl-L-methionine: uroporphyrinogen III methyltransferase from *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, **173**: 4893-4896.

- Robson R.L.**, 1979. Characterization of an oxygen-stable nitrogenase complex isolation from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. J.*, **181**: 569-575.
- Robson R. L., J. R. Postgate**, 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**: 183-207.
- Robson R.L., J.A. Chesshyre, C. Wheeler, R. Jones, P.R. Woodley y J.R. Postgate**, 1984. Genome size and complexity in *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 1603-1612.
- Rodríguez R., C. Lara, M.G. Guerrero**, 1992. Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Biochem. J.*, **282**: 639-643.
- Rodríguez R., C. Lara y M.G. Guerrero**, 1992. Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Biochem. J.*, **282**: 639-643.
- Rodríguez-Quiñones F., R. Bosch y J. Imperial**, 1993. Expression of the *nifBfdxNnifOQ* of *Azotobacter vinelandii* and its role in the nitrogenase activity. *J. Bacteriol.*, **175**: 2926-2935.
- Rouzé P., M. Caboche**, 1992. Inducible plant proteins (J.L. Wray ed) pp. 45-77, Cambridge University Press, Cambridge,
- Rubenchick L.I.**, 1960. *Azotobacter* and its use in agriculture. Traducido del ruso. Publicado por the National Science Foundation. Washington, D.C. US Dept. of Commerce. Washington 25, D.C.
- Ruiz M.T., F.J. Cejudo, M.C. Muñoz-Centeno y A. Paneque**, 1990. Isolation and characterization of an *Azotobacter chroococcum* mutant deficient in nitrate transport. *FEMS Microbiol. Lett.*, **67**: 211-214.
- Ruiz M.T., M.C. Muñoz-Centeno , F.J. Cejudo y A. Paneque**, 1992. Nitrite uptake in *Azotobacter chroococcum*. *Arch. Microbiol.*, **157**: 546-548.
- Ruppen M.E., G. Garner y H.L. Sadoff**, 1983. Protein turnover in *Azotobacter vinelandii* during encystment and germination. *J. Bacteriol.*, **156**: 1243-1248.
- Sadoff H.L., B. Shimei y S. Ellis**, 1979. Characterization of *Azotobacter vinelandii* deoxyribonucleic acid and folded chromosomes. *J. Bacteriol.*, **138**: 871-877.

- Sambrook J., E.F. Fritsch y T. Maniatis**, 1989. *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santero Santurino E.**, 1986. Aislamiento y caracterización de mutantes del metabolismo del nitrógeno en *Azotobacter vinelandii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Santero E., A. Toukdarian, R. Humphrey y C. Kennedy**, 1988. Identification and characterization of two nitrogen fixation regulatory regions *nifA* and *nfrX* in *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum*. *Mol. Microbiol.*, **2**: 303-314.
- Santero E., F. Luque, J.R. Medina y M. Tortolero**, 1986. Isolation of *ntrA*-like mutants of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **166**: 541-544.
- Scherings G., H. Haaker, H. Wassink y C. Veeger**, 1983. On the formation of an oxygen-tolerant three component nitrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.*, **135**: 591-599.
- Schloemer R.H. y R.H. Garret**, 1974a. Nitrate transport system in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **118**: 259-269.
- Schloemer R.H. y R.H. Garret**, 1974b. Uptake of nitrite by *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, **118**: 259-274.
- Shethna Y. I.**, 1970. Non-heme iron (iron-sulfur) proteins of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. Biophys. Acta*, **205**: 562.
- Sias S.R., A.H. Stouthamer y J.L. Ingraham**, 1980. The assimilatory and dissimilatory nitrate reductases of *Pseudomonas aeruginosa* are encoded by different genes. *J. Gen. Microbiol.*, **118**: 229-234.
- Siegel L.M., M.J. Murphy y H. Kamin**, 1973. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. I. The *Escherichia coli* hemoflavoprotein: molecular parameters and prosthetic groups. *J. Biol. Chem.* **248**: 251-261.
- Siegel L.M., P.S. Davis y H. Kamin**, 1974. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. III. The



- Escherichia coli* hemoflavoprotein: catalytic parameters and the sequence of electron flow. *J. Biol. Chem.*, **249**: 1572-1586.
- Sivak M.N., C. Lara, J.M. Romero, R. Rodriguez y M.G. Guerrero**, 1989. Relationship between a 47 Kda cytoplasmic membrane polypeptide and nitrate transport in *Anacystis nidulans*. *Biochem. Biophys. Acta*, **742**: 435-445.
- Smith T.F. y M.S. Waterman**, 1981. Comparasion of Bio-Sequences. *Advances in Applied Mathematics*, **2**: 482-489.
- Snell F.D. y C.T. Snell**, 1949. Colorimetric methods of analysis. Vol. 3, pp. 804-805. Van Nostrand, New York.
- Sorger G.J**, 1969. Regulation of nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii* OP: the role of nitrate reductase. *J. Bacteriol.*, **98**: 56-61.
- Sorokin A., E. Zumstein, V. Azevedo, S.D. Ehrlich y P. Serror**, 1993. The organization of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome region between the *spoVA* and *serA* genetic loci, based on sequence data. *Mol. Microbiol.*, **10**: 385-395.
- Stevens SE.Jr. y C. van Baalen**, 1974. Control of nitrate reductase in a blue-green alga. The effectsof inhibitors, light and ammonia. *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**: 146-152.
- Stewart V.**, 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microbiol. Rev.*, **52**: 190-232.
- Stewart V. y C.H. MacGregor**, 1982. Nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12: involvement of *chlC*, *chlE* and *chlG* loci. *J. Bacteriol.* **151**: 778-799.
- Stock J.B., A.J. Ninfa y A.M. Stock**, 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **53**: 450-490.
- Su Ch.-J., A. da Cunha, C.M. Wernette, R.N. Reusch y Sadoff H.L.**, 1987. Protein synthesis during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **169**: 4451-4456.

- Suzuki I., T. Sugiyama y T. Omata**, 1993. Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reductase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.*, **34(8)**: 1311-1320.
- Suzuki I., T. Sugiyama y T. Omata**, 1996. Regulation by cyanate of the genes involved in carbon and nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *J. Bacteriol.*, **178**: 2688-2694.
- Taller B.J. y T.Y. Wong**, 1989. Cytokinins in *Azotobacter vinelandii* culture medium. *Appl. and Envir. Microbiol.*, **55**: 266-267.
- Taniguchi S. y K. Ohmachi**, 1960. Particulate nitrate reductase of *Azotobacter vinelandii*. *J. Biochem.*, **48**: 50-62.
- Tchan Y**, 1984. Family: *Azotobacteraceae*. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol. 1, pp. 219-224. Editado por J.G. Holt y N.R. Krieg. Baltimore. The Williams and Wilkins Co. USA.
- Thayer J.R. y R.C. Huffaker**, 1982. Kinetic evaluation, using  $^{13}\text{N}$ , reveals two assimilatory nitrate transport system in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **149**: 198-202.
- Thompson B.J., E. Domingo y R.C. Warner**, 1980. Pseudolysogeny of azotobacter phages. *Virology*, **102**: 267-277.
- Tortolero M., E. Santero y J. Casadesús**, 1983. Plasmid transfer and mobilization of *nif* markers in *Azotobacter vinelandii*. *Microbios Lett.*, **22**: 31-35.
- Tortolero M., R. Vila y A. Paneque**, 1975. Ferredoxin-dependent nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Plant. Sci. Lett.*, **5**: 141-145.
- Toukdarian A y C. Kennedy**, 1986. Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntr* and *glnA* genes and construction of *ntr* mutants. *EMBO J.*, **5**: 399-407.
- Toukdarian A., G. Saunders, G. Selman-Sosa, E. Santero, P. Woodley y C. Kennedy**, 1990. Molecular analysis of the *Azotobacter vinelandii* *glnA* gene encoding glutamine synthetase. *J. Bacteriol.*, **172**: 6529-6539.

- Tsay Y-F., J.I. Schroeder, K.A. Feldman y N.M. Crawford, 1993. The herbicide sensitivity gen *chl1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, **72**: 705-713.
- Ugalde R.A., J. Imperial, V.K. Shah y W.J. Brill, 1985. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor and the molybdenum cofactor in *Klebsiella pneumoniae*: effect of sulfur source. *J. Bacteriol.*, **164**: 1081-1087.
- Ullman A., F. Jacob y J. Monod, 1967. Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the  $\beta$ -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **24**: 339-343.
- Unkles S.E., K.L. Hawker, C. Grieve, E.I. Campbell, P. Montagne y J.R. Kinghorn, 1991. *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 204-208.
- van't Riet, J., A.H. Stouthamer y R.J. Planta, 1968. Regulation of nitrate assimilation and nitrate respiration in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.*, **96**: 1455.
- Vancura V., 1961. Detection of gibberelic acid in *Azotobacter* cultures. *Nature*, **192**: 88-89.
- Vega J.M., M.G. Guerrero, E. Leadbetter y M. Losada, 1973. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-nitrite reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. J.*, **133**: 701-708.
- Vega-Palas M.A., 1991. *ntcA*: Un gen regulador de la asimilación de nitrógeno en la cianobacteria *Synechococcus*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Vega-Palas M.A., E. Flores y A. Herrero, 1992. NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol. Microbiol.*, **6**: 1853-1859.
- Vega-Palas M.A., F. Madueño, A. Herrero y E. Flores, 1990. Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *J. Bacteriol.*, **172**: 643-647.

- Vega-Palas M.A., F. Madueño, A. Herrero y E. Flores, 1990. Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *J. Bacteriol.*, **172**: 643-647.
- Walmsley J. y ch. Kennedy, 1991. Temperature-dependent regulation by molybdenum and vanadium of expression of the structural genes encoding three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Envir. Microbiol.*, **57**: 622-624.
- Warren M.J., C.A. Roessner, P.J. Santander y A.I. Scott, 1990. The *Escherichia coli cysG* gene encodes S-adenosylmethionine-dependent uroporphyrinogen III methylase. *Biochem. J.*, **265**: 725-729.
- Yabuki Y., E. Mori y G. Tamaru, 1985. Nitrite reductase in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**: 3061-3062.
- Yates M. G., 1977. Physiological aspects of nitrogen fixation. En Recent developments in nitrogen fixation. Editado por W. Newton, J. R. Postgate y C. Rodríguez-Barrueco.
- Zell R. y H. Fritz, 1987. DNA mismatch repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *EMBO J.*, **6**: 1809-1815.
- Zevenboom W. y L.R. Mur L.R, 1981. Simultaneous short-term uptake of nitrate and ammonium by *Oscillatoria agardhii* grown in nitrate- or light-limited continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, **126**: 355-362.

## **5. ABREVIATURAS**

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNasa	Deoxirribonucleasa
ARN	Acido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
ATP-asa	Adenosina-trifosfatasa
BS	Burk-sacarosa
b	Base
Da	Dalton
dATP	Desoxiadenosín-5'-trifosfato
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida
DO	Densidad óptica
dCTP	Desoxicitidín-5'-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosín-5'-trifosfato
dTTP	Desoxitimidín-5'-trifosfato
dUTP	Desoxiuridín-5'-trifosfato
EDTA	Acido etilén-diamino-tetraacético
EGTA	Acido etilén glicol-bis ( $\beta$ -amino etil eter) tetraacético
etidio	3,8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridio
FAD <sup>+</sup> , FADH	Flavín-adenín-dinucleótido y su forma reducida
Fe	Hierro
FeMo-co	Cofactor de hierro y molibdeno
g	gramo
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GMP	Guanosín-5'-monofosfato
GOGAT	Glutamato sintetasa
GS	Glutamina sintetasa
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranósido
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
KDa	Kilodalton
l	Litro
min	Minuto
M	Molar
Mo-co	Cofactor de molibdeno

MOPS	Acido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MPT	Molibdopteridina
N'NEDA	N-[naftil-(1)]etilendiamina-diclorhidrato
NAD <sup>+</sup> , NADH	Nicotinamida-adenosín-dinucleótido (nucleótido difosfopiridínico) y su forma reducida
NADP <sup>+</sup> , NADPH	Nicotinamida-adenosín-dinucleótido (trifosfopiridínico-nucleótido) y su forma reducida
NAS	Actividad nitrato reductasa
Nif	Capacidad de fijar nitrógeno
NIS	Actividad nitrito reductasa
ONPG	o-nitrofenil β-D-galactopiranosido
ORF	Fase de lectura abierta
pb	par de bases
PEG	Polietilén-glicol
pI	Punto isoeléctrico
p/v	peso/volumen
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
t	Tiempo
Tris	2-amino-2(hidroximetil)1,3,-propanodiol
UR/UT	Uridililtransferasa
v	Volumen
v/v	Volúmen/volumen
°C	Grado centígrado
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

**Antibióticos:**

Amp/Ap	Ampicilina	Spc/Sp	Espectinomicina
Cm	Cloranfinicol	Tet/Tc	Tetraciclina
Kam/Km	Kanamicina	Nal	Acido nalidíxico
Sm	Estreptomicina	Rif	Rifanpicina

**Enzimas de restricción:**

BH	<i>Bam</i> HI	Sm	<i>Sma</i> I
Bg	<i>Bgl</i> II	Sl	<i>Sal</i> I
H	<i>Hind</i> III	Xb	<i>Xba</i> I
P	<i>Pst</i> I	Xh	<i>Xho</i> I

**Bases nitrogenadas:**

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

**Aminoácidos:**

Ala	A	Alanina	Leu	L	Leucina
Arg	R	Arginina	Lys	K	Lisina
Asn	N	Asparagina	Met	M	Metionina
Asp	D	Acido aspártico	Phe	F	Fenilalanina
Cys	C	Cisteína	Pro	P	Prolina
Glu	E	Acido glutámico	Ser	S	Serina
Gln	Q	Glutamina	Thr	T	Treonina
Gly	G	Glicina	Trp	W	Triptófano
His	H	Histidina	Tyr	Y	Tirosina
Ile	I	Isoleucina	Val	V	Valina



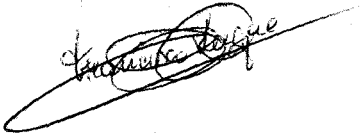
HASSANE ABDELLOTIFI  
"ESTRUCTURA DEL OPERON DE LA NITRITO-NITRATO  
REDUCTASA (was AB) Y TRANSPORTE DE NITRATO EN  
AZOTOBACTER VINELANDII"

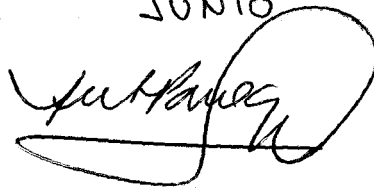
Apto "cum laude"

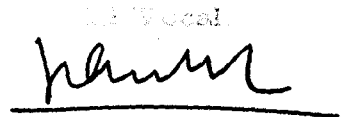
27

JUNIO

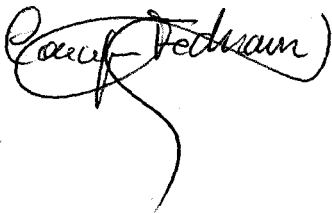
97

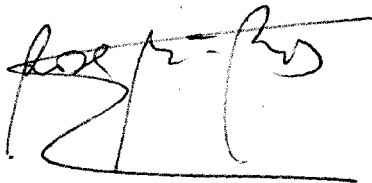


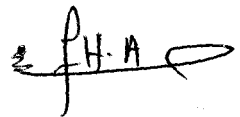


  
El Vocal.

El Decano.







FBI ETD

373

500955038

