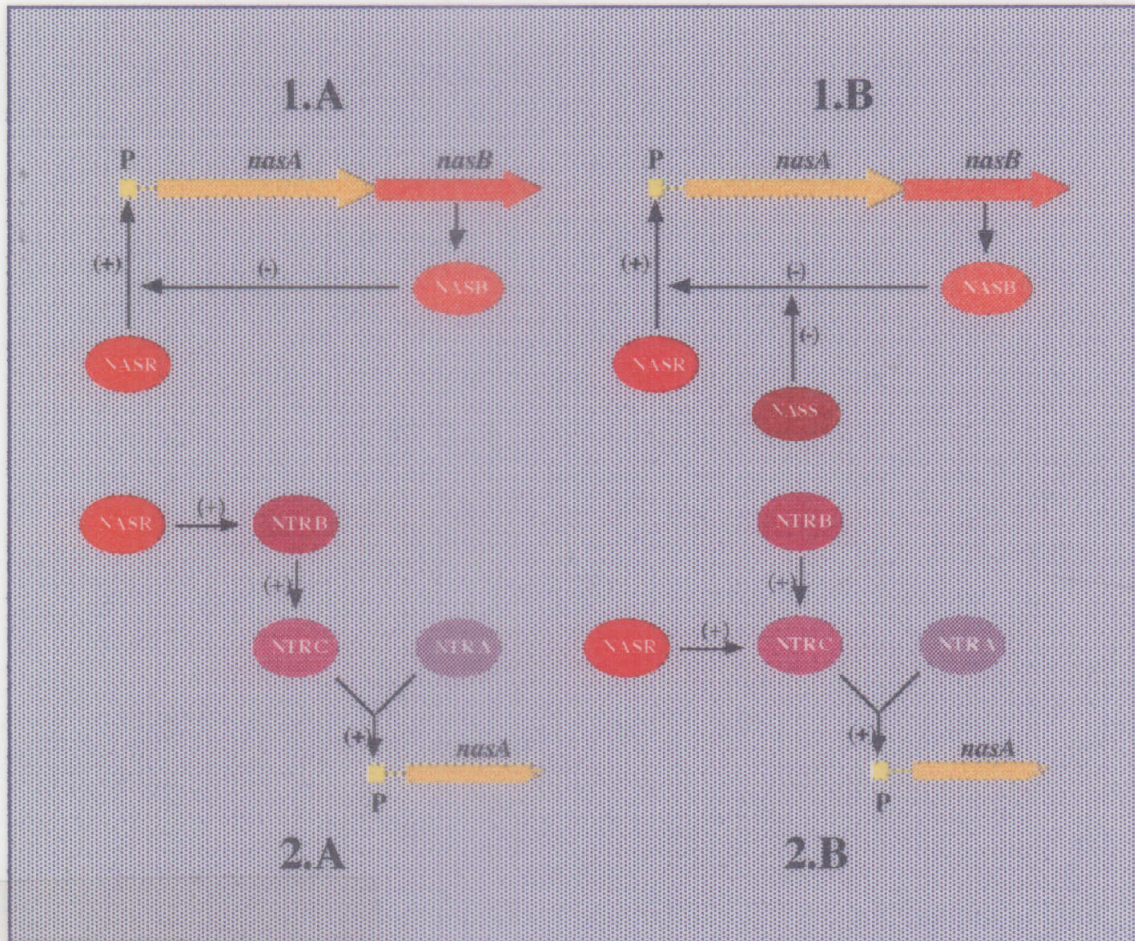


TESIS DOCTORAL

Regulación del operón *nasAB* de asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii* y *Rhizobium fredii*



TD
266

Juan Carlos Gutiérrez Martínez
Sevilla, 1994

1. Posibles modelos de interacción entre las proteínas NASS, NASR y NASB de *A. vinelandii*

2. Posibles modelos de activación del promotor del operón *nasAB* de *A. vinelandii*



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Regulación del operón *uasAB* de asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii* y *Rhizobium fredii* sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Juan Carlos Gutiérrez Martínez

Firmado:


Sevilla, a 24 de Octubre de 1994

TD-266
A. 12488

Departamento de Microbiología
Facultad de Biología Universidad de Sevilla

**Regulación del operón *nasAB* de
asimilación de nitrato en
Azotobacter vinelandii y
*Rhizobium fredii***

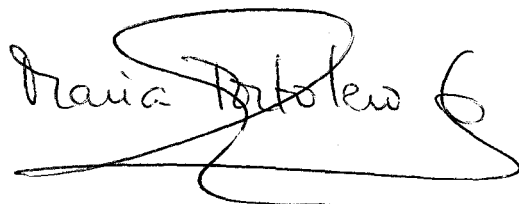
Memoria que, para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas,
presenta y firma el licenciado:



Juan Carlos Gutiérrez Martínez

Sevilla, Septiembre de 1994

Directora:



Dra. María Tortolero García
Profesora Titular de Biología

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 98 número 238 del libro
correspondiente.

Sevilla, 2 SET. 1994

El Jefe del Negociado de Teses,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

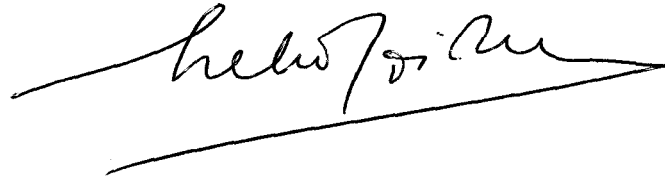
Depositado en DPTO. MICROBIOLOGÍA
de la FACULTAD DE BIOLÓGICA

en la Universidad desde el día 6-9-94

hasta el día 22-9-94.

Fecha: 6 de Septiembre de 1994

UNIVERSIDAD DE SEVILLA DPTO. DE MICROBIOLOGÍA



A mis padres, por todos sus
sacrificios.
Y a Carmela, el "tema de trabajo" al
que dedicaré toda mi vida.

Me he esforzado continuamente en conservar libre mi mente a fin de renunciar a cualquier hipótesis, por querida que fuera (y no puedo resistir la tentación de formular una para cada tema), tan pronto como los hechos resultan contrarios a ella. En realidad no me ha quedado otra alternativa que hacerlo porque, con excepción de los Arrecifes coralinos, no puedo recordar ni un solo caso de hipótesis inicial que no tuviera que eliminar o modificar al cabo de un tiempo.

CHARLES DARWIN

Nuestra presa auténtica es el placer de la caza; no hay que perdonarnos si la llevamos a cabo de modo incorrecto o estúpido. Pero dejar de alcanzar la presa es ya otra cosa. Hemos nacido para perseguir la verdad; poseerla corresponde a un poder superior.

MONTAIGNE

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla. Durante el desarrollo de esta Tesis, el autor ha disfrutado de una beca de la Fundación Cámara, desde aquí animo a los miembros del Patronato de esta Fundación a que continuen con la labor de seguir ayudando a la formación de nuevos doctores.

A María Tortolero García, mi directora, mi "jefa", le agradezco la oportunidad que me dió para realizar este trabajo, su dedicación e interés en la realización de esta Tesis y en mi formación científica, su constancia, su amistad, su apoyo en todo momento, tanto en el terreno científico como personal. Por todo, gracias "Jefa".

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los miembros de la "familia" Azoto. A mamá María por sus desvelos y por mi educación. A todos mis hermanos, comenzando por el mayor, Eduardo, por enseñarme a ser un "mijitas", a Paco Luque, por enseñarme a llegar a la solución del problema por el camino más práctico, a Gonzalo, que me ayudó a dar mis primeros pasos por este mundo de la Ciencia, a Paco Ramos, por su comprensión en todas mis manías, a los pequeños, Ludwig y Hassane, por los buenos ratos en el laboratorio, y a Paco Romero, mi "hermano adoptivo", por estar siempre ahí. A los familiares lejanos, a Rafa Maldo, Fernan, Jose, a los de chroococum, Maricruz y Tere, a los de cianobacteria, Enrique, Toñi, Nacho y al pequeño Enrique, les agradezco su colaboración en todo momento durante la realización de esta Tesis.

A las tres Mosqueteras, Concha, Rosa, Marisi, y a Chari, por su amistad y compañerismo que han sido de gran valor, sobre todo en los malos momentos.

A José María, Charo, Ramón, Javier, Antonio Baena y Eduardo, por hacerme más agradable el andar por los pasillos.

A todos los miembros de los departamentos de Génética y Bioquímica, y en especial, a Helena, Andres, Amando, y a los bioquímicos José Carlos y Antonio.

A Franjo por su ayuda en vencer al dragón Macintosh, y a Enrique por sus consejos tipográficos.

Y porque no todo es Ciencia. Quiero agradecer su compañía en los momentos de soledad y de alegría a mis fieles amigos Ilak, Gambrinus, Jack Daniels y Capitán Morgan.

A Carmela, por escuchar los problemas del laboratorio y lograr que los olvidará, aunque sólo fuese por unas horas.

INDICE

1. INTRODUCCION

1.1. Generalidades	3
1.2. Genética de <i>Azotobacter</i>	6
1.2.1. Organización del genomio	6
1.2.2. Mutagénesis	7
1.2.3. Sistemas de transferencia genética en <i>Azotobacter</i>	8
1.2.3.1. Conjugación	8
1.2.3.2. Transformación	9
1.2.3.3. Transducción	9
1.3. Metabolismo del Nitrógeno	11
1.3.1. Asimilación de amonio: Glutamina sintetasa	11
1.3.2. Regulación de la producción y asimilación de amonio en bacterias: Sistema NTR	12
1.3.3. Fijación de nitrógeno	13
1.3.4. Reducción de nitrato en bacterias	18
1.3.4.1. Reducción disimilatoria del nitrato y del nitrito ..	18
1.3.4.1.1. Respiración de nitrato en <i>E. coli</i>	18
1.3.4.1.2. Desnitrificación	19
1.3.4.2. Asimilación de nitrato	21
1.3.4.2.1. Asimilación de nitrato en <i>Azotobacter</i>	21
1.3.4.2.2. Asimilación de nitrato en otras bacterias	23
1.3.4.2.3. Asimilación de nitrato en cianobacterias	24
1.3.4.3. Biosíntesis del FeMo-co y del Mo-co	25

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos	31
2.2. Medios y condiciones de cultivo	40

Indice

2.2.1. <i>Azotobacter vinelandii</i>	40
2.2.2. <i>Rhizobium fredii</i>	41
2.2.3. <i>Escherichia coli</i>	42
2.2.4. Agentes selectivos	43
2.3 Tampones y soluciones	45
2.3.1. Tampón fosfato 0.5 M, pH 7.5	44
2.3.2. Solución de Fe-EDTA	45
2.3.3. Reactivo de Holmes-Bonner	45
2.3.4. PEG/NaCl	45
2.3.5. Soluciones para aislar ADN plasmídico	46
2.3.6. Tampón STE	46
2.3.7. CTAB/NaCl	46
2.3.8. Tampón TE	47
2.3.9. Tampón TES	47
2.3.10. Tampón TESL	47
2.3.11. Tampón SSC (x20)	47
2.3.12. Tampón TAE (x50)	47
2.3.13. Tampón TBE (x10)	47
2.3.14. Tampón de lisis para <i>Azotobacter vinelandii</i>	48
2.3.15. Tampones para digestiones con enzimas de restricción ...	48
2.3.16. Tampón para el ligamiento de ADN	48
2.3.17. Tampón Z para β -galactosidasa	48
2.3.18. Tampón SM	48
2.3.19. Soluciones para el marcaje y detección de ADN	49
2.3.20. Solución de ADN de espermatozoos de arenque	49
2.3.21. Soluciones para electroforesis de proteínas	49
2.3.22. Soluciones para electroforesis de secuenciación de ADN..	50
2.4. Estimación de actividades enzimáticas	51
2.4.1. Actividad nitrato reductasa	51
2.4.2. Actividad nitrito reductasa	51
2.4.3. Actividad β -galactosidasa	52
2.5. Métodos analíticos	53
2.5.1. Determinación de nitrito	53

2.5.2. Determinación de proteína	53
2.5.3. Medidas de pH	54
2.5.4. Medidas espectrofotométricas	54
2.6. Análisis de proteínas	55
2.6.1. Preparación de extractos para electroforesis	55
2.6.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	55
2.6.3. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante tinción	55
2.6.4. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante autorradiografía	56
2.6.5. Expresión de proteínas de <i>A. vinelandii</i> en <i>E. coli</i>	56
2.7. Métodos genéticos y de biología molecular	58
2.7.1. Mutagénesis de pMAS941 con Tn5-B20	58
2.7.2. Conjugación	58
2.7.2.1 <i>Azotobacter vinelandii</i>	58
2.7.2.2. <i>Rhizobium fredii</i>	58
2.7.2.3. <i>Escherichia coli</i>	59
2.7.3. Transformación	59
2.7.3.1. <i>Azotobacter vinelandii</i>	59
2.7.3.2. <i>Escherichia coli</i>	60
2.7.4. Infección	61
2.7.5. Aislamiento de ADN	61
2.7.5.1. Aislamiento de ADN plasmídico	61
2.7.5.2. Aislamiento de ADN cromosómico de <i>A.</i> <i>vinelandii</i>	62
2.7.5.2.1. Aislamiento de ADN purificado	62
2.7.5.2.2. Aislamiento de ADN cromosómico para transformación	62
2.7.5.3. Aislamiento de ADN de λ	62
2.7.6. Restricción de ADN	63
2.7.7. Desfosforilación de los extremos 5' del ADN	63
2.7.8. Relleno de extremos cohesivos	64
2.7.9. Ligamiento de ADN	64
2.7.10. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	64

Indice

2.7.11. Purificación de fragmentos de restricción mediante la técnica de "geneclean"	64
2.7.12. Análisis de ADN mediante hibridación	65
2.7.12.1. Transferencia de ADN a filtros de nailon	65
2.7.12.2. Marcaje de la sonda	66
2.7.12.3. Hibridación de ADN con sondas marcadas con digoxigenina	66
2.7.13. Secuenciación de ADN	67
2.7.13.1. Construcción de plásmidos conteniendo delecciones seriadas de fragmentos de ADN a secuenciar	67
2.7.13.2. Aislamiento de ADN de cadena simple a partir de plásmidos derivados de pTZ18R o pTZ19R .	67
2.7.13.3. Reacciones de secuenciación	68
2.7.13.4. Electroforesis de las reacciones de secuenciación en geles de poliacrilamida	68
2.7.13.5. Secado y autorradiografía del gel	68
2.7.14. Comparación de secuencias de aminoácidos	69

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Capítulo 1

3.1. Caracterización de una región reguladora de la asimilación de nitrato en <i>Azotobacter vinelandii</i>	
3.1.1. Delimitación mediante inserciones de la región <i>nasR</i>	75
3.1.2. Secuenciación de la región <i>nasR</i>	80
3.1.3. Expresión de <i>nasSR</i> en <i>E. coli</i>	84
3.1.4. Análisis de la proteína NASS	85
3.1.5. Análisis de la proteína NASR	89
3.1.6. Discusión	91

Capítulo 2

3.2. Regulación de los operones <i>nasAB</i> y <i>nasSR</i>	
3.2.1. Construcción de estirpes con una inserción no polar en	

el gen <i>nasS</i>	97
3.2.2. Clonación del promotor del operón <i>nasAB</i>	99
3.2.3. Clonación del promotor del operón <i>nasSR</i>	100
3.2.3. Introducción de los plásmidos pPN12 y pPN61.2 en distintos fondos genéticos	100
3.2.5. Expresión de las fusiones en distintos fondos genéticos ..	100
3.2.6. Discusión	105

Capítulo 3

3.3. Caracterización de mutantes afectados en la regulación por amonio de la asimilación de nitrato	
3.3.1. Actividades nitrato y nitrito reductasa de las estirpes MV92, MV93 y MV94	113
3.3.2. Aislamiento de los fragmentos cromosómicos que contienen las inserciones de Tn5	114
3.3.2.1. Obtención de la sonda	114
3.3.2.2. Preparación del filtro	115
3.3.2.3. Hibridación	115
3.3.2.4. Clonación de los fragmentos genómicos que contienen el Tn5 en los mutantes MV92, MV93 y MV94	116
3.3.2.5. Ligamiento de los transposones clonados y el fenotipo de las estirpes mutantes	117
3.3.2.6. Mapa de restricción de los plásmidos pMAS92, pMAS93 y pMAS94	118
3.3.3. Clonación de la región silvestre implicada en el fenotipo de los mutantes	119
3.3.4. Mapa de restricción de pMAS941: Implicación del operón <i>nifBQ</i> en el fenotipo de los mutantes alterados en la represión por amonio	121
3.3.5. Determinación del gen o genes que provocan el fenotipo	122
3.3.5.1. Inserciones del elemento genético Ω en el operón <i>nifBQ</i>	122
3.3.5.2. Expresión de los genes distales a Tn5	127
3.3.5.2.1. Bloqueo de la transcripción desde el promotor de Tn5	127

Indice

3.3.5.3.2. Obtención de una fusión β -galactosidasa en <i>nifO</i>	129
3.3.5.3.3. Construcción de un doble mutante <i>nifB</i> ::Tn5 y <i>nifO</i> ::Tn5-B21	132
3.3.5.3.4. Niveles de expresión de <i>nifO</i> a partir de su propio promotor y del promotor de Tn5	133
3.3.6. Niveles de transcripción del promotor del operón <i>nasAB</i> en distintos fondos <i>nifO</i>	135
3.3.7. Discusión	136

Capítulo 4

3.4. Aislamiento y caracterización de genes implicados en la asimilación de nitrato en la estirpe HH103 de <i>Rhizobium fredii</i>	
3.4.1. Actividades nitrato y nitrito reductasa de la estirpe HH103 de <i>R. fredii</i>	143
3.4.2. Complementación de mutantes de <i>A. vinelandii</i> afectados en la asimilación de nitrato.....	143
3.4.3. Actividades nitrato y nitrito reductasa de los mutantes de <i>A. vinelandii</i> complementados con el cósmido pMAS30.3	145
3.4.4. Identificación de un operón implicado en la reducción de nitrato en <i>R. fredii</i>	146
3.4.5. Construcción de mutantes de <i>R. fredii</i> en los genes <i>nasA</i> y <i>nasB</i>	150
3.4.6. Clonación del promotor del operón <i>nasAB</i> de <i>R. fredii</i> ..	154
3.4.7. Expresión de la fusión del promotor <i>nasAB</i> en las estirpes HH103 y RS2 de <i>R. fredii</i>	155
3.4.8. Discusión	157
4. CONCLUSIONES	163
5. BIBLIOGRAFIA	167
6. ABREVIATURAS	191

1. INTRODUCCION

1.1. GENERALIDADES

El nitrógeno, tras el carbono, el hidrógeno y el oxígeno, es el elemento más abundante de la materia viva, constituyendo del 8 al 16%. Forma parte de moléculas indispensables para la vida, como los ácidos nucleicos y las proteínas. En la biosfera, el nitrógeno se encuentra en dos formas: libre (el 79% de la atmósfera es nitrógeno molecular) o combinado a otros elementos. Ambas formas están continuamente transformándose la una en la otra mediante la acción de los seres vivos a través de un circuito que se ha denominado "ciclo del nitrógeno".

Las plantas y la mayoría de los microorganismos sólo pueden utilizar el nitrógeno en su forma combinada como los nitratos o el amonio. Estos nutrientes suelen ser limitantes en muchos suelos, por lo que para aumentar la productividad de los cultivos se necesita el aporte continuo de abonos nitrogenados. Desde que a principios de siglo se empezaron a agotar los depósitos chilenos de nitrato, la producción de fertilizantes basada en el proceso de Haber-Bosch se ha incrementado continuamente, y con ello el coste de los mismos en paralelo al aumento del precio del petróleo. Por estas y otras razones, se ha prestado cada vez más atención a otros sistemas alternativos de producción de nitrógeno combinado, en concreto a la denominada "fijación biológica del nitrógeno", proceso por el que algunos organismos reducen el N_2 hasta amonio.

Ni las plantas, ni ningún otro eucariota, son capaces de utilizar el nitrógeno atmosférico. Sólo algunos procariontes, 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* comprende bacterias Gram negativas, aerobias estrictas, quimioheterótrofas y capaces de fijar nitrógeno en vida libre. Agrupa 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

Introducción

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) e incluye en la actualidad seis especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. armeniacus* y *A. paspali*. Estas bacterias presentan morfologías celulares que van desde oval a bacilar, tienen un diámetro de hasta 2 μm , no producen endosporas pero sí quistes de resistencia a drogas, desecación, sonicación, luz ultravioleta y radiaciones γ . Son aerobios estrictos, quimioorganotrofos, y su crecimiento óptimo fijando nitrógeno se alcanza a una temperatura de 30°C y un pH de 7.0 a 7.5. Y junto a *Azomonas*, *Derrxia* y *Beijerinckia* son capaces de fijar nitrógeno en aerobiosis (Tchan, 1984).

Del género *Azotobacter*, la especie más conocida desde el punto de vista genético es *Azotobacter vinelandii*. Descrito por Lipman en 1903. Sus células son móviles por flagelos peritricos. Producen gran cantidad de polisacárido extracelular y en medios deficientes en hierro excretan un pigmento fluorescente amarillo verdoso soluble en agua. Es capaz de usar gran cantidad de fuentes de carbono. Puede utilizar nitrógeno molecular, sales de amonio, nitrato, nitrito, urea y algunos aminoácidos como única fuente de nitrógeno en el medio.

Se ha discutido mucho la utilidad de *Azotobacter* como fertilizante nitrogenado y de hecho se ha empleado en muchos cultivos. Los estudios realizados en la URSS y otros países del este de Europa describen aumentos del rendimiento en diversos cultivos, especialmente 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 y sorgo, 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). Es muy probable que el aumento del rendimiento de los cultivos no se deba al aporte del nitrógeno fijado por *Azotobacter* (Postgate *et al.*, 1982) sino a sustancias como las giberelinas, citoquininas y ácido indolacético, liberadas por este tipo de bacterias (Vancura, 1961; González-López *et al.*, 1986; Taller y Wong, 1989) o por el antagonismo que ejerce sobre ciertas bacterias y hongos patógenos como *Candida*, *Monilia* y *Alternaria*. No obstante, estudios recientes con cultivos mezclados de *Azotobacter vinelandii* y

Rhodobacter capsulatus indican que *A. vinelandii* es capaz de proporcionar una fuente de nitrógeno orgánica para el crecimiento de *R. capsulatus* (Oelze, 1991).

Por otra parte, se han intentado varias estrategias para la obtención de mutantes de *Azotobacter vinelandii* capaces de excretar amonio que servirían para la fertilización de los cultivos. Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos realizados hasta la fecha, los resultados no son del todo positivos, alcanzándose valores de 5 mM en los mejores casos (Gordon y Jacobson, 1983; Luque *et al.*, 1986; Luque *et al.*, 1990; Bali *et al.*, 1992).

1.2. GENETICA DE AZOTOBACTER

1.2.1. Organización del genomio

Durante más de una década *Azotobacter* ha sido el paradigma de bacteria poliploide. Los primeros trabajos en los que se midió la concentración de ADN por célula y se analizó su complejidad, describieron a *Azotobacter* como una bacteria con un alto contenido en ADN, de una complejidad similar a la de *E. coli* y con un tamaño de cromosoma de unas 2000 kb (Robson *et al.*, 1984). El número de cromosomas durante la fase exponencial de crecimiento se estimó entre 40-80 para *A. vinelandii* (Sadoff *et al.*, 1979; Nagpal *et al.*, 1989) y unos 20-25 en *A. chroococcum* (Robson *et al.*, 1984). La dificultad avalada por numerosos grupos, de obtener mutantes auxótrofos u otras mutaciones recesivas o seleccionables, para lo que se requerían largos periodos de segregación post-mutagénicas, sirvió para apoyar estos resultados.

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 *A. vinelandii* es una bacteria haploide o moderadamente poliploide. Más recientemente, estos mismos autores (Maldonado *et al.*, 1994) han logrado resolver esta aparente 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 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.

En todos los aislamientos de *A. chroococcum* se ha detectado la presencia de dos a seis plásmidos nativos (Robson *et al.*, 1984). Y sólo en algunas estirpes de *A. vinelandii* se ha descrito la presencia de estos (Maia *et al.*, 1988).

1.2.2. Mutagénesis

La obtención de mutantes en *Azotobacter* ha sido posible por multitud de procesos. Se han aislado mutantes espontáneos de *A. vinelandii* y *A. chroococcum* (Sorger, 1969; Gordon y Jacobson, 1983) o después del tratamiento con N'-nitro-N-nitrosoguanidina, etilmetanosulfonato, ICR 191, hidroxilamina, luz ultravioleta o transposones (Contreras y Casadesús, 1987; Luque *et al.*, 1987b; Kennedy y Toukdarian, 1987; Blanco, 1989; Contreras *et al.*, 1991b). Para el enriquecimiento de un determinado fenotipo se han tratados los cultivos mutagenizados con penicilinas, con y sin cicloserina (McInerney *et al.*, 1984; Luque *et al.*, 1987b)

Se han obtenido mutantes resistentes a antibióticos como la rifampicina, la estreptomicina o el ácido nalidíxico, aunque a veces los niveles de resistencia a estos antibióticos están por debajo de los de *E. coli*. También se pueden aislar mutantes resistentes a compuestos tóxicos como la metilalanina o metilamonio (Gordon y Jacobson, 1983), que están afectados en la nitrogenasa, la L-metionina-DL-sulfoximina (Luque *et al.*, 1986), alterados en la glutamina sintetasa, o el clorato, análogo del nitrato, afectados en la nitrato reductasa (Sorger, 1969; Luque *et al.*, 1986; Santero *et al.*, 1986; Luque, 1987; Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993).

Un obstáculo para la obtención de mutantes recesivos y no directamente seleccionables ha sido la poliploidia. Esta barrera se ha superado permitiendo periodos prolongados de segregación en medios no selectivos tras la mutagénesis (Contreras y Casadesús, 1987; Luque *et al.*, 1987b). De esta forma se han aislado mutantes sin actividad nitrogenasa (Fisher y Brill, 1969), mutantes afectados en la utilización de azúcares (Blanco, 1989), mutantes respiratorios (McInerney *et al.*, 1984) y mutantes sin actividad nitrato reductasa (Luque, 1987; Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993). Una segunda barrera nos la encontramos a la hora de aislar mutantes auxótrofos, ya que parece ser que *A. vinelandii* no puede permear la mayoría de los aminoácidos por lo que los mutantes en sus rutas biosintéticas resultarían necesariamente letales. Sin embargo, se han obtenido mutantes auxótrofos para metionina, uracilo, hipoxantina y adenina (Mishra y Wyss, 1968; Page y Sadoff, 1976; Kennedy *et al.*, 1986; Luque *et al.*, 1987b; Blanco, 1989; Blanco *et al.*, 1990).

Introducción

1.2.3. Sistemas de transferencia genética en *Azotobacter*

1.2.3.1. Conjugación

Existe una gran cantidad de plásmidos de amplio rango de hospedador que se pueden mantener en *Azotobacter vinelandii*, entre estos se encuentran los del grupo de incompatibilidad P, Q y W. En el grupo IncP existen plásmidos autotransmisibles, como RP4 y R68.45. Estos plásmidos pueden ser movilizados desde *E. coli* a *A. vinelandii* a frecuencias de 10^{-3} - 10^{-4} por receptor y entre distintas estirpes de *A. vinelandii* es superior a 10^{-1} (Tortolero *et al.*, 1983). Otros plásmidos del grupo IncP y todos los IncQ requieren de las funciones de los genes *tra*, estas funciones son aportadas por plásmidos coadyuvantes como el propio RP4 o pRK2013, aunque este último no es capaz de mantenerse en *Azotobacter*. El número de copias de los plásmidos IncP o IncW en *E. coli* es de 1-10 por célula, y el de los IncQ es de 20-50, ya que la función de replicación es intrínseca de cada plásmido, es probable que estos números sean extrapolables a *A. vinelandii*. Se ha descrito la movilización de marcadores cromosómicos mediada por los plásmidos R68.45 y RP4. Esto ha permitido la construcción de un mapa de ligamiento en esta bacteria (Blanco, 1989; Blanco *et al.*, 1990). La movilización de marcadores entre dos estirpes de *Azotobacter vinelandii* ocurre bidireccionalmente (Blanco *et al.*, 1991b). Mediante la movilización de la resistencia a kanamicina del transposón Tn5 insertado en el cromosoma de *A. vinelandii*, por conjugación interespecífica entre esta bacteria y *E. coli* mediada por pJB3JI, un derivado kanamicina sensible de R68.45, se pueden obtener R-primas derivados de este plásmido (Blanco *et al.*, 1991a).

Los plásmidos anteriormente descritos han facilitado la construcción de genotecas, a partir de las cuales se han realizado experimentos de hibridación y clonación (Kennedy *et al.*, 1986; Kennedy y Toukdarian, 1987).

Por otra parte, los plásmidos que, sin replicarse en *Azotobacter*, pueden ser transferidos por conjugación o transformación, han sido muy útiles como vehículos suicidas para la mutagénesis con transposones o la introducción de genes mutados.

1.2.3.2. Transformación

La transferencia de material genético por transformación ha sido ampliamente estudiada en *Azotobacter vinelandii*. En esta bacteria se puede inducir el estado de competencia con gran eficiencia de transformación cuando crece en un medio carente de hierro y molibdeno (Page y vonTigerstrom, 1979; Page, 1982). Se ha descrito la transformación tanto con ADN homólogo como heterólogo (Bishop *et al.*, 1977a; Doran y Page, 1983). El material que se transfiere puede ser cromosómico o plasmídico. La transformación con ADN cromosómico ha servido para demostrar el ligamiento entre la inserción de un transposón y la mutación que provoca (Joerger *et al.*, 1986; Contreras y Casadesús, 1987), para comprobar el ligamiento entre mutaciones (Bishop y Brill, 1977), o para construir estirpes (Toukdarian y Kennedy, 1986). En cepas que se transforman a frecuencias elevadas, entre los transformantes para algún gen seleccionable se pueden aislar transformantes para genes que no lo son, fenómeno que se conoce con el nombre de congresión (Bishop *et al.*, 1980).

La transformación con ADN plasmídico se puede conseguir con métodos semejantes a los descritos para el cromosómico (Glick *et al.*, 1985). No obstante, la linearización del plásmido aumenta considerablemente la frecuencia de transformación, aunque los extremos han de ser cohesivos, ya que de lo contrario no se obtienen transformantes. Asimismo, se ha comprobado que vectores que tienen clonadas regiones homólogas al ADN de *Azotobacter vinelandii* aumentan la frecuencia de entrada, pero no se mantienen estables tras la transformación, debido a que recombinan (Doran *et al.* 1987).

1.2.3.3. Transducción

Se han descritos fagos que infectan específicamente a *A. vinelandii* y/o *A. chroococcum* (Duff *et al.*, 1961; Bishop *et al.*, 1977b). Alguno de estos fagos pueden inducir la conversión pseudolisogénica en la estirpe O de *Azotobacter vinelandii* (Thompson *et al.*, 1980). La estirpe más utilizada en los laboratorios es UW (OP), derivada sin cápsula de la cepa O, presenta características semejantes a los pseudolisógenos, por lo que se ha pensado que esta estirpe pueda ser un pseudolisógeno permanente.

Introducción

Además, se ha sugerido que la lisogenia podría tener un papel importante en la alta capacidad de transformación de la estirpe UW (Page, 1982).

1.3. METABOLISMO DEL NITROGENO

1.3.1. Asimilación de amonio: Glutamina sintetasa

En la mayoría de las bacterias, el amonio es incorporado a esqueletos carbonados vía glutamato deshidrogenasa (GDH) y/o empleando la ruta glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintetasa (GOGAT).

La GDH cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato en glutamato, figura 1. Esta reacción sólo tiene lugar cuando las concentraciones de amonio son altas, debido a la elevada Km de esta enzima para el amonio.

La vía de asimilación GS/GOGAT tiene lugar en dos etapas. En la primera, una molécula de glutamato reacciona con una de amonio para dar una de glutamina. Esta reacción está catalizada por la glutamina sintetasa. La GS es una enzima homomultimérica que en bacterias Gram negativas puede tener cada una de sus unidades en forma adenilada, inactiva, o desadenilada, activa. Esta 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, catalizada por la GOGAT, se produce una transaminación desde la glutamina antes formada hasta el 2-oxoglutarato para dar como productos dos moléculas de glutamato, figura 1.

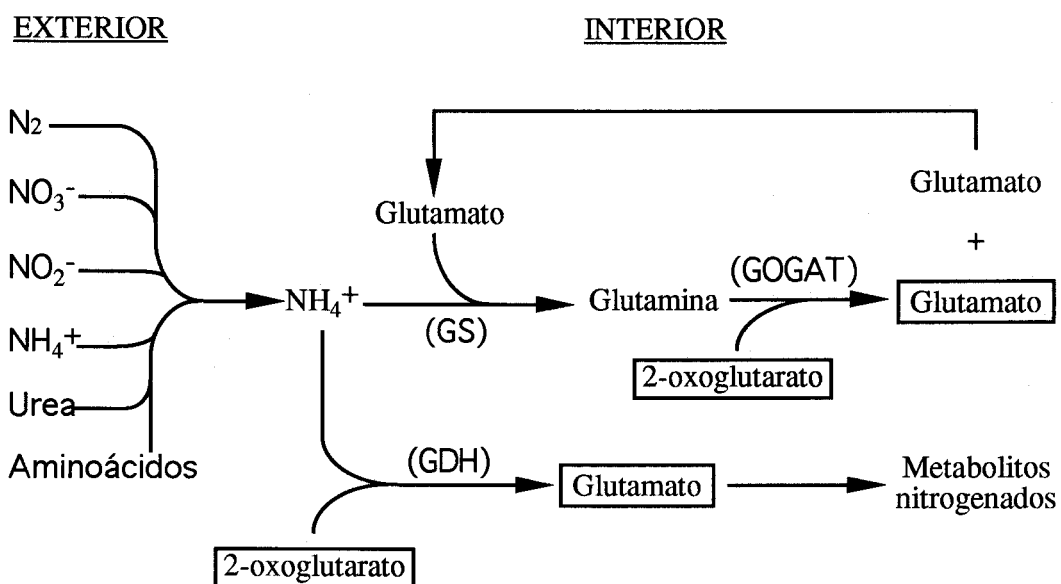


Figura 1. Vías de incorporación de amonio en bacterias

Introducción

La glutamina sintetasa está codificada por el gen *glnA*. En *A. vinelandii*, ha sido clonado y secuenciado (Toukdarian *et al.*, 1990), y a diferencia con lo descrito en enterobacterias (Magasanik, 1982), su expresión no depende del sistema *ntr* (Toukdarian *et al.*, 1990), sistema que controla los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno. En esta bacteria, parece ser que la GS es la única vía de asimilación de amonio, ya que no se ha podido detectar actividad GDH (Toukdarian y Kennedy, 1987).

1.3.2. Regulación de la producción y asimilación de amonio en bacterias: Sistema NTR

El control genético de la producción de amonio y su posterior incorporación a esqueletos carbonados se ha estudiado ampliamente en *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. 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 modelo los genes *ntrA* (o *rpoN* o *glnF*), *ntrB* (*glnL*) y *ntrC* (*glnG*), controlan la activación de los promotores *ntr*, entre ellos el promotor *nifLA*, el segundo promotor del operón *glnAntrBC*, o los promotores de utilización de arginina, histidina, prolina, etc. El producto del gen *ntrA* es un factor sigma para la ARN polimerasa llamado σ^{54} , diferente al σ^{70} convencional para los promotores de *E. coli* (Hirschman *et al.*, 1985). Se han encontrado varios promotores dependientes de σ^{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 el nitrógeno y, por tanto, se puede decir que el factor σ^{54} no está implicado exclusivamente en el metabolismo del nitrógeno. Los genes *ntrB* y *ntrC* forman un operón junto al gen *glnA*, *glnAntrBC*. Las proteínas NTRB y NTRC pertenecen a un sistema de proteínas que actúan por parejas, denominado sistema de dos componentes, donde NTRB es el sensor y NTRC es el regulador de la expresión génica de los distintos promotores sujetos a su control. NTRB fosforila o desfosforila a NTRC en respuesta a la limitación o el exceso de nitrógeno combinado, respectivamente. NTRB está modulada por la proteína P_{II}, producto del gen *glnB*, y ésta a su vez,

está controlada por la uridililtransferasa (UR/UT) producto del gen *glnD*. Cuando la concentración de amonio en el medio es baja, la relación intracelular α -cetoglutarato/glutamina es alta, y esto sirve de señal para que la P_{II} sea uridililada. 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_{II} -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), figura 2.

Cuando la relación α -cetoglutarato/glutamina es baja, la uridililtransferasa retira los grupos UMP de la P_{II} . En este momento la P_{II} 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_{II} libre interacciona con NTRB que desfosforila a NTRC, dejando entonces de activar la transcripción de los promotores que controla (Keener *et al.*, 1987), figura 2.

En *Azotobacter vinelandii* se han identificado genes homólogos estructural y funcionalmente a los descritos anteriormente. 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). Recientemente se ha aislado un gen análogo a *glnD*, al que se le ha denominado *nfrX* (Santero *et al.*, 1988; Contreras *et al.*, 1991a).

1.3.3. Fijación de nitrógeno

Mediante un mecanismo universal en todos los diazotrofos, el nitrógeno molecular es reducido hasta amonio por la acción del complejo enzimático de la nitrogenasa, transfiriendo seis electrones y rindiendo dos moléculas de amonio. Este complejo está constituido por dos enzimas solubles: el componente I, molibdoferroproteína o dinitrogenasa; y el componente II, ferroproteína o dinitrogenasa reductasa (Hageman y Burris, 1978).

El componente I tiene una estructura tetramérica del tipo $\alpha_2\beta_2$, presentando un cofactor de hierro y molibdeno que puede ser aislado separadamente de la proteína (Shah y Brill, 1977). Por su parte, el componente II es un dímero de dos subunidades idénticas (γ_2). Este

Introducción

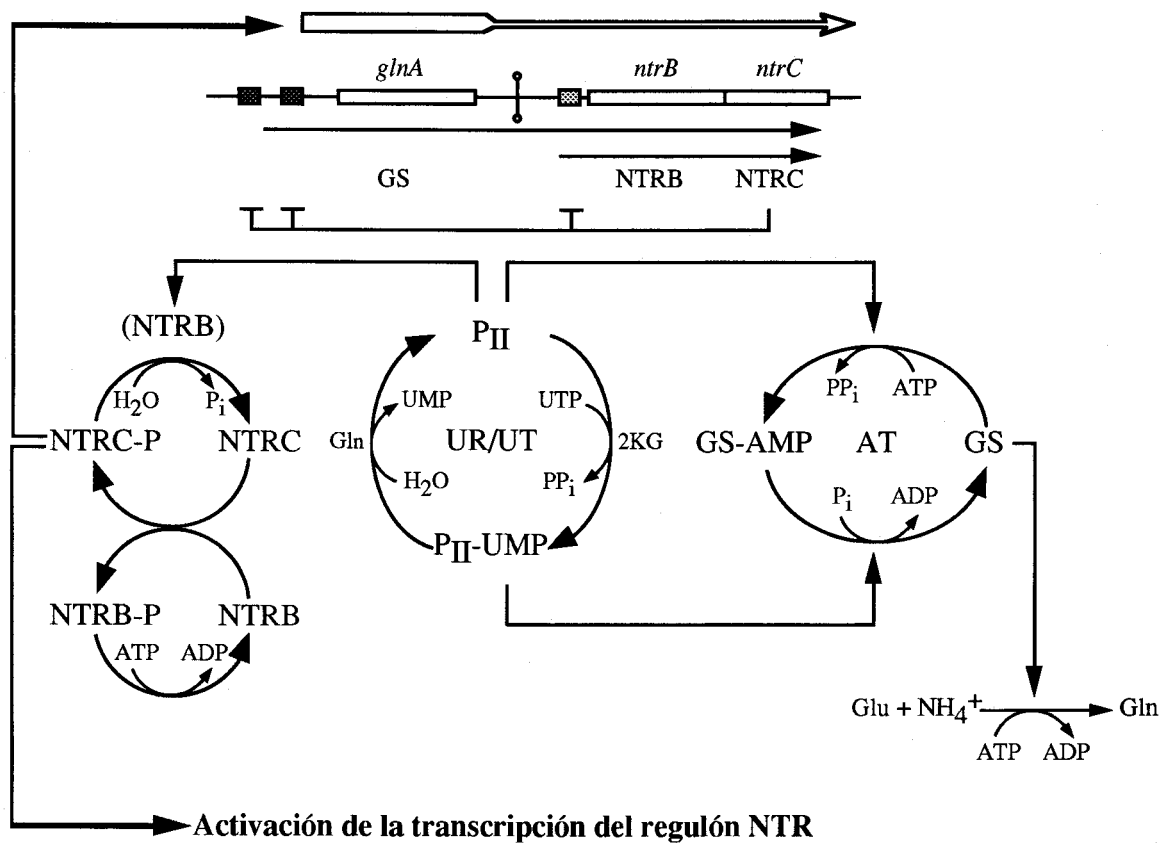


Figura 2. Modelo de regulación del sistema NTR en *E. coli* y *S. typhimurium*. (Stock *et al.*, 1989)

dímero contiene una agrupación 4S-4Fe típica de las proteínas transportadoras de electrones (Stephes *et al.*, 1979).

Durante la fijación de nitrógeno, los electrones obtenidos por el componente II a partir del donador fisiológico, son transferidos al componente I con consumo de energía. El componente I reducido los cederá al sustrato (Burriss *et al.*, 1980; Abe *et al.*, 1990), figura 3. Esta reacción se produce en anaerobiosis debido a que la nitrogenasa se inactiva irreversiblemente por la acción del oxígeno. Los mecanismos de protección que emplean los microorganismos son muy diversos. *Azotobacter* puede fijar nitrógeno en aerobiosis gracias a dos mecanismos. Por un lado, cuando está fijando N₂ 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). Por ejemplo, los genes *cydAB*, que codifican para el citocromo *d*, se transcriben de dos a tres veces más que cuando no fijan nitrógeno. Asociada a la protección respiratoria, se encuentra la formación de

membranas intracitoplasmáticas que aumentarían la actividad respiratoria. Cuando esta protección no es suficiente, los dos componentes de la nitrogenasa forman un complejo con una proteína que contiene 2Fe-2S, llamada Fe/S II o proteína de Shethna. Esta proteína protege los puntos del enzima sensibles a la oxidación (Shethna, 1970; Yates, 1977; Robson, 1979; Scherings *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.

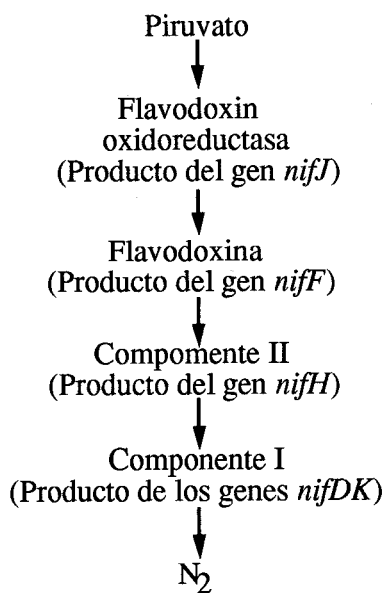


Figura 3. Modelo del transporte de electrones desde el piruvato hasta la nitrogenasa en *Klebsiella pneumoniae*.

El estudio de la genética de la fijación de nitrógeno se limitó al principio a la bacteria anaerobia facultativa *Klebsiella pneumoniae*. Sin embargo, la tecnología de recombinación del ADN *in vitro* ha facilitado el conocimiento de la organización y la regulación del sistema en otros microorganismos, como *Azotobacter*. En *K. pneumoniae* se han identificado 20 genes implicados en la fijación de nitrógeno, genes *nif*, los cuales se encuentran agrupados en una región genómica de 24.2 kb (Arnol *et al.*, 1988). En *A. vinelandii* se ha encontrado homología con 18 de estos genes (Jacobson *et al.*, 1989), siendo su organización similar a la encontrada en *K. pneumoniae*, figura 4. Presenta una región cromosómica donde se encuentran la mayoría de los genes necesarios para la fijación de nitrógeno, mientras que los genes *nifLA* y *nifB-fdxN-nifO-nifQ-ORF5* no están ligados a este grupo principal de genes (Joerger y Bishop, 1988; Blanco *et al.*, 1993; Raina *et al.*, 1993; Rodríguez-Quñones *et al.*, 1993).

Además de la nitrogenasa convencional de molibdeno anteriormente descrita, *A. vinelandii* presenta dos nitrogenasas alternativas. Una de estas nitrogenasas contiene vanadio en el cofactor en



Figura 4. Organización de los genes necesarios para la fijación de nitrógeno en *Klebsiella pneumoniae* (A) y *Azotobacter vinelandii* (B): genes *nif*, para la nitrogenasa de molibdeno en *K. pneumoniae* (A) y *A. vinelandii* (B.1 y B.2); genes *vnf*, para la nitrogenasa de vanadio (los genes E-like, N-like y X-like son homólogos a los genes *nifENX*) (B.3) y genes *anf*, para la tercera nitrogenasa (B.4) (Merrick, 1988).

lugar de molibdeno, y sólo se expresa en condiciones en las cuales no hay molibdeno en el medio. Este sistema alternativo está codificado por los genes *vnf*. Posteriormente, ha sido identificado también en *A. chroococcum* y otros microorganismos (Bishop *et al.*, 1980; Hales *et al.*, 1986; Robson *et al.*, 1986; Bishop *et al.*, 1986; Yakunin *et al.*, 1990). La segunda nitrogenasa alternativa, forma parte del sistema *anf*, no contiene ni molibdeno ni vanadio en su cofactor, y se expresa en ausencia de estos metales (Chisnell *et al.*, 1988; Pau *et al.*, 1989).

En la regulación de estos sistemas de fijación intervienen un conjunto de proteínas entre las que se incluyen: los tres activadores específicos para cada sistema, NIFA, VNFA y ANFA (Joerger *et al.*, 1989); NIFL, que, al igual que en *Klebsiella*, se requiere para la represión por amonio de los genes *nif* (Blanco *et al.*, 1993; Raina *et al.*, 1993); y NFRX, que se requiere para la expresión desde los promotores de *nifH* y *anfH* (Santero *et al.*, 1988; Contreras *et al.*, 1991a). A diferencia de *Klebsiella*, en *Azotobacter vinelandii*, NTRC no es necesaria para la transcripción de los promotores de los genes de la nitrogenasa de Mo (Toukdarian y Kennedy, 1986).

1.3.4. Reducción de nitrato en bacterias

El nitrato es un potente agente oxidante y una fuente de nitrógeno, propiedades aprovechadas por diferentes grupos de bacterias. Durante el crecimiento aerobio, eucariotas y procariotas reducen el nitrato a nitrito, reacción catalizada por la reductasa de nitrato. El nitrito producido es pasado a amonio vía nitrito reductasa, que posteriormente incorporan a esqueletos carbonados. A este proceso se le ha denominado asimilación de nitrato.

En anaerobiosis, las bacterias utilizan el nitrato como aceptor de electrones, generando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana, a lo que se conoce con el nombre de disimilación de nitrato. El nitrito generado en anaerobiosis puede ser reducido a derivados gaseosos del nitrógeno (óxidos de nitrógeno o nitrógeno molecular) por enzimas desnitrificantes. Otra posibilidad es la reducción hasta amonio vía nitrito reductasas, que pueden estar unidas a membrana

Introducción

o dependientes de NADH, generando NAD⁺ requerido para la glucólisis o para otras rutas fermentativas.

1.3.4.1. Reducción disimilatoria del nitrato y del nitrito

1.3.4.1.1. Respiración de nitrato en *E. coli*

Fisiológicamente, la nitrato reductasa de *E. coli* cumple dos funciones durante el crecimiento anaeróbico. Por un lado, disipa el exceso de potencial reductor dando formiato y NAD⁺. Por otro, genera un potencial electroquímico de protones que utiliza para el transporte activo, sintetizar ATP y otros procesos endergónicos (Garland *et al.*, 1975).

La nitrato reductasa respiratoria de *E. coli* ha sido purificada. Está formada por tres subunidades, α , β y γ , con unos pesos moleculares de 150000, 60000 y 20000 Da, respectivamente (MacGregor *et al.*, 1974; MacGregor, 1975). La estructura nativa de la nitrato reductasa podría ser $\alpha_2\beta_2\gamma_4$ (Clegg, 1976; Chaudhry y MacGregor, 1983a). La subunidad α contiene Fe no hemínico, S y Mo, el sitio activo para la reducción del nitrato (Chaudhry y MacGregor, 1983b) y está codificada por el gen *narG* (Stewart y MacGregor, 1982). La subunidad β no presenta metales, su función es desconocida, aunque puede estar implicada en la interacción entre las subunidades y la unión a la membrana de la holoenzima (Stewart y MacGregor, 1982). El gen *narH* codifica para ésta subunidad. La subunidad γ está íntimamente unida a las subunidades α y β . También contiene Fe, en forma de hemo. Presenta el espectro de absorción del citocromo *b*₅₅₆. Y está codificada por el gen *narI* (Stewart y MacGregor, 1982; Chaudhry y MacGregor, 1983a). Para la actividad enzimática, además de estos tres polipéptidos, se requiere de otro, llamado δ , que no forma parte del enzima final.

La subunidad γ está localizada en la cara periplásmica de la membrana, mientras que las subunidades α y β se encuentran en la citoplásmica (Stewart, 1988), figura 5.

Se sabe que existe una segunda nitrato reductasa en *E. coli* (Iobbi *et al.*, 1987; Iobbi-Nivol *et al.*, 1990) denominada nitrato reductasa Z (frente a la A, que sería la convencional). Presenta una estructura similar a la de la primera y sus subunidades son intercambiables (Blasco *et al.*,

1992a; Blasco *et al.*, 1992b). Los genes estructurales de la nitrato reductasa A se organizan en el operón *narGHJI* y los de la Z en el *narZYWV* (Blasco *et al.*, 1989; Blasco *et al.*, 1990).

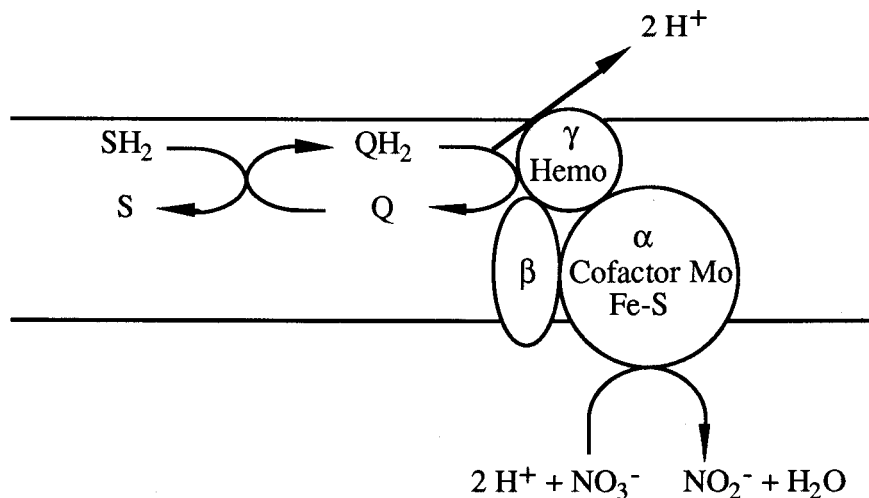


Figura 5. Representación esquemática de la nitrato reductasa de *E. coli*. El sustrato reducido (SH_2 ; formiato, glicerol-3-fosfato, lactato, etc.) es oxidado por una deshidrogenasa específica, que está acoplada a la reducción de quinol (Q; ubiquinol o menaquinol) a quinona (QH_2). La reducción de la quinona provoca la reducción del nitrato (Stewart, 1988).

El uso de fusiones en el operón *nar* ha demostrado que esta enzima se induce por nitrato en ausencia de oxígeno. Un esquema de la regulación de este operón se presenta en la figura 6 (Egan y Stewart, 1991).

El nitrito, producto de la reducción respiratoria del nitrato, puede acumularse o puede ser reducido por una nitrito reductasa. Esta reducción del nitrito a amonio en un proceso respiratorio provoca la reoxidación del NADH, y al producirse amonio, este se incorpora a esqueletos carbonados. Este enzima, al igual que la nitrato reductasa respiratoria, se induce en anaerobiosis y no es reprimible por amonio.

1.3.4.1.2. Desnitrificación

La desnitrificación da como productos finales compuestos nitrogenados gaseosos. La capacidad de crecer anaeróbicamente

Introducción

reduciendo óxidos de nitrógeno está ampliamente distribuida en eubacterias y ciertas arqueobacterias (Hochstein y Tomlinson, 1988). Es un proceso respiratorio donde los óxidos de nitrógeno sirven de aceptores de electrones y se genera ATP. Las enzimas asociadas a la desnitrificación se sintetizan en anaerobiosis, aunque este proceso puede realizarse en presencia de oxígeno (Robertson y Kuenen, 1984). Por otro lado, la presencia de nitrato, o de otros óxidos de nitrógeno, no es necesaria para la inducción de estas enzimas.

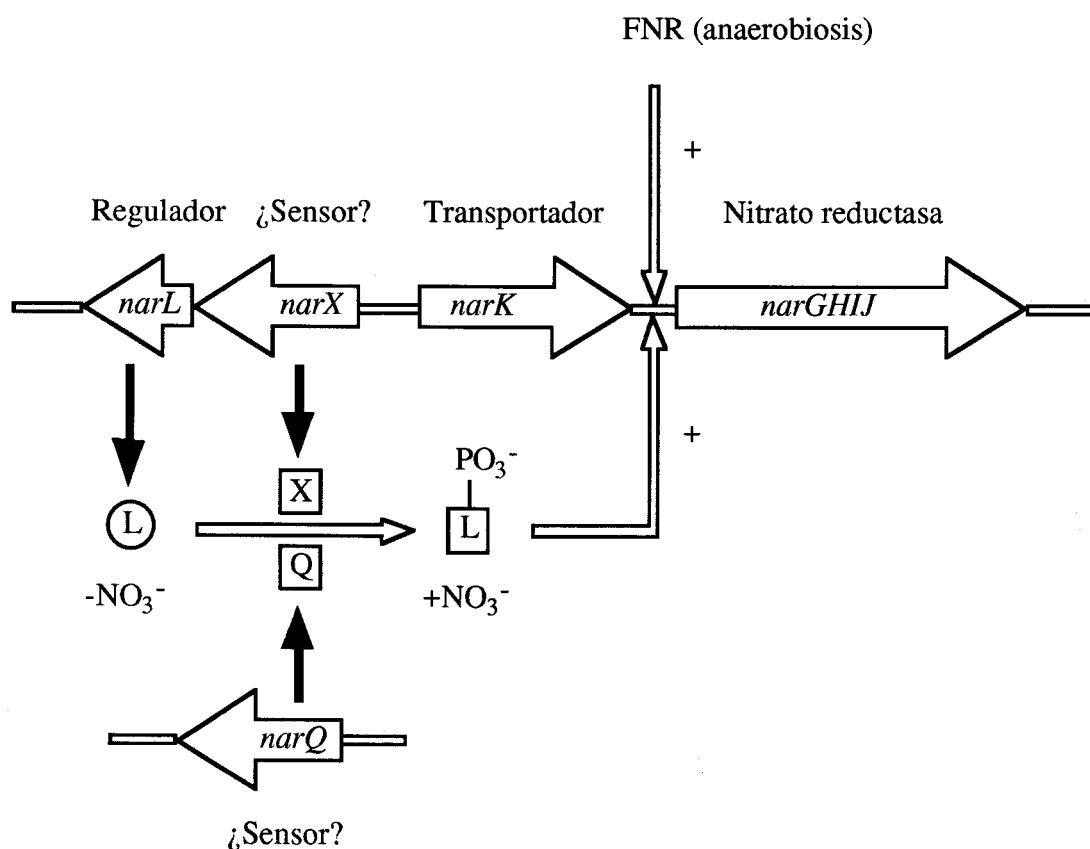


Figura 6. Esquema de la regulación de la nitrato reductasa de *E. coli*. Los genes *narGHIJ* codifican para los polipéptidos α , β , γ y δ de la nitrato reductasa. δ no forma parte del enzima (Egan y Stewart, 1991).

Se han descrito dos tipos de nitrato reductasas desnitrificantes. Unas son metaloproteínas que contienen cobre en su cofactor. Están presentes en especies como *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter cycloclastes*, *Pseudomonas aureofaciens* y *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Su peso molecular varía de unas especies a otras, al igual que el número de sus subunidades. Las otras, en contraste, contienen grupos hemo y son bastante parecidas entre sí. Tienen un peso medio de 120

kDa y están compuestas por dos subunidades, que contiene citocromos *c* y *d*. Se han descrito en los géneros *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Thiobacillus*, *Azospirillum* y *Pseudomonas*. Los productos de la reacción son óxido nítrico y/u óxido nitroso. Estos microorganismos desnitrificantes también poseen reductasas de los óxidos de nitrógeno que dan, como producto final, nitrógeno molecular, en reacciones acopladas a la producción de ATP.

1.3.4.2. Asimilación de nitrato

La asimilación de nitrato se lleva a cabo en dos pasos: el primero, la reducción de nitrato a nitrito, está catalizado por la nitrato reductasa en una reacción que requiere la transferencia de dos electrones. El segundo, catalizado por la nitrito reductasa, que pasa el nitrito a amonio con transferencia de seis electrones. Las dos enzimas requieren cofactores para su actividad: el cofactor de molibdeno en el caso de la nitrato reductasa y un grupo sirohemo para la nitrito reductasa. El amonio resultante de la actividad de ambas enzimas es incorporado a esqueletos carbonados vía glutamina sintetasa/glutamato sintetasa o glutamato deshidrogenasa.

1.3.4.2.1. Asimilación de nitrato en *Azotobacter*

En *A. chroococcum* el primer paso de la asimilación de nitrato es su transporte al interior de la célula, que se realiza 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 nitrato reductasa de *A. chroococcum* es una molibdo proteína soluble, de unos 100 kDa, cuya actividad se inhibe por cianuro y se estimula por cianato (Guerrero *et al.*, 1973). Puede utilizar ferredoxina como donador de electrones (Tortolero *et al.*, 1975), aunque no se puede concluir que este sea el donador fisiológico. Además puede usar los donadores artificiales metil viológeno y bencil viológeno. También se ha descrito una segunda forma de nitrato reductasa asociada a membrana que aparece tras subcultivos en medio líquido con nitrato tras 20 días y puede

Introducción

recibir los electrones del NADH (Vila *et al.*, 1977). No presenta actividad diaforasa como la nitrato reductasa de plantas.

En *A. vinelandii*, la nitrato reductasa aparece asociada a grandes partículas (Taniguchi y Ohmachi, 1960). Puede utilizar NADPH como donador de electrones (Bothe y Häger, 1981). Sin embargo, la enzima solubilizada no acepta electrones de este donador sino de la ferredoxina o la flavodoxina. Los experimentos realizados por Bothe y Häger se realizaron tras subcultivar *A. vinelandii* durante tres semanas, por tanto se puede decir que la situación no es muy diferente para la descrita en *A. chroococcum*. Esta enzima se ha purificado. Es un monómero que presenta un tamaño de 105 kD e *in vitro* no utiliza NADH o NADPH como donadores de electrones (Gangeswaran *et al.*, 1993). También se ha identificado otra proteína más pequeña, de aproximadamente 40 kD, asociada a la actividad nitrato reductasa (Ramos, 1992).

La nitrito reductasa de *A. chroococcum* tiene un peso de 67 kDa, presenta hierro y es dependiente de NADH (Vega *et al.*, 1973).

Se han aislado los genes de la nitrato reductasa, *nasB*, y de la nitrito reductasa, *nasA*, en *Azotobacter vinelandii*. Inserciones en el gen *nasA* dan lugar a carencia de la actividad de ambas reductasas. Por tanto, estos dos genes deben estar formando parte de un operón, donde *nasA* sería el primer gen (Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993). La primera fase de lectura en este operón, *nasA*, ha sido secuenciada parcialmente (Ramos *et al.*, 1993). El polipéptido deducido de la secuencia de ADN muestra una alta homología con la proteína NIRB de *E. coli*, la enzima nitrito reductasa dependiente de NADH. El análisis de esta homología demuestra la existencia de una región rica en glicinas fuertemente conservada que corresponde a los lugares de unión de la enzima a NAD y FAD (Peakman *et al.*, 1990).

En cuanto a la regulación, se sabe las dos reductasas son inducibles por nitrato y nitrito y reprimibles por amonio. Esta represión por amonio depende de la fuente de carbono en el medio, siendo más fuerte cuando es pobre, acetato o α -cetoglutarato, que cuando es rica, sacarosa. Se han obtenido mutantes en los que la represión por amonio independiente de la fuente de carbono (Luque *et al.*, 1987a). El gen *ntrA* es necesario para la inducción del operón y de la nitrogenasa (Santero *et al.*, 1986). El gen *ntrC* sólo interviene en la activación del sistema de la

asimilación de nitrato a diferencia de lo que ocurre en *Klebsiella*, que además participa en la regulación del sistema *nif* (Toukdarian y Kennedy, 1986). Existe una tercera región, *nasR*, que interviene en la activación de la transcripción del operón *nasAB* (Ramos, 1992). Además de estos tres 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. Mutantes que carecen de actividad nitrato reductasa presentan una expresión del operón *nasAB* independiente de la inducción por nitrato (Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993).

1.3.4.2.2. Asimilación de nitrato en otras bacterias

Uno de los primeros sistemas estudiados fue el de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria posee dos nitrato reductasas, una asimilatoria y otra disimilatoria, que son genéticamente diferentes (Sias *et al.*, 1980). Se han obtenido mutantes incapaces de asimilar nitrato, dividiéndose en tres grupos: uno formado por mutantes que carecen de actividad nitrato reductasa, otro que no tienen ninguna de las actividades reductasas y un tercer grupo, que no presentan actividad nitrito reductasa (Sias e Ingraham, 1979). Entre estos mutantes se han identificado los posibles genes estructurales de la nitrato, *nasC*, y la nitrito reductasa, *nis* (Sias *et al.*, 1980).

El género *Klebsiella*, también, puede utilizar el nitrato como fuente de nitrógeno durante condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Las especies mejor conocidas de este género son *K. pneumoniae* y *K. aerogenes*. Al igual que en *Pseudomonas aeruginosa*, los genes estructurales de las reductasas asimilatoria y disimilatoria son diferentes (Cali *et al.*, 1989; Bender y Friedrich, 1990). En *K. pneumoniae* se han aislado los genes involucrados en la reducción de nitrato hasta amonio. El gen *nasA* codifica para la nitrato reductasa y el gen *nasB* para la reductasa de nitrito (Lin *et al.*, 1993). Estos genes forman parte de un operón junto a los genes *nasFED*, que intervienen en el transporte de nitrato, y el gen *nasC*, que codifica para una proteína que transfiere los electrones desde el NADH hasta la nitrato reductasa (Lin *et al.*, 1994). De la expresión *in vivo* y de la secuencia de ADN de los genes *nasBA* se deduce que codifican para un polipéptido de 92 y 104 kDa, respectivamente (Lin *et al.*, 1993). Los mutantes en los genes *nasFED* requieren de nitrato pero

Introducción

no de nitrito para su crecimiento (Lin *et al.*, 1994). Las proteínas NASF, NASE y NASD tienen una alta homología con NRTA, NRTB y NRTD de *Synechococcus* sp., proteínas que forman parte del sistema de transporte de nitrato en esta cianobacteria. La proteína NRTA puede que sea la proteína de unión a sustrato del sistema de transporte. NRTB es una proteína hidrofóbica y presenta una estructura similar a los componentes integrales de membrana de los sistemas de membrana de transporte bacterianos dependientes de proteínas periplásmicas que unen sustrato. La proteína NRTD tienen alta homología a las ATP-asas de otros sistemas de transportes (Omata *et al.*, 1993).

La nitrato y la nitrito reductasa asimilatorias de estas bacterias están reguladas por la fuente de nitrógeno en el medio, es decir, el nitrato y el nitrito inducen el sistema, mientras que el amonio lo reprime a través del sistema NTR (van't Riet *et al.*, 1968; Cali *et al.*, 1989; Bender y Friedrich, 1990; Macaluso *et al.*, 1990). Esta regulación por la fuente de nitrógeno también se observa a nivel del transporte de alta afinidad por el nitrato (Thayer y Huffaker, 1982).

1.3.4.2.3. Asimilación de nitrato en cianobacterias

En cianobacterias, el nitrato, por debajo de una determinada concentración, entra en el interior de la célula debido a la existencia de un transporte activo. Se ha identificado una proteína de membrana implicada en este transporte en *Synechococcus* sp. (Madueño *et al.*, 1988; Omata *et al.*, 1989). Además, en esta cianobacteria, la entrada del nitrito se realiza por el mismo transportador (Luque *et al.*, 1994).

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).

Respecto 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 han aislado tres genes involucrados en la reducción de nitrato a nitrito en *Synechococcus* sp., *narA*, *narB* y *narC* (Kuhlemeier *et al.*, 1984a; Kuhlemeier *et al.*, 1984b). Se desconoce la función de los productos de los genes *narA* y *narC*, *narB* codifica para el gen estructural de la nitrato reductasa (Andriessse *et al.*, 1990; Luque *et al.*, 1992). La nitrito reductasa está codificada por el gen *nirA* (Omata, 1991). Los genes que intervienen en la reducción del nitrato hasta amonio, *narB* y *nirA*, y los de transporte (Madueño *et al.*, 1989; Omata *et al.*, 1989; Omata, 1991; Omata *et al.*, 1993), *nrtA*, *nrtB*, *nrtC* y *nrtD*, forman parte de un operón en *Synechococcus* sp. (Omata *et al.*, 1993), figura 7.



Figura 7. Región *nirA-narB* en *Synechococcus* PCC 7942 (Omata *et al.*, 1993)

En lo referente a la regulación, las cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno requieren del nitrato como inductor (Hattori, 1962; Ohmori y Hattori, 1970; Herrero *et al.*, 1981; Flores *et al.*, 1983; Herrero *et al.*, 1985) mientras que las unicelulares de los géneros *Synechococcus* y *Synechocystis* no (Stevens y van Baalen, 1974; Herrero *et al.*, 1981; Herrero y Guerrero, 1986). Recientemente se ha aislado y secuenciado un gen, *ntcA*, que se requiere para la expresión de la nitrato reductasa, la nitrito reductasa, la glutamina sintetasa, el transporte de metilamina y una proteína implicada en el transporte de nitrato. Este gen es diferente de los que integra el sistema *ntr* de bacterias y de los que intervienen en hongos (Vega-Palas *et al.*, 1990; Vega-Palas *et al.*, 1992).

1.3.4.3. Biosíntesis del FeMo-co y del Mo-co

Tanto la nitrogenasa como la nitrato reductasa contienen molibdeno en su centro activo, formando parte de los respectivos cofactores, el FeMo-co y el Mo-co. En *K. pneumoniae*, ambos cofactores

Introducción

presentan pasos comunes en su biosíntesis (Imperial *et al.*, 1985; Ugalde *et al.*, 1985).

En la figura 8 aparece un esquema del modelo del transporte del molibdeno en esta bacteria. Este metal entraría en el interior de la célula y sería transformado en un intermediario común (Mo-X) por la acción del producto del gen *mol*. Este intermediario sería incorporado a la pteridina para formar Mo-co, o bien reaccionaría con el azufre de la cisteína o un derivado que contenga este elemento para dar lugar al primer intermediario específico (Mo-Y) de la biosíntesis de FeMo-co, esta reacción esta catalizada por NIFQ.

En lo referente a la biosíntesis de Mo-co el sistema mejor caracterizado es el de *E. coli*, figura 9. El cofactor de molibdeno de la nitrato reductasa consiste en una molibdopterina unida a una molécula de GMP, dando la molibdopteridina guanina dinucleótido.

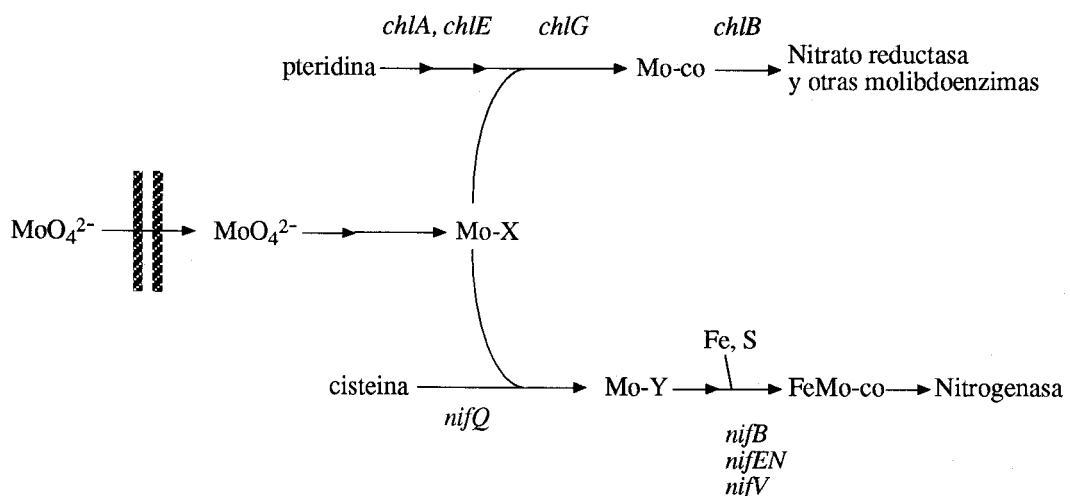


Figura 8. Biosíntesis de Mo-co y FeMo-co en *K. pneumoniae*

En el transporte de molibdeno al interior de la célula y en la biosíntesis del cofactor de molibdeno, Mo-co, en *E. coli* están implicados los genes *chl*, localizados en distintas regiones del cromosoma (Crawford y Campbell, 1990; Rajagopalan y Johnson, 1992). Un metabolito general, guanosina o un derivado, se convierte en un precursor, Precursor Z, como consecuencia de las reacciones catalizadas por los productos de

chIA1, *chIA2* y *chIA3*. Este precursor se une a otro intermediario, el factor activo de conversión, ACF, para dar lugar a la molibdopteridina, que aún no contiene Mo. Los genes *chIA4*, *chlN* y *chIA5* están implicados en la síntesis del ACF. La incorporación del Mo a la MPT depende de *chlG*, dando lugar al Mo-co, en su forma de pteridina. Por último, *chlB* estaría implicado en la incorporación del GMP al Mo-co, para dar lugar al Mo-co en su forma de molibdopteridina guanina dinucleótido, figura 9. Mutaciones en algunos de estos *loci* provocan expresión del operón de la nitrato reductasa independiente del inductor (Pascal y Chippaux, 1982; Pascal *et al.*, 1982). Esto sugiere que la acumulación de uno de los productos de la biosíntesis de Mo-co estaría actuando como efector positivo de la transcripción del operón de la reductasa de nitrato. Concretamente se trata de Mo-X (Iuchi y Lin, 1987), ya que mutaciones en el *locus chlD* no presentan expresión del operón de la nitrato reductasa (Pascal *et al.*, 1982), y el producto de este *locus* al igual que Mol, interviene en el transporte del molibdeno y en la formación de Mo-X (Imperial *et al.*, 1985; Ugalde *et al.*, 1985; Johann y Hinton, 1987). Esta inducción por Mo-X podría estar mediada por el producto de *narX*, ya que esta proteína responde a nitrato y a molibdeno (Kalman y Gunsalus, 1990).

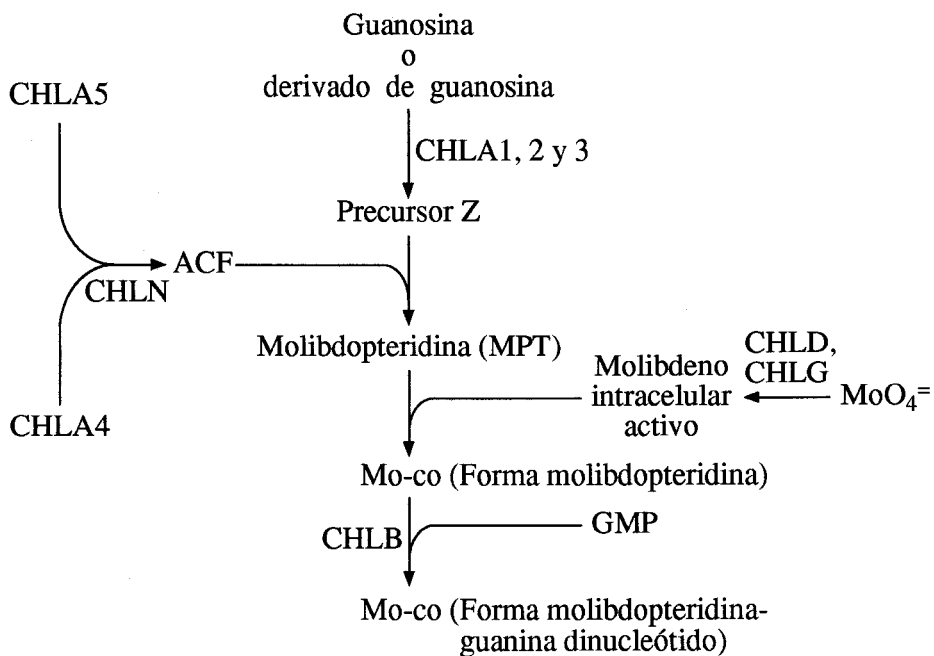


Figura 9. Síntesis de Mo-co en *E. coli* (Rajagopalan y Johnson, 1992)

Introducción

En *A. vinelandii* se han aislado genes que intervienen en el metabolismo del molibdeno. Estos genes son homólogos a los encontrados en *E. coli* y *K. pneumoniae*. Así, se han identificado genes que intervienen en el transporte del molibdeno al interior de la célula. Forman parte de un operón, *modABCD*, y las dos últimas fases de lectura abierta tienen homología con los genes *chlJ* y *chlD* de *E. coli*, respectivamente (Luque *et al.*, 1993). Por complementación se ha clonado un gen cuya función es semejante a *chlB* de *E. coli* (F. Ramos, 1992). También se han aislado los genes que intervienen en la biosíntesis de FeMo-co, que presentan una alta homología a los encontrados en *K. pneumoniae*. Se han identificado y secuenciado los genes *nifBQ* (Joerger y Bishop, 1988), *nifEN* (Dean y Brigle, 1985; Brigle *et al.*, 1987) y *nifUSV* (Beynon *et al.*, 1987). Por tanto, el metabolismo del molibdeno en *A. vinelandii* podría tener cierta similitud a lo encontrado en *E. coli* y *K. pneumoniae*.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLASMIDOS Y FAGOS

Tabla I. Estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos utilizados.

ESTIRPES, PLASMIDO O BACTERIFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
UW6	Nif-6 (I ⁻ II ⁺) Rif ^r	W. Brill
UW136	Rif ^r	W. Brill
MV92	<i>nifB</i> ::Tn5, Rif ^r	F. Luque
MV93	<i>nifB</i> ::Tn5, Rif ^r	F. Luque
MV94	<i>nifB</i> ::Tn5, Rif ^r	F. Luque
MV376	<i>nifL</i> ::KISS, Rif ^r	G. Blanco
MV511	<i>ntnC</i> 511	C. Kennedy
MV724	<i>ntxA</i> ::Tn5, Rif ^r	C. Kennedy
AS30	Nif-6 ⁻ (I ⁻ II ⁺), Nas ⁺ Nis ⁻ , Rif ^r	F. Luque
AS36	Nif-6 ⁻ (I ⁻ II ⁺), Nas ⁻ Nis ⁺ , Rif ^r	F. Luque
AS61	Nif-6 ⁻ (I ⁻ II ⁺), Nas ⁻ Nis ⁻ , Rif ^r	F. Luque
AS236	Nas ⁺ Nis ⁻ , Rif ^r	F. Ramos
AS237	Nas ⁻ Nis ⁺ , Rif ^r	F. Ramos
AS238	Nas ⁻ Nis ⁻ , Rif ^r	F. Ramos
AS249	<i>nasI</i> ::Tn5, Rif ^r	F. Ramos
AS251	<i>nasB</i> ::Tn5, Rif ^r	F. Ramos
AS252	<i>nas4</i> ::Tn5, Rif ^r	F. Ramos
AS253	<i>chlB</i> ::Tn5, Rif ^r	F. Ramos
AS257	<i>nasA</i> ::Tn5, Rif ^r	F. Ramos
AS401	<i>nifB</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS402	<i>fdxN</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS403	<i>nifO</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis

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

ESTIRPES, PLASMIDO O BACTERIFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
AS404	<i>nifQ</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS406	<i>nifO</i> ::Tn5-B20, Rif ^r	Esta tesis
AS407	<i>nifB</i> ::Tn5-B20, Rif ^r	Esta tesis
AS409	<i>nifB</i> ::Tn5, <i>nifB</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS410	<i>nifB</i> ::Tn5, <i>fdxN</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS411	<i>nifB</i> ::Tn5, <i>nifO</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS412	<i>nifB</i> ::Tn5, <i>nifQ</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS419	<i>nifO</i> ::Tn5-B21, Rif ^r	Esta tesis
AS423	<i>nifB</i> ::Tn5, <i>nifO</i> ::Tn5-B21, Rif ^r	Esta tesis
AS430	<i>nasR</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS431	<i>nasS</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS432	<i>nasS</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS433	UW136 con una inserción del cassette Ω en el punto <i>Bgl</i> II de la región <i>nasSR</i>	Esta tesis
AS434	<i>nasS</i> ::KIXX, Rif ^r	Esta tesis
AS435	<i>ntrC</i> 511, Rif ^r	Esta tesis
AS438	<i>nasB</i> ::Tn5-tet, Rif ^r	Esta tesis
AS439	<i>nasB</i> ::Tn5, <i>nasS</i> ::KIXX, Rif ^r	Esta tesis
AS440	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i> , Rif ^r	Esta tesis
AS441	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i> , <i>ntrA</i> ::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS442	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i> , <i>ntrC</i> ::Tn5, Rif ^r	Esta tesis

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

ESTIRPES, PLASMIDO O BACTERIFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
AS443	Φ nasA-lacZ, nasAB, nasS:: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS444	Φ nasA-lacZ, nasAB, nasSnasR:: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS445	Φ nasA-lacZ, nasAB, nasS::KIXX, Rif ^r	Esta tesis
AS446	Φ nasA-lacZ, nasAnasB::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS447	Φ nasA-lacZ, nasAB, nasSnasR:: Ω , nasB::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS448	Φ nasA-lacZ, nasAnasB::Tn5-tet, nasS::KIXX, Rif ^r	Esta tesis
AS449	Φ nasA-lacZ, nasAB, nas-1::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS450	Φ nasA-lacZ, nasAB, nas-4::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS451	Φ nasA-lacZ, nasAB, chlB::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS452	Φ nasS-lacZ, nasSR	Esta tesis
AS453	Φ nasS-lacZ, nasSR, ntrA::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS454	Φ nasS-lacZ, nasSR, ntrC::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS455	Φ nasS-lacZ, nasS:: Ω , Rif ^r	Esta tesis
AS456	Φ nasS-lacZ, nasSnasR:: Ω , Rif ^r	Esta tesis

Materiales y Métodos

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

ESTIRPES, PLASMIDO O BACTERIFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
AS457	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSR</i> , <i>nasB</i> ::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS458	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSR</i> , <i>nas-1</i> ::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS459	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSR</i> , <i>nas-4</i> ::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS460	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSR</i> , <i>chlB</i> ::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS464	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i> , <i>nifB</i> ::Tn5, Rif ^r	Esta tesis
AS465	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i> , <i>nifO</i> :: Ω , Rif ^r	Esta tesis
<i>Rhizobium fredii</i>		
HH103	Silvestre	Dowdle y Bohlool
RS1	<i>nasA</i> :: Ω	Esta tesis
RS2	<i>nasB</i> :: Ω	Esta tesis
<i>Escherichia coli</i>		
71-18	Δ [<i>lac-pro</i>], F'[<i>lacIQ</i> , <i>lacZ</i> Δ M15, <i>proAB</i>], <i>supE</i>	F. Luque
S17-1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , <i>recA</i> , Spc ^r	J.E. Ruiz
HB101	<i>leuB1</i> , <i>proA2</i> , <i>thi-1</i> , <i>ara-14</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , <i>recA</i> , <i>supE</i> , <i>rpsL</i> (Sm ^r), <i>galK</i> , <i>lacY</i> , <i>mtl-1</i> , <i>xyl-15</i>	J. Casadesús
KW251	F ⁻ , <i>supE44</i> , <i>galK2</i> , <i>galT2</i> , <i>metB1</i> , <i>hsdR</i> , <i>mcrB1</i> , <i>mcrA</i> , <i>argA81</i> ::Tn10, <i>recD1014</i>	Promega

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

ESTIRPES, PLASMIDO O BACTERIFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
NCM631	Tc ^r , <i>hdsS</i> , <i>gal</i> (λ DE3:: <i>lacI</i> , <i>lacUV5</i> ::Tn7 POL), Tn10	E. Santero
<u>Plásmidos</u>		
pCB267	Plásmido utilizado para construir las fusiones en los promotores estudiados en <i>A.</i> <i>vinelandii</i> , Ap ^r	F. Govantes
pCK3	(<i>nifA</i> ^{Ckp} , <i>PnifB</i> -Km), Tc ^r	C. Kennedy
pHP45 Ω	Tra ⁻ , Ap ^r , Ω (Sm ^r , Sp ^r)	F. Luque
pIZ11	Cointegrado de pRZ131 y de pCU101	A. Contreras
pIZ227	Cointegrado de pRZ131 y de pCU101	F. Govantes
pMAS19.1, pMAS19.2	Inserción de Ω en cada uno de los cortes de restricción <i>SalI</i> del fragmento cromosómico clonado en el plásmido pRM19	Esta tesis
pMAS19.4	Inserción de Ω en el corte <i>XhoI</i> del plásmido pRM19	Esta tesis
pMAS19.5	Inserción de Ω en el corte <i>BglIII</i> del plásmido pRM19	Esta tesis
pMAS20	Igual que pRM19, pero el fragmento cromosómico clonado se orienta en dirección contraria	Esta tesis
pMAS21	Fragmento <i>BglIII-EcoRI</i> del plásmido pMAS20 clonado en pTZ19R	Esta tesis
pMAS92, pMAS93, pMAS94	Fragmentos cromosómicos <i>EcoRI</i> que contienen el transposón Tn5 que provoca la mutación en las estirpes MV92, MV93 y MV94 clonados en el plásmido pTZ19R	Esta tesis

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

ESTIRPES, PLASMIDO O BACTERIFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<u>Plásmidos</u>		
pMAS941	Fragmento <i>EcoRI</i> de 3.7 kb del fago recombinante λ S7 clonado en pTZ19R	Esta tesis
pMAS941.1	Inserción de Ω en uno de los cortes de restricción <i>SphI</i> del plásmido pMAS941	Esta tesis
pMAS941.20	Fragmento <i>SphI-EcoRI</i> del plásmido pMAS941 en pTZ19R	Esta tesis
pMAS941.21	Inserción de Ω en el punto de restricción <i>NarI</i> del plásmido pMAS941	Esta tesis
pMAS941.3, pMAS941.4	Inserción de Ω en cada uno de los cortes de restricción <i>XhoI</i> del plásmido pMAS941	Esta tesis
pMAS941.5, pMAS941.6	Inserción de Tn5-B20 en el plásmido pMAS941	Esta tesis
pMAS30.3, pMAS36.1	Cósmidos de <i>R. fredii</i> que complementan los mutantes AS30, AS36 y AS61 de <i>A. vinelandii</i>	Esta tesis
pMAS30.1	Cósmido de <i>R. fredii</i> que complementa los mutantes AS30 y AS61 de <i>A. vinelandii</i>	Esta tesis
pMAS30.14	Fragmento <i>BamHI</i> de 4.5 kb del cósmido pMAS30.3 clonado en pRK404	Esta tesis
pMAS30.15	Fragmento <i>BamHI</i> de 5.5 kb del cósmido pMAS30.3 clonado en pRK404	Esta tesis
pMAS30.16	Fragmento <i>BamHI</i> de 10 kb del cósmido pMAS30.3 clonado en pRK404	Esta tesis
pMAS3.2	Fragmento <i>EcoRI</i> de 3.2 kb del cósmido pMAS30.3 clonado en pTZ19R	Esta tesis

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

ESTIRPES, PLASMIDO O BACTERIFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<u>Plásmidos</u>		
pMAS4.2	Fragmento <i>EcoRI</i> de 4.2 kb del cósmido pMAS30.3 clonado en PTZ19R	Esta tesis
pMAS3.2 Ω	Inserción del cassette Ω en la diana <i>Bg/III</i> del plásmido pMAS3.2	Esta tesis
pMAS4.2 Ω	Inserción del cassette Ω en la diana <i>Bg/III</i> del plásmido pMAS4.2	Esta tesis
pMAS39	pMP092 con los genes <i>sacB-sacR</i> de <i>B. subtilis</i> , Tc ^r , Km ^r	Esta tesis
pMAS39.32 Ω	pMAS39 con el inserto de pMAS3.2 Ω	Esta tesis
pMAS39.42 Ω	pMAS39 con el inserto de pMAS3.4 Ω	Esta tesis
pMAS30.32 Ω	pMAS30.3 con la inserción del cassette Ω del plásmido pMAS32 Ω	Esta tesis
pMAS30.42 Ω	pMAS30.3 con la inserción del cassette Ω del plásmido pMAS42 Ω	Esta tesis
pMP092	Vector de clonación de amplio rango de hospedador	H. Spaink
pMP220	Plásmido utilizado para construir las fusiones en el promotor <i>nasAB</i> de <i>R. fredii</i> , Tc ^r	H. Spaink
pPN12	<i>PnasAB</i> de <i>A. vinelandii</i> clonado en pCB267	Esta tesis
pPN61.2	<i>PnasSR</i> de <i>A. vinelandii</i> clonado en pCB267	Esta tesis
pPN61.8	Fragmento <i>SalI</i> de 1 kb de pRM19 clonado en pTZ19R	Esta tesis

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

ESTIRPES, PLÁSMIDO O BACTERIFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<u>Plásmidos</u>		
pPN61.8Δ2-KIXX	Delección del fragmento <i>Sall</i> de 1 kb de pPN61.8 e inserción del cassette Ω	Esta tesis
pPNR2	<i>PnasAB</i> de <i>R. fredii</i> en orientación inversa clonado en pMP220	Esta tesis
pPNR2R	<i>PnasAB</i> de <i>R. fredii</i> clonado en pMAS220	Esta tesis
pRK2013	Tra ⁺ , Km ^r	Figurski y Helinski, 1979
pRK404	Vector de clonación de amplio rango de hospedador, derivado de pRK290, Mob, Tc ^r	F. Luque
pRM12	Fragmento <i>EcoRI</i> de 7 kb de λnas3.1	F. Ramos
pRM19	Fragmento <i>EcoRI</i> que contiene la región <i>nasSR</i> clonado en pTZ19R	F. Ramos
pTZ18R	Vector multifuncional. Contiene una región de múltiples dianas de clonación, se puede utilizar para secuenciar ADN y para la expresión <i>in vivo</i> de la zona clonada. Tra ⁻ , Ap ^r	F. Luque
pTZ19R	Igual que pTZ18R, pero la región de múltiples dianas de clonación se orienta en dirección contraria	F. Luque
pUC4-KIXX	Tra ⁻ , Ap ^r , KIXX (km ^r)	F. Luque
pUM24	Plásmido con los genes <i>sacB-sacR</i> de <i>B. subtilis</i> , Ap ^r , km ^r	G. Blanco

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

ESTIRPES, PLASMIDO O BACTERIFAGO	GENOTIPO O FENOTIPO	ORIGEN O REFERENCIA
<u>fagos</u>		
λ S7	Bacteriofago recombinante que contiene la región cromosómica que corrige las mutaciones de las estirpes MV92, MV93 y MV94	Esta tesis
λ B20	Portador de Tn5-B20 para hacer fusiones	F. Romero
λ B21	Portador de Tn5-B21 para hacer fusiones	F. Romero

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 ₄ * 7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ * 2H ₂ O	5 mg
NaCl	0.2 g
Solución Fe-EDTA	1 ml
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.29 mg
Sacarosa	20 g
Tampón fosfato 0.5 M (pH 7.5)	40 ml
H ₂ 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. *Rhizobium fredii*

Para cultivar las estirpes de *R. fredii* se utilizaron diferentes medios de cultivo dependiendo de la finalidad del experimento. Cuando se trataba de medios de cultivos líquidos se incubaron en un agitador orbital a 180 r.p.m. Los cultivos sólidos, por su parte, se hicieron añadiendo a los anteriores 15 g/l de agar ADSA-MICRO. La temperatura de incubación fue de 28°C.

El medio rico empleado fue TY (Beringer, 1974). Su composición es la siguiente:

Extracto de levadura	3 g
Triptona	5 g
CaCl ₂	0.5 g
H ₂ O	hasta 1 l

Finalmente el pH debe ser ajustado a 6.8-7 y el medio se autoclava 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión.

Cuando se quiso analizar el efecto de la fuente de nitrógeno se empleó el siguiente medio:

KH ₂ PO ₄	7.4 mM
K ₂ HPO ₄	5.8 mM
MgSO ₄	2.5 mM
FeCl ₃	37 µM
CaCl ₂	0.67 mM
Succinato sódico	10 mM

Suplementado con glutamato sódico (10 mM), NO₃K (10 mM), NO₃NH₄ (10 mM) ó CINH₄ (10 mM) como fuente de nitrógeno.

Materiales y Métodos

2.2.3. *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 agar de cobertera, utilizado en las infecciones con fagos, llevaba 7.5 g/l de agar.

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 ₂ O	hasta 1 l
El pH se ajusta a 7.2 con NaOH	

Para experimentos de infección con el fago λ se añadía además MgSO₄ * 7H₂O 10 mM. En estos experimentos se usaba también el medio TBMM:

Triptona	10 g
NaCl	5 g
MgCl ₂	10 mM
Maltosa	2 g
H ₂ O	hasta 1 l

En los experimento de secuenciación de ADN, para el aislamiento de ADN de cadena simple, la estirpe de *E. coli* se crecía en el medio 2 x YT:

Triptona	16 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	10 g
H ₂ O	hasta 1 l

Medios y condiciones de cultivo

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

MgSO ₄ * 7H ₂ O	2.5 g
Acido cítrico	25 g
K ₂ HPO ₄	125 g
CINH ₄	11 g
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	32.8 g
H ₂ 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 µg/ml)	0.5 ml

2.2.4. 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>	<i>R. fredii</i>
Espectinomicina	10	100	50
Kanamicina	2	40	50
Tetraciclina	4	20	4
Acido nalidíxico	20	25	20
Ampicilina	50	100	-

Materiales y Métodos

	<i>A. vinelandii</i>	<i>E. coli</i>	<i>R. fredii</i>
Cloranfenicol	-	25	-
KClO ₃	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

KH ₂ PO ₄	10.88 g
K ₂ HPO ₄	73.12 g
H ₂ O	hasta 1 l

2.3.2. Solución de Fe-EDTA

Solución A:

EDTA ácido libre	16 g
KOH	10.4 g
H ₂ O	hasta 186 ml

Solución B:

FeSO ₄ * 7H ₂ O	13.7 g
H ₂ 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

Materiales y Métodos

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 STE

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

2.3.7. CTAB/NaCl

NaCl	4.1 g
CTAB	10 g
H ₂ O	hasta 100 ml

Se calentaba a 65°C hasta disolverlo completamente.

2.3.8. Tampón TE

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

2.3.9. Tampón TES

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

2.3.10. Tampón TESL

Similar al TES pero 100 veces menos EDTA y NaCl.

2.3.11. Tampón SSC (x20)

NaCl 3 M, citrato sódico 0.3 M, pH 7.

2.3.12. Tampón TAE (x50)

Trisma base	242 g
Acido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M (pH 8)	100 ml
H ₂ O	hasta 1 l

2.3.13. Tampón TBE (x10)

Trisma base	162 g
Acido bórico	27.5 g
EDTA sal disódica	9.5 g
H ₂ O	hasta 1 l

Materiales y Métodos

2.3.14. Tampón de lisis para *Azotobacter vinelandii*

SDS 0.2 %, 2 x SSC

2.3.15. 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).

2.3.16. Tampón para el ligamiento de ADN

Se utilizaba el tampón suministrado por Promega.

2.3.17. Tampón Z para β -galactosidasa

Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	10.6 g
NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O	6.24 g
KCl	0.75 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.246 g
β -mercaptoetanol	2.7 ml
H ₂ O	hasta 1 l
Ajustar el pH a 7	

2.3.18. Tampón SM

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

2.3.19. 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; MgCl₂, 50 mM; pH 9.5

2.3.20. 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.

2.3.21. 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

Materiales y Métodos

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

Tampón de electrodos x10:

Trisma 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%

2.3.22. Soluciones para electroforesis de secuenciación de ADN

	Geles al 4%	Geles al 6%
Acrilamida	40 g	60 g
N-N' metilen-bis-acrilamida	2.4 g	3.2 g
Urea	460 g	460 g
TBEx10	100 ml	100 ml
H ₂ O	hasta 1 l	hasta 1 l

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. Las células de *R. fredii* se permeabilizaban con MTAB, 20 µg/ml. La mezcla de ensayo contenía:

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

La mezcla se incubaba a 30°C durante 60 minutos cuando los ensayos se realizaban con células de *A. vinelandii* y durante 15 minutos cuando se trataba de *R. fredii*. 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 ₂ 10 mM	0.1 ml
Metil viológeno 1.5 mM	0.14 ml
H ₂ O	0.26 ml
Células	0.2 ml
Na ₂ S ₂ O ₄ (26 mg/ml en NaHCO ₃ 0.29 M)	0.2 ml

Materiales y Métodos

La mezcla se incubaba a 30°C durante 60 minutos cuando los ensayos se realizaban con células de *A. vinelandii* y durante 15 minutos cuando se trataba de *R. fredii*. 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 μ l de cloroformo y 25 μ l de SDS 0.1 %. Tras incubar 10 minutos a 30°C se añadían 200 μ l 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 Na₂CO₃ 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: $1000 \times [\text{DO}_{420\text{nm}} / (t \times v \times \text{DO}_{600\text{nm}})]$, donde t es el tiempo desde la adición de ONPG hasta que se añadió el Na₂CO₃ en minutos, v es el volumen de cultivo en ml y DO_{600nm} corresponde al cultivo de partida.

2.5. METODOS ANALITICOS

2.5.1. 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.

2.5.2. Determinación de proteína

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

Solución A:

Na ₂ CO ₃	2%
NaOH	0.4%
Tartrato NaK	0.16%
SDS	1 %

Solución B:

CuSO ₄ * 5H ₂ O	4%
---------------------------------------	----

Solución C:

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

Solución D:

Folín 1:1 con agua destilada.

Materiales y Métodos

El procedimiento era el siguiente: a 1 ml de muestra diluida en NaOH 0.1 N con 20-40 μg 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.

2.5.3. Medidas de pH

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

2.5.4. Medidas espectrofotométricas

Se llevaban a cabo utilizando un espectrofotómetro Pharmacia LKB modelo Novaspec II.

2.6. ANALISIS DE PROTEINAS

2.6.1. 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.

2.6.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturantes

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):

Miosina	200000
β -galactosidasa de <i>E. coli</i>	116250
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

2.6.3. 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 al 0.25%, metanol al 40% y ácido acético al 10%. Tras 1 hora de tinción, se

lavaba varias veces con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10%.

2.6.4. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante autorradiografía

Posteriormente, los geles se secaban sobre un filtro Whatman 3MM a 80°C, durante 2 horas, en un secador de geles Hoefer modelo SE 1160 conectado a una bomba de vacío.

Los geles se aplicaban a una película de rayos X (Kodak X-OMAT S Film) y se introducían en carcasas de exposición que se mantenían a -70°C hasta el momento del revelado de la película, que se realizaba con productos suministrados por Valca siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6.5. Expresión de proteínas de *A. vinelandii* en *E. coli*

Se empleaba el sistema de la ARN polimerasa de T7 (Tabor y Rychardson, 1985). La estirpe NCM631 de *E. coli* lleva, en su cromosoma, el gen de la ARN polimerasa de T7 clonado bajo el promotor P_{lac} de *E. coli* y su expresión es, por tanto, inducible por IPTG. Para mantener bajos niveles basales de ARN polimerasa de T7 se introducía por transformación el plásmido pIZ227, portador del represor de P_{lac}. Los fragmentos de ADN de *A. vinelandii* cuya expresión se quería estudiar estaban clonados en pTZ19R, bajo un promotor dependiente de la ARN polimerasa de T7. Estos plásmidos se introducían por transformación en NCM631/pIZ227. El marcaje específico de los productos proteicos de los genes de *A. vinelandii* se hacía de la siguiente manera: la estirpe NCM631 con la combinación de dos plásmidos correspondientes (plásmido con represor más plásmido con genes de *Azotobacter vinelandii*) se incubaba a 37°C y con agitación en medio rico de Luria-Bertani hasta que alcanzaba una DO_{600nm} de 0.4. En este momento se lavaba el cultivo con el medio mínimo E, se resuspendía en ese mismo medio, se añadía IPTG a 1 mM de concentración final para inducir la producción de ARN polimerasa de T7 y se volvía a incubar durante 2 horas. A continuación se añadía rifampicina a 200 µg/ml, que inhibe la ARN polimerasa de *E. coli* pero no la de T7, y se incubaba 30

minutos. Finalmente, a 1 ml de este cultivo se le añadían 10 μ l (10 μ Ci) de una mezcla de metionina y cisteína marcadas con ^{35}S , se incubaba otros 5 minutos, se recogían las células por centrifugación, se resuspendían en 100 μ l de tampón de equilibrio y se sometían a una temperatura de 95-100°C durante 5 minutos. Los extractos proteicos así obtenidos se sometían a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y se analizaban mediante autorradiografía.

2.7. METODOS GENETICOS Y DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.7.1. Mutagénesis de pMAS941 con Tn5-B20

Para lograr fusiones *lacZ* en pMAS941 se introducía este plásmido en la estirpe S17-1 de *E. coli*. Esta estirpe era entonces infectada con λ -B20, vector de Tn5-B20. La selección se hacía en cajas de medio Luria-Bertani con kanamicina. Sólo crecían aquellos en que se hubiera producido un salto del transposón, bien al cromosoma, bien al plásmido pMAS941. Se aislaban los plásmidos de las colonias resultantes y se transferían por transformación a la estirpe 71-18 de *E. coli*, seleccionando de nuevo el paso de la resistencia a kanamicina y el de la resistencia a ampicilina del plásmido. A las colonias resultantes se les estudiaba el plásmido que contenían, esperándose que cada inserción de Tn5-B20 fuese diferente en cada caso.

2.7.2. Conjugación

2.7.2.1 *Azotobacter vinelandii*

Generalmente, se mezclaban 1 ml de *E. coli* y 5 ml de *A. vinelandii* de cultivos estacionarios. La mezcla se centrifugaba y se depositaba en una caja de BSNA, donde se incubaba a 30°C durante 15 horas. La mezcla obtenida se plaqueaba en el medio selectivo adecuado. En ocasiones se añadía a la mezcla inicial 1 ml de cultivo de HB101/pRK2013 como coadyuvante.

2.7.2.2. *Rhizobium fredii*

Las conjugaciones bacterianas para la transferencia de plásmidos desde *E. coli* a *R. fredii* se realizaron mezclando 1 ml del cultivo en fase estacionaria del rizobio con 0.5 ml de la estirpe de *E. coli*. Dado que los plásmidos que se emplearon no eran autotransmisibles, se necesitaba la presencia de un plásmido coadyuvante. En estos casos se conjugaba también la estirpe HB101/pRK2013. Posteriormente se centrifugaba la mezcla, se descartaba el sobrenadante y se resuspendían las células en 100 μ l de TY. Esta suspensión se depositaba en la superficie de una caja de

Petri con TY. Finalmente la conjugación se incubaba durante 24 h a 28°C, se recogía y se extendía en el medio selectivo apropiado.

2.7.2.2. *Escherichia coli*

En el caso de la transferencia de plásmidos a *E. coli* se realizaron mezclando 1 ml de cultivo en fase estacionaria de cada estirpe de *E. coli*. Además, se añadía 1 ml de la estirpe HB101/pRK2013 ó HB101/pCU101 como plásmidos coadyuvantes. La mezcla se centrifugaba y se depositaba en la superficie de una caja de Petri con Luria-Bertani. La conjugación se incubaba durante 12 h a 37 °C, se recogía y se extendía en el medio selectivo apropiado.

2.7.3. Transformación

2.7.3.1. *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 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 incubar 15 horas a 30°C, la biomasa resultante se sembraba en el medio selectivo adecuado.

Para transformar 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.

2.7.3.2. *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 10⁴ r.p.m. durante 10 minutos, y se resuspendían en la mitad del volumen inicial de CaCl₂ 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 CaCl₂ 50 mM y glicerol 15% frío, se mantenía en hielo durante al menos 2 horas. Tras 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 se 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 apropiados.

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 α del gen *lacZ* (Ullman *et al.*, 1967), el medio de selección se suplementaba con IPTG (0.2 mM) y X-gal (50 μ g/ml).

2.7.4. Infección

Para obtener calvas de lisis de los bacteriófagos recombinantes de una genoteca de *A. vinelandii* construida en λ GEM12, se empleaba un cultivo en TBMM de la estirpe KW251 de *E. coli*. Este cultivo se centrifugaba y se resuspendía en medio volumen de SM. Se tomaba 100 μ l y se les añadía 10 μ l de suspensión de fagos. La mezcla se incubaba a 37°C durante 20-30 minutos y se sembraba, con agar de cobertera, en cajas de medio de Luria-Bertani suplementado con MgSO₄ 10 mM, que se incubaban 15-24 horas a 37°C.

2.7.5. Aislamiento de ADN

2.7.5.1. 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 μ g/ml.

2.7.5.2. Aislamiento de ADN cromosómico de *A. vinelandii*

2.7.5.2.1. 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.

2.7.5.2.2. 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.

2.7.5.3. Aislamiento de ADN de λ

Se mezclaban 50 µl de una suspensión de bacteriófagos con 100 µl de un cultivo de *E. coli* KW251 resuspendido en SM. Se incubaba a 37°C durante 20 minutos y se pasaba a un matraz con 100 ml de Luria-Bertani

suplementado con MgSO_4 10 mM y maltosa al 0.2% que se incubaba a 37°C durante una noche y con agitación vigorosa. Se añadían 5 ml de cloroformo, se incubaba en hielo durante 30 minutos y se centrifugaba. Al sobrenadante se le añadía ADNasa (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y ARNasa (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaba a 37°C durante 30 minutos. Se añadía NaCl a concentración final de 1 M y polietilenglicol (PEG 6000) al 10% (p/v). Se disolvía a temperatura ambiente, se incubaba una hora en hielo, se centrifugaba a 11000 g durante 10 minutos a 4°C y se eliminaba el sobrenadante. El resto se dejaba secar 5 minutos y se resuspendía en 2 ml de SM. Esto se repartía en tubos Eppendorf. A cada tubo se le añadía el mismo volumen de cloroformo:isoamílico en proporción 1:24, se mezclaban bien, se centrifugaba 5 minutos y se recogía la fase acuosa. Para lisar los fagos se añadía EDTA a 20 mM de concentración final, proteinasa K a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y SDS al 0.5% y se incubaba a 65°C durante 1 hora. Después se añadían 150 μl de NaCl 5M y 80 μl de CTAB/NaCl, mezclando bien tras cada adición, y se incubaba 10 minutos a 65°C. Se añadía el mismo volumen de cloroformo:isoamílico, se centrifugaba 5 minutos, se retiraba la fase acuosa y se trataba con el reactivo de Holmes-Bonner. Por último, el ADN se precipitaba con dos volúmenes de etanol a -20°C durante 30 minutos, centrifugando 15 minutos, se lavaba con etanol al 70%, se secaba y se resuspendía en tampón TE (100 $\mu\text{l}/\text{tubo}$).

2.7.6. Restricción de ADN

Las endonucleasas de restricción empleadas eran suministradas por la casa Promega y se utilizaba 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.

2.7.7. 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

Materiales y Métodos

45 minutos en presencia de EGTA a una concentración final de 10 mM, fenolización y precipitación con etanol.

2.7.8. Relleno de extremos cohesivos

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

2.7.9. 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 μ l de tampón de ligamiento. Luego se añadía 1 μ l (1 U/ μ 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*.

2.7.10. 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 λ con diferentes enzimas de restricción o se utilizaba el ADN del plásmido pGEM-3 tratados con las endonucleasas *Hinf*I, *Rsa*I y *Sin*I. Las bandas obtenidas en cada caso eran las siguientes (en pb) aparecen en la tabla II.

Tras 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.

2.7.11. 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.

ADN λ /BamHI	ADN λ /EcoRI	ADN λ /HindIII	ADN λ /SmaI	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 λ , para evitar esto el ADN de λ digerido con la enzima de restricción se puede calentar a 68°C durante 10 minutos.

2.7.12. 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.

2.7.12.1. 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 luz ultravioleta durante 2 minutos.

Para las hibridaciones contra la genoteca, las cajas donde estaban las calvas de lisis originadas por los bacteriófagos recombinantes se

Materiales y Métodos

dejaban una hora en frío. Luego se colocaba un filtro sobre las calvas y se dejaba 5 minutos, tras los cuales el filtro se incubaba 15 minutos sobre papel Whatman 3MM saturado con una solución de NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M, se secaba en papel Whatman 3MM y se incubaba de nuevo en el mismo soporte saturado esta vez con Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5, NaCl 1.5 M y EDTA 0.001 M. Por último se lavaba con 2xSSC y el ADN se fijaba en el transiluminador de luz ultravioleta.

2.7.12.2. 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.

2.7.12.3. Hibridación de ADN con sondas marcadas con digoxigenina

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:

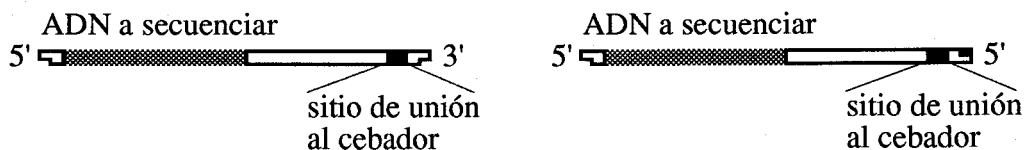
- 1) Método colorimétrico. La reacción cromática se producía en presencia de NTB y X-fosfato.
- 2) Método quimioluminiscente Lumi-Phos 530.

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

2.7.13. Secuenciación de ADN

2.7.13.1. Construcción de plásmidos conteniendo deleciones 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.

2.7.13.2. Aislamiento de ADN de cadena simple a partir de plásmidos derivados de pTZ18R o pTZ19R

Para aislar ADN de cadena simple a partir de plásmidos que llevaban un fragmento de ADN a secuenciar clonados en los vectores pTZ18R o pTZ19R se cultivaba la estirpe 71-18 de *E. coli* en medio 2xYT hasta fase estacionaria a 37°C con fuerte agitación. Se recogía las células por centrifugación, se añadía PEG/NaCl al sobrenadante y se incubaba durante una hora en hielo para precipitar las partículas de fagos. El sedimento se resuspendía en agua y se trataba con el reactivo de

Materiales y Métodos

Holmes-Bonner y después con cloroformo:isoamílico. Se añadía acetato sódico 3 M, pH 4.8 y se precipitaba con etanol. Por último, se lavaba con etanol al 70% y se resuspendía el ADN de cadena simple en agua estéril.

2.7.13.3. Reacciones de secuenciación

Las reacciones de secuenciación se llevaban a cabo utilizando los "kit" suministrados por las casas comerciales Pharmacia ("T7Sequencing™") y United States Biochemical ("Sequenase®, version 2.0"), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Estos métodos se basan en el uso de dideoxirribonucleótidos para producir paradas aleatorias durante la reacción de polimerización. Se utilizaba ADN de cadena simple y como nucleótido marcado [³⁵S]dATPαS (Amersham).

2.7.13.4. Electroforesis de las reacciones de secuenciación en geles de poliacrilamida

Los productos de las reacciones de secuenciación se separaban en geles de poliacrilamida al 6% interrumpiendo la electroforesis en unos casos cuando el azul de bromofenol llegaba al borde del gel, y en otros cuando el xilen-cianol salía del mismo. También se realizaban separaciones en geles de poliacrilamida al 4%, que se interrumpían cuando el xilen-cianol iba a salirse. Con ello se conseguía leer aproximadamente 250-450 bases a partir de un mismo fragmento de ADN.

2.7.13.5. Secado y autorradiografía del gel

Terminada la electroforesis, los geles se transferían a un filtro Whatman 3MM y se secaban a 80°C, durante 2 horas, en un secador de geles Hoefer modelo SE 1160 conectado a una bomba de vacío.

La exposición de la película de autorradiografía se realizaba a temperatura ambiente.

2.7.14. 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 FASTA (Pearson y Lipman, 1988) de comparación de secuencias.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Capítulo 1

3.1. CARACTERIZACION DE UNA REGION REGULADORA DE LA ASIMILACION DE NITRATO EN *Azotobacter vinelandii*

En *Azotobacter vinelandii* se han descrito tres genes equivalentes a los *ntr* de enterobacterias: *ntrA*, *ntrB* y *ntrC* (Santero *et al.*, 1986; Toukdarian y Kennedy, 1986), que regulan la síntesis de las reductasas del nitrato y del nitrito. A partir de una genoteca de la estirpe UW136 construida en el fago λ -GEM12 se habían aislado por hibridación los genes estructurales implicados en la asimilación de nitrato (Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993). Uno de los fagos recombinantes aislados, λ nas3.1, contenía parte del gen que codifica para la nitrato reductasa, *nasB*, el gen de la nitrito reductasa completo, *nasA*, y además corregía la mutación de la cepa AS61. Esta mutación se encontraba a 10 kb del operón *nasAB*, en un fragmento *EcoRI* de 4 kb (Ramos, 1992). El mutante AS61 carecía simultáneamente de actividad nitrato y nitrito reductasa y no estaba afectado en el sistema *ntr* (Luque, 1987). Por esta razón se pensó que dicho fragmento cromosómico contenía una región, a la que se denominó *nasR*, necesaria para la inducción del sistema de asimilación de nitrato. Para comprobar esta hipótesis se realizaron los estudios que se describen a continuación.

3.1.1. Delimitación mediante inserciones de la región *nasR*

Con objeto de delimitar la región *nasR* se generaron mutantes que tuviesen insertado el elemento genético Ω en la región *nasR* a lo largo del fragmento *EcoRI*. Se partió del plásmido pRM19. La estrategia seguida para la obtención de estas inserciones se muestra en las figuras 10, 11 y 12. Dichas inserciones se introdujeron en la estirpe silvestre UW136 por transformación y se seleccionaron en medio mínimo y espectinomicina. Posteriormente se comprobó el fenotipo de las cepas que contenían cada inserción en medio mínimo suplementado con clorato. El resultado se recoge en la figura 13. Las inserciones en los puntos de restricción *SalI* y *XhoI* provocaban resistencia a clorato, mientras que esto no ocurría en la inserción en *BglII*. Las actividades nitrato y nitrito reductasa confirmaron estos datos como se muestra en la tabla III. Los mutantes AS430 (inserción de Ω en una de las dianas *SalI* de la región *nasR*), AS431 (Ω en

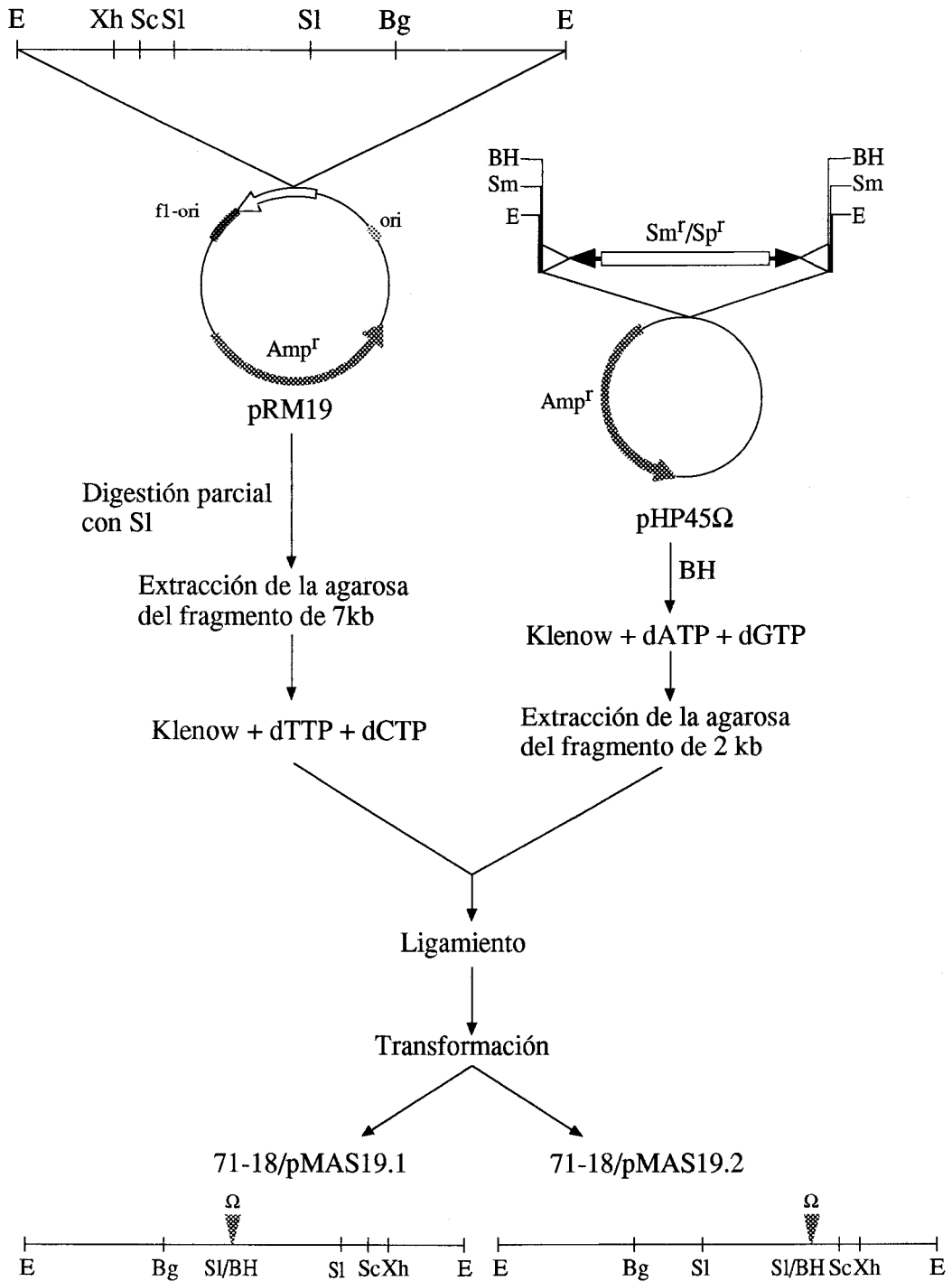


Figura 10. Delimitación de la región *nasR*. Clonación del elemento genético Ω en las distintas dianas de restricción *SalI* del fragmento *EcoRI* de 4 kb. La endonucleasas *SalI* también tienen una diana de reconocimiento en el sitio de clonación múltiple del vector.

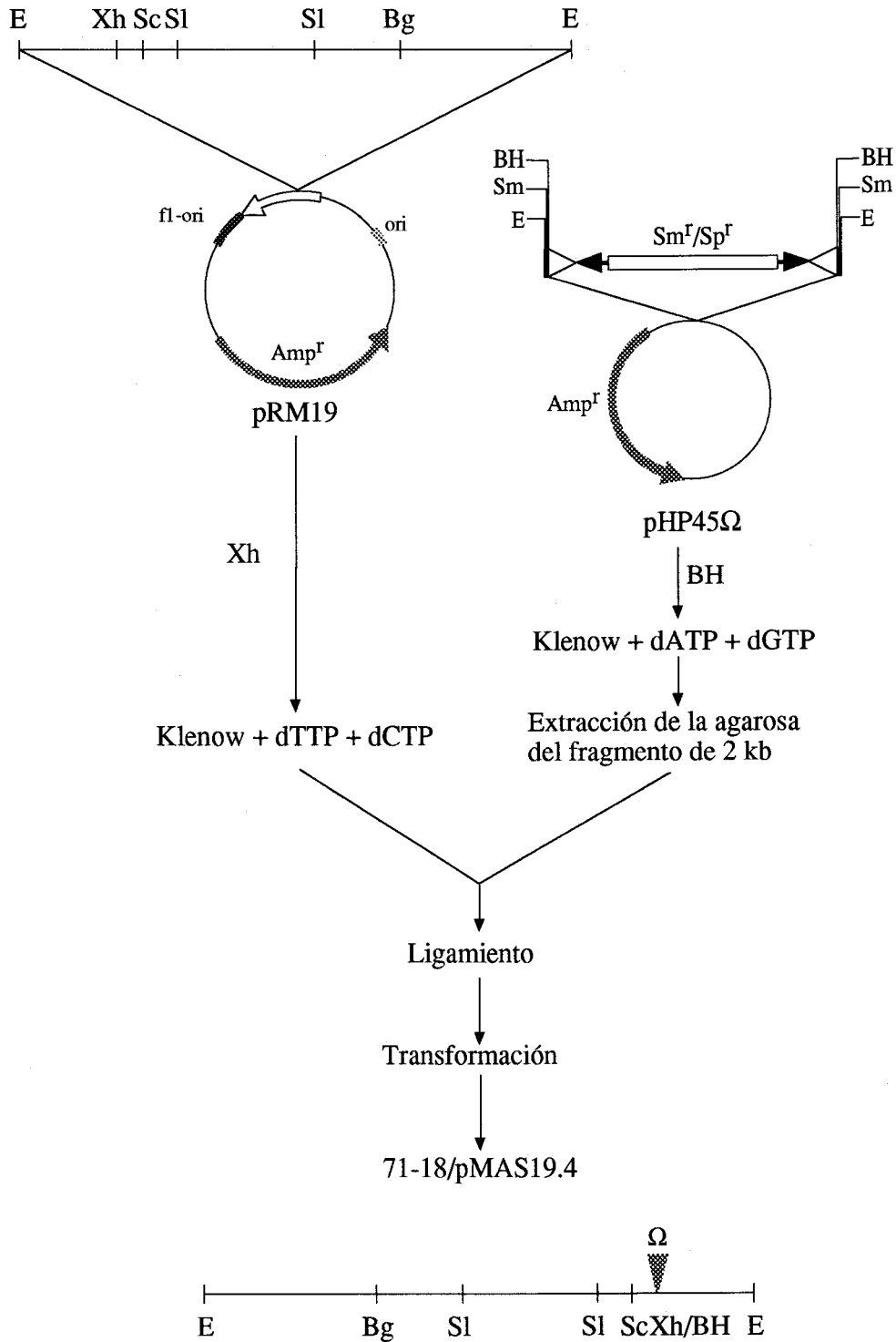


Figura 11. Delimitación de la región *nasR*. Inserción de Ω en la diana de restricción *XhoI* de la región cromosómica *nasR*

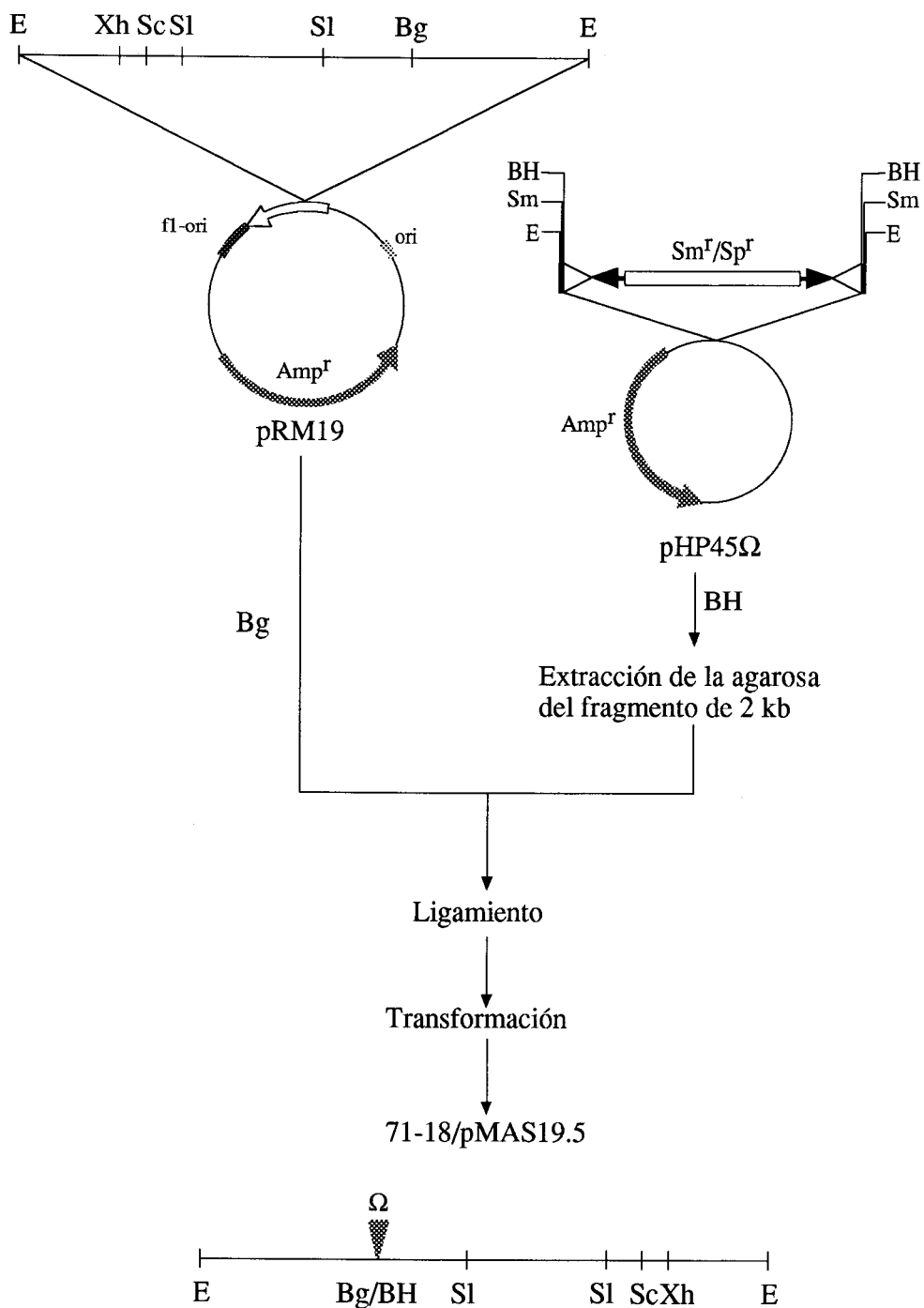


Figura 12. Delimitación de la región *nasR*. Estrategia seguida para obtener una inserción del elemento Ω en el sitio *Bgl*II del fragmento *Eco*RI.

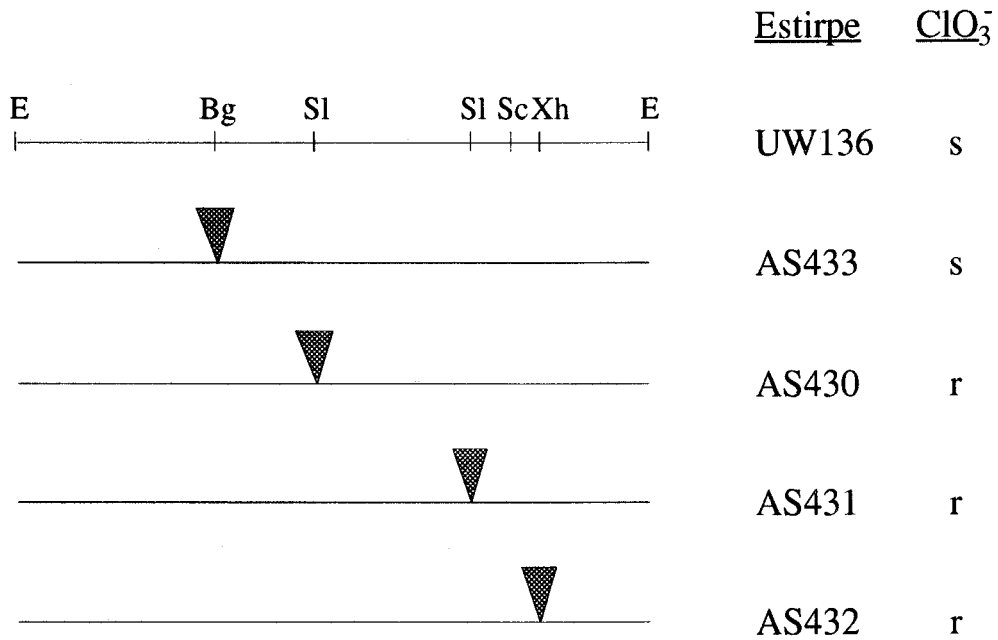


Figura 13. Localización del elemento Ω en el fragmento *EcoRI* de 4 kb y fenotipo de los mutantes correspondientes

Tabla III. Actividad nitrato y nitrito reductasa de distintas estirpes de *A. vinelandii* que presentan insertado el elemento genético Ω en distintos sitios del fragmento *EcoRI* de 4 kb

<u>Estirpes</u>	<u>-N</u>		<u>NO_3^-</u>		<u>NH_4^+</u>	
	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>
UW136	0.5	1.8	15.6	26.4	0.4	2.2
AS430	0.4	2.1	1.5	3.6	0.8	3.8
AS431	0.4	1.6	1.1	3.1	0.4	2.1
AS432	0.7	1.0	0.5	2.1	0.4	1.1
AS433	0.5	3.3	14.8	28.3	0.4	2.0

Las actividades se expresan en miliunidades.
 Los ensayos se realizaron con inóculos que crecieron en presencia de amonio y se pasaron a medios con distintas fuentes de N durante 15 horas

el otro punto *SalI*) y AS432 (en *XhoI*) no presentaban ninguna de las actividades reductasas mientras que el mutante AS433 (inserción en la diana *BglII*) tenía unos niveles de actividad nitrato y nitrito reductasa semejantes a UW136. Por lo que se puede concluir que la región *nasR* está contenida en un fragmento *BglII-EcoRI* de aproximadamente 2.7 kb.

3.1.2. Secuenciación de la región *nasR*

Puesto que la región *nasR* parecía estar localizada en el fragmento cromosómico *BglII-EcoRI* de 2.7 kb, se decidió secuenciar dicho fragmento. Para ello se realizaron subclonaciones, con enzimas de restricción que reconocían dianas internas, en los plásmidos pTZ19R y pTZ18R. También se hicieron delecciones seriadas de algunas de las subclonaciones, siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, página 67. En la figura 14 se muestra un esquema que representa la estrategia seguida para la secuenciación. Utilizando los fragmentos obtenidos se secuenció un fragmento de 2210 nucleótidos, figura 15. Sometiendo la secuencia obtenida a un programa de análisis de secuencias de ADN, "codonpreference" del paquete informático GCG, figura 14, se encontró una primera ORF incompleta de 87 nucleótidos. A 246 nucleótidos del extremo 3' de la anterior aparecen dos ORFs completas. La primera fase de lectura abierta completa, que se ha denominado *nasS*, está constituida por 1179 pb y a 40 pb del extremo 3' de esta última se encuentra la segunda ORF formada por 579 pb, denominada como *nasR*. En la figura 15 se muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente a un fragmento interno *EcoRV-BglII* de la región *EcoRI-BglII* de 2.7 kb, así como las secuencias de aminoácidos de las tres ORFs.

En la figura 15 se señala una posible secuencia de unión a ribosomas (5'GGAA3') localizada a 6 nucleótidos del primer codón (ATG) del gen *nasS*. En el extremo 5' de *nasR*, a 8 nucleótidos del codón de iniciación, aparece la posible secuencia de unión a ribosomas de este gen (5'AGGA3').

Entre *nasS* y *nasR* no aparece ninguna secuencia promotora. Por tanto, estos dos genes estarían formando parte de un operón, siendo el primer gen *nasS* y el segundo *nasR*. A 146 pb del codón de iniciación de

nasS se encontraría la posible secuencia promotora, 3'GTGACG-(17 bases)-TATGTC, del operón, señaladas también en la figura 15. Dicha secuencia es similar a otras secuencias dependientes de sigma 70 como se puede observar en la figura 16.

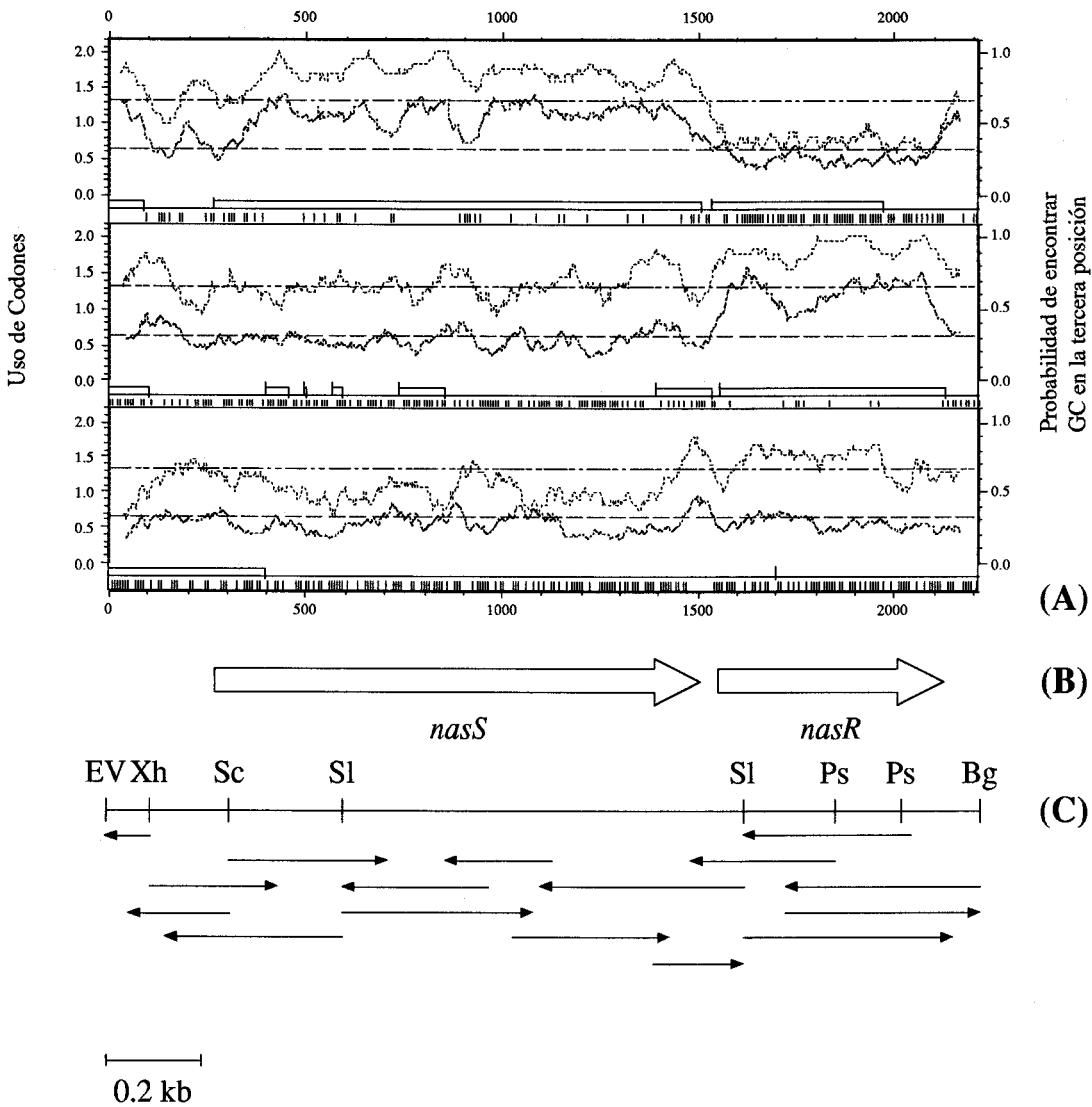


Figura 14. (A) Uso de codones (línea continua) y probabilidad de encontrar regiones codificadoras (línea discontinua) de la secuencia de nucleótidos del fragmento *EcoRV*-*Bg*/III. (B) Localización de las ORFs correspondientes a los genes *nasS* y *nasR*. (C) Estrategia de secuenciación.

Detrás de la ORF incompleta, a 17 nucleótidos del codón de terminación y a 22 pb de la secuencia -35 del promotor de *nasSR*, se encuentra una repetición invertida capaz de formar un lazo en el ARNm, 5'GAAGAAGCCCCGCN₅GCGGGGCTTCTTC3', con una energía de

Capítulo 1

formación de -22.9 kcal/mol. Dicha estructura podría actuar como un terminador de la transcripción independiente de Rho. En el extremo 3' del gen *nasR* existe otra secuencia de nucleótidos capaces de formar una estructura secundaria en el ARNm, con una energía libre de formación de -5.1 kcal/mol, que podría actuar como un terminador de la transcripción independiente de Rho.

Asp Ile Tyr Arg Tyr Leu Ser Phe Asp Gln Ile Ala Glu Tyr Lys Glu	16
<u>GAT ATC</u> TAT CGC TAC CTG TCC TTC GAC CAG ATC GCC GAG TAC AAG GAA	48
<i>EcoRV</i>	
Ala Ala Ala Lys Ala Glu Leu Pro Val Leu Gln Val TER	28
GCG GCC GCC AAG GCC GAA CTC CCG GTC CTC CAG GTC TAAGCGTCTCGCGCTGAACGAAGAA	111
	<-----
	-35
	-10
GCCCCGCCCGTGC GGGGCTTCTTCTTTCTGCGCTCCTGCGCTAGA <u>GTGACG</u> GCAAGCCGAAAGACCGA <u>TATGT</u>	186
-----> <----->	
<u>CCCCGGCTCCTGGCGCTTCGGTTGCC</u> <u>TCGAG</u> TCCAGCAACATCGGGGTCCCAACGCGGGGCCCATTCATCGACA	261
<i>XhoI</i>	
	Met 1
ATGGCGTCGTTTTTCGGCCCTGCCCCAGGCAGTTTGTGCGAGGCGACGCCTTTTCGTCCAGCGCCGGAAACACCATG	336
SD	
Thr Asp His His Ala Thr Phe Gln Ser Gly Cys Pro Gly Leu Gly Arg Gly Ser Asp	20
ACA GAC CAC CAC GCA ACC TTC CAG AGC GGA TGC CCG GGC CTG GGT CGC GGC AGT GAT	393
Ala Pro Glu Lys Ser Ser Ile Asn Leu Gly Phe Met Pro Leu Thr Asp Ser Ala Ser	39
GCC CCC GAG <u>AAG AGC TCG</u> ATC AAC CTG GGC TTC ATG CCG CTC ACC GAC TCC GCC TCG	450
<i>SacI</i>	
Leu Ile Val Ala Ala Thr Gln Gly Phe Ala Glu Pro Tyr Gly Leu Thr Leu Asn Leu	58
CTG ATC GTC GCC GCG ACC CAG GGT TTC GCC GAA CCC TAT GGG CTG ACC CTC AAT CTC	507
Lys Arg Gln Val Ser Trp Ser Gly Leu Arg Asp Lys Leu Leu Ser Gly Glu Leu Asp	77
AAG CGC CAG GTA TCC TGG TCG GGC CTG CGC GAC AAG TTG CTC AGC GGC GAA CTG GAT	564
Ala Ala Gln Gly Leu Tyr Gly Leu Ile Tyr Ser Met Gln Leu Gly Ile Gly Gly Ala	96
GCC GCC CAG GGA CTG TAC GGA CTG ATC TAC AGC ATG CAG CTC GGC ATC GGC GGC GCA	621
Pro Ala Thr Asp Met Ala Val Leu Met Gly Leu Asn Gln Asn Gly Gln Ser Ile Asn	115
CCG GCG ACC GAC ATG GCG GTG CTG ATG GGC CTC AAC CAG AAC GGC CAG AGC ATC AAC	678
Leu Ser Thr Pro Leu Arg Gln Ala Arg Val Cys Ser Gly Glu Thr Leu Val Arg His	134
<u>CTG TCG ACC</u> CCG CTC CGG CAA GCG CGG GTG TGC AGT GGC GAG ACA CTG GTC CGG CAT	735
<i>SaII</i>	
Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Val Thr Leu Ala Gln Thr Phe Pro Thr Gly Thr His	153
GTG CGC CAG AGC AGC GCG AAC GTC ACC CTG GCC CAG ACC TTT CCG ACC GGC ACC CAT	792
Ala Leu Trp Leu Tyr Tyr Trp Leu Ala Ser Leu Gly Ile His Pro Leu Ala Asp Val	172
GCC CTC TGG CTC TAC TAC TGG CTC GCC AGC CTG GGC ATC CAC CCC CTC GCG GAC GTG	849
Asn Thr Leu Val Val Pro Pro Pro Gln Met Val Glu His Leu Arg Ala Gly Arg Ser	191
AAC ACC CTG GTG GTG CCG CCG CCG CAG ATG GTC GAG CAC TTG CGC GCC GGC CGA TCG	906

Figura 15. Secuencia de nucleótidos del fragmento *EcoRV-BglIII* que contiene los genes *nasSR* (parte inferior) y secuencias de aminoácidos de las proteínas que codificarían. En negrilla se señalan las posibles secuencias promotoras -35 y -10. Se muestra subrayada las secuencias de unión al ribosoma (SD), y con líneas discontinuas (<--->), los nucleótidos implicados en la posible estructura terminadora de la transcripción de la primera ORF incompleta y del operón *nasSR*.

Secuencia de nucleótidos de *nasSR*

Thr Val Ser Ala Pro Glu Ser Pro Ala Gly Pro Arg Ile Asp Gln Gly Met Gly Phe	210
ACG GTT TCT GCG CCG GAG AGC CCT GCG GGC CCA CGC ATC GAC CAG GGC ATG GGT TTC	963
Thr Ile Ala Thr Ser Gln Ser Ile Trp Pro Asp His Pro Glu Lys Ser Ser Ala Ala	229
ACC ATC GCT ACC AGC CAG TCG ATC TGG CCG GAC CAC CCG GAG AAG TCC TCG GCT GCA	1020
Pro Cys Phe Ala Glu Gln Tyr Pro Asn Thr Ala Arg Ala Leu Ile Met Ala Val Leu	248
CCG TGC TTC GCC GAG CAG TAC CCC AAT ACC GCC CGC GCC CTG ATC ATG GCC GTG CTG	1077
Asn Glu Pro Leu Ile Asp Ala Ser Glu Glu Asn Lys Ala Gly Thr Ala Gln Leu Ile	267
AAC GAG CCG CTT ATC GAC GCC AGC GAA GAG AAC AAG GCC GGC ACC GCG CAA CTG ATC	1134
Ser Ala Asn Gly Tyr Val Ala Ala Pro Arg Gln Val Ile Glu Pro Arg Phe Leu Gly	286
AGC GCC AAC GGA TAC GTG GCC GCA CCG CGC CAG GTG ATC GAA CCG CGC TTT CTC GGC	1191
Asp Tyr Glu Asp Gly Asn Gly Met Pro Gly Ala Asp Ser Met Pro Cys Ala Phe Met	305
GAC TAC GAG GAC GGC AAC GGC ATG CCT GGC GCG GAC AGC ATG CCC TGC GCT TTC ATG	1248
Gly Asp Gly Glu Val Asn Leu Pro Tyr Leu Ser Asp Gly Leu Trp Phe Met Thr Gln	324
GGC GAC GGC GAG GTC AAC CTG CCC TAT CTC TCC GAC GGT CTC TGG TTC ATG ACC CAG	1305
Phe Arg Arg Trp Gly Leu Leu Arg Glu Asp Pro Asp Tyr Leu Ala Ile Ala Thr Arg	343
TTC CGC CGT TGG GGA CTG CTG CGC GAA GAC CCG GAT TAC CTG GCC ATC GCC ACT CGG	1362
Val Gln Gln Leu Glu Leu Tyr Arg Asp Ala Ala Gly Ala Leu Gly Met Ala His Arg	362
GTG CAG CAG CTC GAA CTG TAT CGC GAT GCC GCC GGC GCT CTC GGC ATG GCG CAC CGC	1419
His Gly His Ala His Ala Thr Leu Leu Asp Gly Arg Arg Trp Asp Gly Ser Asp Pro	381
CAC GGC CAT GCG CAC GCC ACC CTG CTG GAC GGC AGG CGC TGG GAC GGC TCC GAC CCG	1476
Arg Pro Met Pro Ala Ala Ser Thr Ser Thr Pro TER	392
CGG CCT ATG CCC GCA GCT TCG ACC TCC ACG CCC TGAGCGAGCTGCCCTCCTCGGCCGATGACCA	1540
Met Leu Arg Ile Leu Leu Ile Asn Asp Thr Pro Lys Lys Val Gly Arg	16
<u>AGGACCATCCCCATG</u> CTG CGC ATC CTC CTG ATC AAC GAC ACG CCG AAA AAG GTC GGC CGC	1600
SD	
Leu Lys Ser Ala Leu Val Glu Ala Gly Phe Glu Val Val Asp Glu Ser Gly Leu Thr	35
CTG AAA AGC GCC CTG GTC GAG GCC GGC TTC GAA GTC <u>GTC GAC</u> GAG TCC GGC CTG ACC	1657
Sall	
Ile Asp Leu Pro Val Arg Val Glu Ala Val Arg Pro Asp Val Ile Leu Ile Asp Thr	54
ATC GAT CTG CCG GTG CGG GTC GAG GCC GTG CGC CCC GAT GTG ATC CTC ATC GAC ACC	1714
Glu Ser Pro Gly Arg Asp Val Met Glu Gln Val Val Leu Val Ser Arg Asp Arg Pro	73
GAA TCT CCC GGC CGC GAC GTG ATG GAG CAG GTG GTA CTG GTC AGT CGC GAC CGA CCA	1771
Arg Pro Ile Val Met Phe Thr Asp Glu His Asp Pro Gln Val Met Arg Gln Ala Ile	92
CGC CCG ATC GTG ATG TTC ACC GAC GAG CAC GAC CCG CAG GTG ATG CGC CAG GCG ATC	1828
Gln Ala Gly Val Ser Ala Tyr Ile Val Glu Gly Ile Gln Ala Gln Arg Leu Gln Pro	111
CAG GCC GGG GTC AGC GCC TAT ATC GTC GAG GGC ATC CAG GCG CAG CGC <u>CTG CAG</u> CCG	1885
PstI	
Ile Leu Asp Val Ala Met Ala Arg Phe Glu Ser Asp Gln Ala Leu Arg Ala Gln Leu	130
ATC CTC GAC GTG GCC ATG GCC CGC TTC GAG AGC GAC CAG GCC CTG CGC GCC CAG TTG	1942
Gln Ala Arg Glu Ala Gln Leu Ala Glu Arg Lys Arg Val Glu Leu Ala Lys Gly Leu	149
CAG GCC CGC GAG GCG CAG TTG GCC GAG CGT AAG CGC GTC GAA CTG GCC AAG GGC CTG	1999

Figura 15 (cont.). Secuencia de nucleótidos del fragmento *EcoRV-BglII* que contiene los genes *nasSR* (parte inferior) y secuencias de aminoácidos de las proteínas que codificarían.

Capítulo 1

```

Leu Met Lys Met Lys Asn Cys Ser Glu Glu Glu Ala Tyr Thr Leu Met Arg Arg Gln 168
CTG ATG AAA ATG AAG AAC TGC AGC GAG GAG GAG GCC TAT ACC CTG ATG CGC CGC CAG 2056
      PstI
Ala Met Ser Arg Gln Gln Lys Leu Ile Gln Val Ala Glu Gln Val Ile Ala Met His 187
GCC ATG AGC CGC CAG CAG AAG CTG ATC CAG GTC GCC GAG CAG GTC ATC GCC ATG CAC 2113

Asp Met Leu Gly Ser TER 192
GAC ATG TTG GGA AGC TGAAGGAAGGCGGTCAGGGTCGCTCCTGCCGCCGTCGCCCCCTCAAGCCAGGCCGA 2183
                                     <-----> <----->

GGAATTTTCAGCGCCGACCGATAGATCT 2210
      BglIII

```

Figura 15 (cont.). Secuencia de nucleótidos del fragmento *EcoRV-BglIII* que contiene los genes *nasSR* (parte inferior) y secuencias de aminoácidos de las proteínas que codificarían.

		<u>-35</u>		<u>-10</u>	
<i>AvinasSR</i>	GA	GTGACG	GCAAGCCGAAAGACCGA	TATGTC	CCG
<i>EcoM1RNA</i>	GG	GTGACA	AGGGCGCGCAAACCCTC	TATACT	GCG
<i>EcoilvgEDA</i>	TC	TTGTAC	TATTTACAAAACCTATGG	TAACTC	TTT
<i>EcouvrBP2</i>	TG	GTGATG	AACTGTTTTTTTATCCAG	TATAAT	TTG
<i>EcolacP1</i>	CT	TTACAC	TTTATGCTTCCGGCTCG	TATGTT	GTG

Figura 16. Comparación de secuencias promotoras dependientes de σ^{70} de distintos genes. Las regiones -10 y -35 se señalan con trazo continuo.

3.1.3. Expresión de *nasSR* en *E. coli*

Para comprobar si la región *BglIII-EcoRI* contenía realmente la secuencia de ADN codificadora de dos proteínas se expresó este fragmento en *E. coli*. Para ello se utilizó el sistema del promotor dependiente de la ARN polimerasa de T7, ver Materiales y Métodos, página 56. Dicho promotor se encuentra próximo al sitio de múltiples dianas de clonación del vector pTZ19R. Se partió del plásmido pMAS21. El vector, pTZ19R, se empleó como control para observar el marcaje de la β -lactamasa, proteína que debía de aparecer también marcada en pMAS21.

La expresión se realizó en la estirpe NCM631/pIZ227. El plásmido pIZ227 lleva el gen del represor de *Plac*, promotor bajo el que está clonado el gen de la ARN polimerasa de T7 en NCM631. Tras inducir con IPTG la expresión de la ARN polimerasa de T7 se obtuvo el marcaje de dos bandas, una de unos 42 kDa y la otra de 21 kDa, además

de la β -lactamasa, figura 17. Por tanto se puede concluir que en dicho fragmento de ADN existe la información necesaria para codificar dos proteínas.

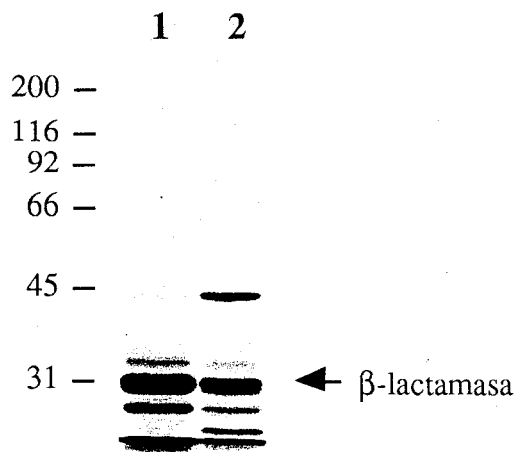


Figura 17. Expresión de *nasSR* por la polimerasa de T7. Cada carril contiene extractos proteicos preparados, marcados, sometidos a electroforesis y autorradiografiados según se indica en Ramos (1992). Los extractos procedían de las siguientes estirpes de *E. coli*: carril 1, NCM631/pIZ227; carril 2, NCM631/pIZ227/pMAS21.

3.1.4. Análisis de la proteína NASS

La proteína resultante de traducir la ORF correspondiente al gen *nasS* está compuesta por 392 aminoácidos, su peso molecular es semejante a una de las proteínas obtenidas por expresión del fragmento *EcoRI*-*BglIII*, 42079 Da, y un pI de 5.77. Para identificar dicha proteína se comparó con las secuencias de aminoácidos encontradas en los bancos de datos disponibles, utilizándose el programa TFASTA (Pearson y Lipman, 1988). Se ha obtenido una gran similitud con las proteínas NASF de *K. pneumoniae*, cuya secuencia, hasta la fecha, está incompleta (Lin *et al.*, 1994), NRTA (Omata, 1991), NRTC (Omata *et al.*, 1993) y CMPA (Omata *et al.*, 1990) de *Synechococcus* sp. PCC 7942. En la tabla IV se recogen los porcentajes de similitud e identidad obtenidos mediante el programa BESTFIT de alineamiento de secuencias (Smith y Waterman, 1981).

En la figura 18 se muestra el alineamiento de la proteína NASS de *A. vinelandii* con CMPA, NRTC, NRTA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 y NASF de *K. pneumoniae*, aplicando el programa PILEUP de alineamiento de secuencias (Feng y Doolittle, 1987).

Capítulo 1

Se ha propuesto que la proteína NASF, junto a NASE y NASD, interviene en el transporte de nitrato en *K. pneumoniae*. Forman parte de un operón, en el que están incluidos los genes estructurales de la nitrato y la nitrito reductasa y NASC (Lin *et al.*, 1994).

Tabla IV. Proteínas de mayor semejanza a NASS de *A. vinelandii* según el programa TFASTA. Se indica el porcentaje de similitud, de identidad y el solapamiento con tres proteínas de *Synechococcus* sp. PCC 7942, según el programa BESTFIT de alineamiento de secuencias (Smith y Waterman, 1981).

PROTEINA	PROCEDENCIA	% SIMILITUD	% IDENTIDAD	HUECOS	SOLAPAMIENTO
NASF	<i>K. pneumoniae</i>	65.67	46.76	4	209 aa
NRTA	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	51.40	30.69	7	408 aa
NRTC	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	50.13	26.35	6	394 aa
CMPA	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	50.90	26.99	11	433 aa

Las proteínas NRTA y NRTC intervienen en el transporte de nitrato, formando parte de un operón junto a otros genes del complejo multienzimático de transporte y los genes estructurales de las reductasas de nitrito y nitrato (Omata *et al.*, 1993). El producto del gen *nrtA* tiene 443 aminoácidos, presenta dos dominios hidrofóbicos de anclaje a la membrana. Omata *et al.* (1993) proponen que podría ser la proteína de unión a sustrato del sistema multienzimático de transporte de nitrato en *Synechococcus* sp. PCC 7942. Además presenta una alta homología, 46.5 % de identidad, con CMPA. La proteína NRTC presenta 659 aminoácidos y tiene dos dominios. El extremo N-terminal (1-254 aa) representa el sitio de unión a ATP característico de los sistemas transportadores dependientes de éste. El extremo C-terminal (279-659 aa) tiene homología con NRTA, 30% de identidad, y con CMPA, 27% de identidad (Omata *et al.*, 1993).

El producto del gen *cmpA* tiene 450 aminoácidos, es una proteína de membrana sintetizada bajo condiciones de déficit de carbono, aunque

su función es desconocida (Omata y Ogawa, 1986; Omata *et al.*, 1987; Omata *et al.*, 1990).

En la figura 19 , se muestra el patrón de hifrofobicidad de NASS, NRTA, NRTC y CMPA.

Syocmpa<28>GCG	NPPSSSGGGT	SSTTQPT...	ASDLEVKTIK
SyonrtcQRRAKR	RAKAAAPAPA	VAASQQKTVR
Syonrta<33>	TDTTGST	STPAPSGTSG	GDAPEVKGVT
Kpnnasf	<1>MGDKFSI	STGDVYYRRG	RRWAARCCSP	AIMQAAWAAG	SDKPEQTTVR
Avinass<1>MTD	HHATFQSGCP	GL.....GRG	SDAPEKSSIN
Syocmpa	LG YIPIFEAA	PL IIGREKGF	FA KYGL.DVE	VSKQASWAAA	RDNVILGSAG
Syonrtc	LG FLPGNDCA	PL AIAQELGL	FQ DLGL.SVE	LQSFLTWEAL	EDSIRL....
Syonrta	LG FIALTDAA	PV IIALEKGL	FA KYGLPDTK	VVKQTSWAVT	RDNLELGS DR
Kpnnasf	VG FIPLTDCA	PL AIASLKGF	DK KYGI.TLV	PSKEASWAAV	RDKLV....A
Avinass	LG FMPLTDSA	SL IVAATQGF	AE PYGL.TLN	LKRQVSWSGL	RDKLL....S
	*	*	*	*	*
Syocmpa	GG IDGGQWQM	PMP ALLTEGA	ISNGQK.VPM	YVLACLSTQG	NGIAVSNQLK
Syonrtc	GQ LEGALMMA	AQ PLAMTMGL	GG..HRPFAI	ATPLTVSRNG	GAIALSRRYL
Syonrta	GG IDGAHILS	PMP YLLTAGT	ITKSQKPLPM	YILARLNTQG	QGISLSNEFL
Kpnnasf	GEL DAAHILY	GML YGLELGI	ASKPQA.MA.	.NLMTLNRNG	QAITLSSELQ
Avinass	GEL DAAQGLY	GLI YSMQLGI	GGAPATDMA.	.VLMGLNQNG	QSINLSTPLR
	*	*		*	* * *
Syocmpa	AQNLGLKLAP	NRDFILNYPQ	TSGRKFKASY	T.FP NANQDF	WIRY WFAAGG
Syonrtc	NAGV....R	SLEDLCQFLA	ATPQRLRLAI	PD. PI AMPAL	LLRY WLASAG
Syonrta	AEKVQIK.DP	KLKAIADQKK	ASG KLKAAV	T.FP GGTHDL	WMRY WLAANG
Kpnnasf	EQGV....TD	LSGLEKTDRS	ARAGQLHLRP	TF PTGTHAM	WLYY WLASGG
Avinass	QARV....CS	GETLVRHVRQ	SSA.NVTLAQ	T.FP PTGTHAL	WLYY WLASLG
				*	* * * *
Syocmpa	ID PKDIELL	TV PSAETLQN	MR NGTIDCFs	TGDPWPSRIA	KDDIGYQAAL
Syonrtc	LN PEQDVELV	GM SPYEMVEA	LKAGDIDGFA	AG EMRIALAV	QAGAAAYLAT
Syonrta	ID PNDADLV	VI PPPQMVAN	MQ TGMDTFC	VGEPWNARLV	NKKLGYTAAV
Kpnnasf	IN PFADIRTV	VV PPPQMVVN	MR IGNM.TAF	ASASRGTRGA	I<225>....
Avinass	IH PLADVNTL	VV PPPQMVVEH	LRAGRS.TVS	AP ESPAGPRI	DQGMGFTIAT
	*	*	*		*
Syocmpa	TG QMWPYHPE	EF LALRADWV	DK HPKATLAL	LMGLMEAQQW	CDQKANRAEM
Syonrtc	DL DIWAGHPE	KV LGLPEAWL	QV NPETAIAL	CSALLKAGEL	CDDPRQRDRI
Syonrta	TG ELWKFHPE	KAL TIRADWA	DK NPKATMAL	LKAVQEAQIW	CEDPANLDEL
Avinass	SQ SIWPDHPE	KSS AAPC.FA	EQ YNTARAL	IMAVLNEPLI	DASEENKAGT
	*	***	*	**	

Figura 18. Comparación de la proteína NASS de *A. vinelandii* con las proteínas más parecidas según el programa TFASTA, aplicando el programa de alineamiento de secuencias PILEUP (Feng y Doolittle, 1987). Con un asterisco (*) se señalan los residuos conservados en todas las proteínas y en negrilla los presentes en, por lo menos, tres de las proteínas.

Capítulo 1

Syocmpa	AKILSGRNFF	NVPVSILQPI	LEGQIKVGAD	GKDLNFDAG	PLFWKSPRGS
Syonrtc	VEVLQQPQYL	GSAAGTVLQR	YF.DFGLGDE	PTQI.....	LRFNQFHVDQ
Syonrta	CQITAQDKYF	KTSVEDIKPR	LQGDIDYG.D	GRSVKNSDLR	MRFWS...EN
Avinass	AQLISANGYV	AAPRQVIEPR	FLGDYEDGNG	MPGADSMPCA	FM....GDGE
			*		
Syocmpa	VSYPYKGLTL	WFLVESIRWG	FNKQVLPDIA	AAQKLNDRVT	REDLWQEAAK
Syonrtc	ANYPNLEGT	WLLTQLCRWG	LT....PLPK	NRQELLDREVY	RRDIYEAAIA
Syonrta	ASFPYKSHDL	WFLTEDIRWG	Y....LPAST	DTKALIEKVN	RSDLWREAAK
Avinass	VNLPYLSDGL	WFMTQFRRWG	L....LREDP	DYLAIATRVO	QLELYRDAAG
	*	*	***	*	*
Syocmpa	KLGVPAADIP	TGSTRGTETF	FDGITYNPDS	PQAYLQSLKI	KR<449>...
Syonrtc	AVGFP...LI	TPSQRGFE.L	FDAVPFDPDS	PLRYLEQFEI	KA<440>...
Syonrta	AIG.REQDIP	ASDSRGVETF	FDGVTFDPEN	PQAYLDGLKF	KA<546>...
Avinass	ALG.....MA	HRHGHAAHATL	LDGRRWDGSD	PRPMPAASTS	TP<392>...
	*		*	*	

Figura 18 (cont.). Comparación de la proteína NASS de *A. vinelandii* con las proteínas más parecidas según el programa TFASTA, aplicando el programa de alineamiento de secuencias PILEUP (Feng y Doolittle, 1987). Con un asterisco (*) se señalan los residuos conservados en todas las proteínas y en negrilla los presentes en, por lo menos, tres de las proteínas.

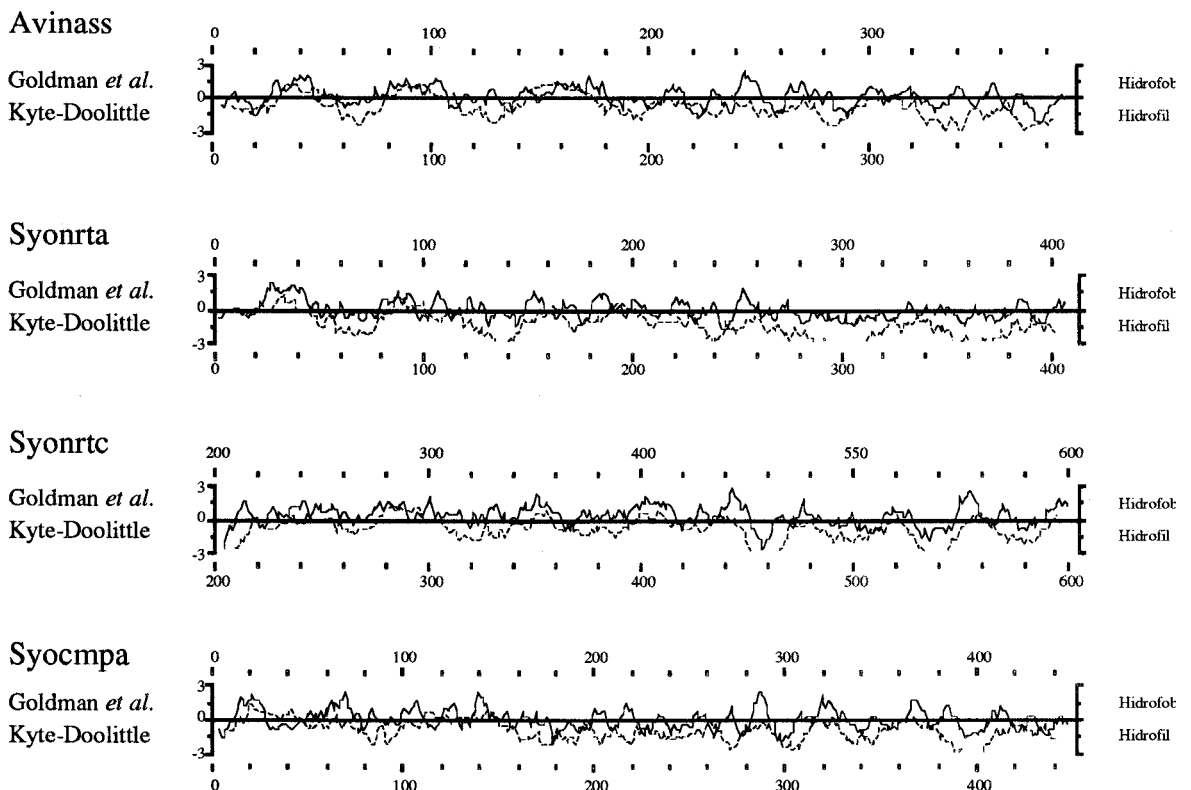


Figura 19. Curvas de hidrofobicidad (línea continua) de las proteínas NASS, NRTA, NRTC y CMPA, basadas en el método de Kyte y Doolittle (1982). La línea discontinua representa la curva para identificar las hélices transmembrana no polares (Goldman *et al.*, 1986)

3.1.5. Análisis de la proteína NASR

La proteína resultante de traducir la segunda ORF completa presente en el fragmento secuenciado está compuesta por 192 aminoácidos, con un peso molecular de 21645.07 Da, que se corresponde con el de una de las proteínas obtenidas al expresar el fragmento *EcoRI-BglII* de *A. vinelandii* en *E. coli*, ver apartado 3.1.3, y un pI de 5.94. Para identificar dicha proteína se comparó con las secuencias de aminoácidos encontradas en los bancos de datos disponibles, utilizándose el programa TFASTA (Pearson y Lipman, 1988). Se ha obtenido una gran similitud con las proteínas CHEB de *Bacillus subtilis* (Bischoff y Ordal, 1991), BAER de *E. coli* (Nagasawa, no publicado) y ORFX17 de *Bacillus subtilis* (Sorokin *et al.*, 1993). En la tabla V se recogen 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 NASR 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
CHEB	<i>B. subtilis</i>	50.00	26.72	1	117 aa
BAER	<i>E. coli</i>	42.32	23.81	4	204 aa
ORFX17	<i>B. subtilis</i>	45.50	20.10	4	210 aa

Las proteínas CHEB, BAER y ORFX17 forman parte de una familia de proteínas denominadas sistema de dos componentes. Dicho sistema interviene en respuestas adaptativas rápidas a cambios ambientales. Está formado por dos proteínas. El transmisor, que sensa los cambios producidos en el medio, enviando la información, mediante una fosforilación, al receptor, que pone en marcha toda la maquinaria de respuesta a dicho cambio (Stock *et al.*, 1989; Parkinson y Kofoid, 1992; Parkinson, 1993). Estas tres proteínas, CHEB, BAER y ORFX17, son los receptores en cada uno de los sistemas en los que intervienen.

Capítulo 1

Los receptores presentan tres aminoácidos conservados, que se corresponden con el aspártico-13, el aspártico-57 y la lisina-109 de la proteína CHEY de *E. coli*. Sin embargo, existen proteínas que no tienen conservados algunos de estos aminoácidos. Así, en la proteína PATA de *Anabaena* sp., el aspártico-57 se encuentra en la posición 313 (Liang *et al.*, 1992) y el producto del gen *flbD* de *Caulobacter crescentus* no conserva el aspártico-13 ni la lisina-109, sino que están sustituidos por lisina y leucina, respectivamente (Ramakrishnan y Newton, 1990).

En la figura 20 se muestra el alineamiento de la proteína NASR de *A. vinelandii* con las proteínas que aparecen en la tabla V.

Bcsorfx17	<1>...MDQTNE	TKILVVDEEA	RIRLLRMYL	ERENYA.IDE	AENGDEAIAK
Ecobaer	<1>MTELPIDENT	PRILIVEDEP	KLQQLLIDYL	RAASYA.PTL	ISHGDQVLPY
Bcscheb	<1>.....MA	HRILIVDDAA	FMRMMIKDIL	VKNGFEVVAE	AENGAQAVEK
Avinasr	<1>.....M	LRILLINDTP	KKVGRLKSAL	VEAGFEVVDE	SGLTIDL PVR
		** #			
Bcsorfx17	<46>GLEANYDLIL	LDLMPGTDG	IEVCRQIREK	KA.TPIIMLT	AKGEEANRVQ
Ecobaer	<50>VRQTPDDLIL	LDLMLPGTDG	LTLCREIRRF	SD.IPIVMVT	AKIEEIDRLL
Bcscheb	<43>YKEHSPDLVT	MDITMPEMDG	ITALKEIKQI	DAQARIIMCS	AMGQQSMVID
Avinasr	<42>VEAVRPDVIL	IDTESPGRDV	MEQVVLVSRD	RPR. PIVMFT	DEHDPQVMRQ
	*	# * *		* *	
Bcsorfx17	<95>GFEAGTDDYI	VKPFSPREVV	LRVKALLRRA	SQTSYFNANT	PTKNVLVFSH
Ecobaer	<99>GLEIGADDYI	CKPYSPREVV	ARVKTILRRC	KPQRELQQOD	AE.....SP
Bcscheb	<93>AIQAGAKDFI	VKPFQADRVL	EAINKTLN<120>.....
Avinasr	<91>AIQAGVSAYI	VEGIQAQRLQ	PILDVAMARF	ESDQALRAQL	QAREAQL...
	*	•		*	
Bcsorfx17<145>	LSIDHDAHRV	TADGTEVSLT	PKVYELLYFL	AKTPDKVYDR	EKLLKEVWQY
Ecobaer<143>	LIIDEGRFQA	SWRGKMLDLT	PAEFRLLKTL	SHEPGKVFSR	EQLLNHLYDD
Bcscheb
Avinasr<138>AERKRVELA	KGLLMKMKNC	SEEEAYTLMR	RQAMSRQ...
		*		*	
Bcsorfx17<195>	EFFGDLRTVD	THVKRLREKL	NK<217>		
Ecobaer<193>	YRVVTDRTID	SHIKNLRRKL	ES<215>		
Bcscheb		
Avinasr<174>	...QKLIQVA	EQVIAMHDML	GS<192>		
		*			

Figura 20. Comparación de la proteína NASR de *A. vinelandii* con las proteínas más parecidas según el programa TFASTA, aplicando el programa de alineamiento de secuencias PILEUP (Feng y Doolittle, 1987). Con un asterisco (*) se señalan los residuos conservados en todas las proteínas y en negrilla los presentes en, por lo menos, dos de las proteínas. Con el símbolo (#) aparecen los aspárticos conservados en todos los receptores del sistema de dos componentes, y con (•), la lisina.

La proteína NASR conserva el aspártico-13 y el que se encuentra en la posición 57 de CHEY de *E. coli*. No obstante, no presenta la lisina-109, en esta posición el residuo que aparece es un glutámico. Tampoco tiene ningún dominio de unión a ADN, como suele ser típico en algunos reguladores pertenecientes a esta familia.

3.1.6. Discusión

Se ha descrito que la asimilación del nitrato en *A. vinelandii* se encuentra bajo el control *ntr* (Santero *et al.*, 1986; Toukdarian y Kennedy, 1986). La estirpe AS61 carece de las dos actividades reductasas, aunque no está afectada en el sistema *ntr* (Luque, 1987). La mutación se encuentra a 10 kb del operón *nasAB*, en un fragmento *EcoRI* de 4 kb (Ramos, 1992). Por lo que se pensó que podía tratarse de un gen regulador de la expresión del operón *nasAB*, al que se denominó *nasR* (Ramos, 1992).

Con objeto de acotar la región *nasR* se construyeron mutantes que tenían insertado el cassette Ω a lo largo del fragmento *EcoRI*, figura 13. Las estirpes con inserciones en los puntos de restricción *SalI* y *XhoI* no presentaban actividad nitrato y nitrito reductasa, tabla III, mientras que la cepa con la inserción en el punto *BglII* tenía niveles de actividad semejantes a los de la estirpe silvestre, tabla III. Por tanto, la región *nasR* está contenida en un fragmento *BglII-EcoRI* de 2.7 kb.

Se secuenciaron 2210 nucleótidos correspondiente a un fragmento *BglII-EcoRV* interno de la región *BglII-EcoRI* de 2.7 kb, figura 15. Del análisis de la secuencia de nucleótidos se deduce que esta región contiene tres fases de lectura abierta: la primera, incompleta, codificaría para 28 aminoácidos del extremo carboxilo-terminal; la segunda, tiene una longitud de 1179 pb y codificaría para una proteína de 392 aminoácidos, a la que se ha denominado *nasS*; y la tercera, *nasR*, de 579 pb, codificaría para una proteína de 192 aminoácidos, figuras 14 y 15.

Mediante el sistema del promotor dependiente de la ARN polimerasa de T7 se ha expresado el fragmento secuenciado *BglII-EcoRV*. Se han obtenido tres bandas, una de 42 kDa, otra de 21 kDa y la correspondiente a la β -lactamasa, figura 17. Dichos tamaños coinciden

Capítulo 1

con los predichos del análisis de la secuencia. Por tanto, en dicho fragmento existe la información necesaria para codificar dos proteínas.

Delante de *nasS* se encuentra una posible secuencia promotora, 3'GTGACG-(17 bases)-TATGTC, similar a otras secuencias dependiente de sigma 70, figuras 15 y 16. Entre *nasS* y *nasR* no aparece ninguna secuencia promotora. Por lo que, probablemente ambos genes estén formando parte de un operón. El primer gen de este operón es *nasS* y el segundo *nasR*, figuras 14 y 15.

La proteína que se deduce a partir del gen *nasS*, NASS, comprende 392 aminoácidos y presenta un peso molecular de 42079 Da. Al comparar la secuencia de aminoácidos de NASS con otras secuencias proteicas presentes en los bancos de datos, se comprobó que las proteínas que presentaban mayor grado de identidad eran NASF de *K. pneumoniae* (Lin *et al.*, 1994), NRTA (Omata, 1991), NRTC (Omata *et al.*, 1993) y CMPA (Omata *et al.*, 1990) de *Synechococcus* sp. PCC 7942, tabla IV y figura 18. Las cuatro presentan dominios hidrofóbicos capaces de atravesar la membrana, por lo que podrían estar ancladas a ésta, figura 19.

El sistema de transporte en *Synechococcus* sp. PCC 7942 está constituido por las proteínas NRTA, NRTB, NRTC y NRTD. La proteína NRTB es hidrofóbica y presenta una estructura similar a los componentes integrales de membrana de los sistemas de transporte bacterianos dependientes de proteínas periplásmicas que unen sustrato. En el caso de *Synechococcus* sp. PCC 7942, dicha proteína periplásmica, hasta el momento, no ha sido identificada. El extremo amino-terminal de la proteínas NRTC y la proteína NRTD tienen alta homología a las ATPasas de otros sistemas de transportes. El extremo carboxilo-terminal de la proteína NRTC presenta una alta homología con NRTA. Esta proteína presenta dos dominios de anclaje a la membrana y se discute que podría ser la proteína de unión a sustrato del sistema (Omata *et al.*, 1993). En *K. pneumoniae*, se han descrito una serie de genes, *nasF*, *nasE* y *nasD*, cuyos productos son homólogos a las proteínas NRTA, NRTB y NRTC de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Lin *et al.*, 1994), respectivamente. Por extrapolación de lo descrito en cianobacterias, se supone que intervienen en el transporte de nitrato. Estos genes, al igual que en *Synechococcus* sp. PCC 7942, forman parte de un operón junto a los genes estructurales de

la nitrato, *nasA*, y la nitrito reductasa, *nasB*, y el gen *nasC* que codificaría para una oxidoreductasa (Lin *et al.*, 1994).

Los datos aquí presentados de homología de NASS con otras proteínas que intervienen en la asimilación de nitrato en *K. pneumoniae* y en *Synechococcus* sp. PCC 7942, sugieren que el producto del gen *nasS* podría ser una proteína unida a membrana que o bien formaría parte del transporte de nitrato o bien actuaría como sensor del nitrato y directa o indirectamente dispararía todo la maquinaria de asimilación de esta fuente de nitrógeno.

Es prematuro asignar una función a NASS, pero en cualquier caso, si se trata de uno de los componentes de un sistema multienzimático de transporte faltan por localizar los otros componentes. En *A. vinelandii* no formarían parte del mismo operón. La diferencia con los sistemas anteriormente citados no sólo sería de organización de los genes que intervienen en el transporte sino en la presencia de otro gen, hasta ahora no identificado ni en *Klebsiella* ni en *Synechococcus* sp. PCC 7942 cuya función no parece estar relacionada con el transporte propiamente dicho, el gen *nasR*.

La proteína resultante de traducir el gen *nasR* está compuesta por 192 aminoácidos y con un peso molecular de 21645.07 Da. Presenta una alta homología con las proteínas CHEB de *B. subtilis* (Bischoff y Ordal, 1991), BAER de *E. coli* (Nagasawa *et al.*, no publicado) y ORFX17 de *B. subtilis* (Sorokin *et al.*, 1993), que son las proteínas receptoras de los sistemas de dos componentes, tabla V y figura 20. Este tipo de proteínas presentan tres residuos muy conservados, que coinciden con el aspártico-13, aspártico-57 y la lisina-109 de la proteína CHEY de *E. coli*, junto al aspártico-13 siempre aparece un aminoácido ácido, aspártico o glutámico. El aminoácido que es fosforilado por el transmisor, la otra proteína que forma parte del sistema de dos componentes, en respuesta de un cambio ambiental, es el aspártico-57. Este fosfato se encuentra englobado en un "bolsillo" ácido, y es la lisina-109 la que acelera la hidrólisis del fosfato. En algunos casos ésta desfosforilación es producida por la acción de una fosfatasa. Esta estrategia favorece que la respuesta sólo se dé mientras que la célula se encuentre en la situación de cambio ambiental.

En el caso de NASR, los aspárticos se conservan, aunque la lisina está sustituida por un glutámico, y el aminoácido que se encuentra junto al

Capítulo 1

aspártico-13 es un aminoácido neutro, la asparagina. Entonces, ¿cómo funcionaría esta proteína si algunos de los residuos conservados no aparecen? Podría ocurrir que:

1. El mecanismo de acción de NASR sea diferente al de los receptores del sistema de dos componentes.

2. Un aminoácido básico del entorno del glutámico haga el papel de la lisina-109. Existe una arginina próximo al glutámico.

3. La función de la lisina-109 la haga la asparagina que se encuentra al lado del aspártico-13. Dicho aminoácido, en condiciones ácidas, se encuentra cargado.

Capítulo 2

3.2. REGULACION DE LOS OPERONES *nasAB* y *nasSR*

La nitrato reductasa de *A. vinelandii* es una enzima inducible por nitrato y reprimible por amonio, y su expresión es dependiente del sistema *ntr* (Santero *et al.*, 1986; Toukdarian *et al.*, 1986) y de los productos del operón *nasSR* como se ha descrito en el capítulo anterior. Mutantes en el gen *ntrA* carecen de actividad nitrogenasa, nitrato reductasa y nitrito reductasa, mientras que los mutantes en *ntrC* sólo en las reductasas del nitrato y del nitrito, pero no en nitrogenasa. Ambos genes se cotranscriben formando parte de un operón, *nasAB*, el primer gen de este operón codifica para la apoenzima de la nitrito reductasa y el segundo para la nitrato reductasa (Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993). La expresión de *nasAB* está, además, regulada por la propia nitrato reductasa. Mutantes en esta enzima o en la biosíntesis de su cofactor tienen actividad nitrito reductasa en ausencia de inductor (Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993), es decir, se requiere de una nitrato reductasa activa o al menos unida a su cofactor para que el circuito de inducción por nitrato sea operativo. No obstante, en estos mutantes el amonio sigue reprimiendo.

En este capítulo se intentará integrar todos estos elementos reguladores en un modelo.

3.2.1. Construcción de estirpes con una inserción no polar en el gen *nasS*

En nuestro laboratorio se disponía de una colección de mutantes de *A. vinelandii* que no eran capaces de asimilar nitrato y que se encontraban afectados en los genes *ntrA*, MV724, *ntrC*, AS435, *nasSR*, AS431, *nasR*, AS430, en la biosíntesis del cofactor de molibdeno, AS249, AS252 y AS253, y en *nasB*, AS251. Sin embargo, no disponíamos de estirpes que tuviesen mutado el gen *nasS* y transcribiesen *nasR*. Dichas estirpes nos darían información sobre la función de NASS. Para la obtención de dichos mutantes se construyó una delección *in vitro* y una inserción del cassette KIXX en *nasS*. El gen *nasR* se transcribiría a partir del promotor del gen de la kanamicina que no presenta terminadores de la transcripción en la región distal del cassette. La estrategia seguida para la construcción de la mutación en *nasS* se presenta en la figura 21. El

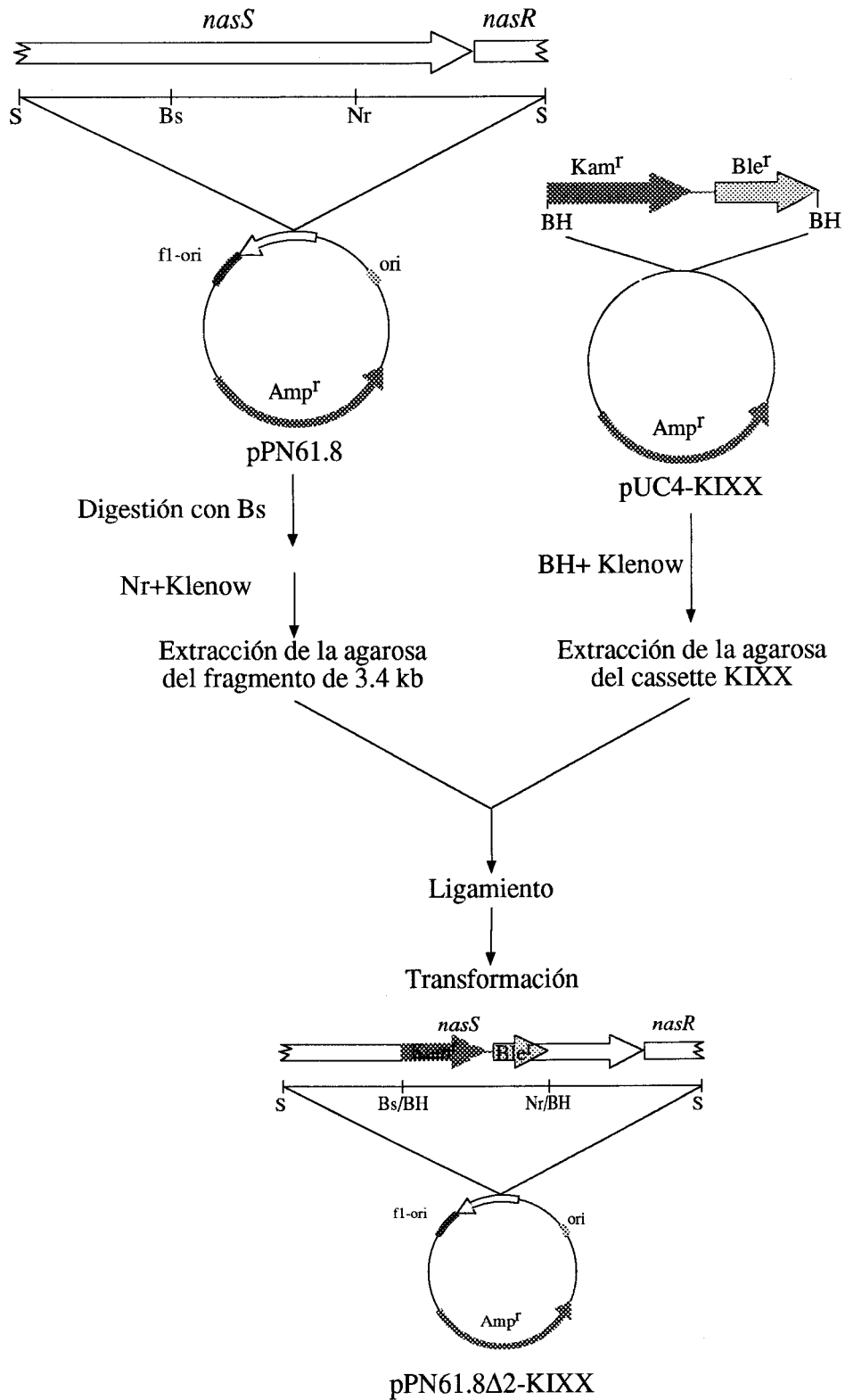


Figura 21. Esquema de la construcción del plásmido pPN61.8 Δ 2-KIXX

plásmido pPN61.8 Δ 2-KIXX se introdujo por transformación en los fondos genéticos silvestre y *nasB*. Para poder introducir este plásmido en AS251, *nasB*::Tn5, se tuvo que sustituir previamente la resistencia a kanamicina de Tn5 por tetraciclina. Para realizar este intercambio de resistencias se empleó el Tn5-tet que se encuentra en pIZ11. Este plásmido se transfirió a la estirpe AS251 seleccionando colonias resistentes a tetraciclina, que al no replicarse en *A. vinelandii* la única forma de obtener resistentes a este antibiótico era tras 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. A la estirpe *nasB*::Tn5-tet se denominó AS438.

Se transformaron las cepas UW136 y AS438 con el plásmido pPN61.8 Δ 2-KIXX. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo suplementado con kanamicina. A continuación, sólo nos quedamos con aquellos transformantes que eran sensibles a ampicilina, marcador del plásmido. Las estirpes que se utilizaron posteriormente se denominaron AS434 y AS439, respectivamente.

3.2.2. Clonación del promotor del operón *nasAB*

Para facilitar el estudio de la regulación de la asimilación de nitrato se utilizó el plásmido pCB267, derivado de pBR322, ampicilina resistente, es de alto número de copias y contiene los indicadores *phoA* y *lacZ*, situados en orientación divergente desde una región de múltiples dianas para la clonación, donde se puede insertar un fragmento de ADN que tenga actividad promotora, figura 22.

Por experimentos indirectos se conocía la localización y la orientación del promotor del operón *nasAB*. Este se encontraba en el fragmento *SalI* de 1.5 kb del plásmido pRM12 (Ramos, 1992), y se clonó en la diana *SalI* del vector pCB267, poniendo el indicador *lacZ* bajo el control de esta región promotora. A esta construcción se le denominó pPN12.

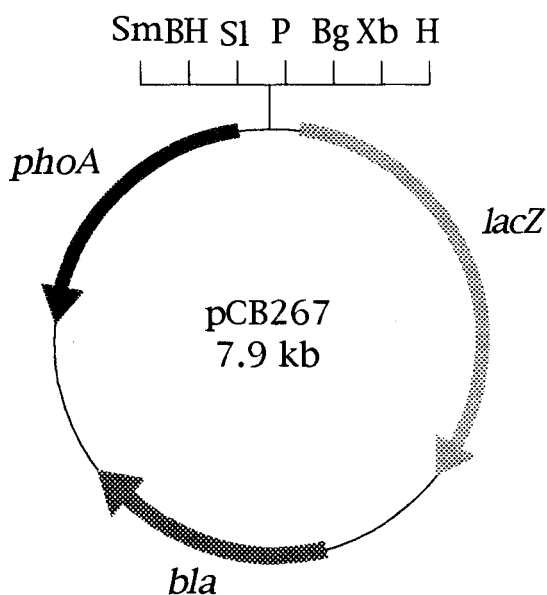


Figura 22. Mapa de restricción del plásmido pCB267 y orientación de los indicadores *lacZ* y *phoA*

3.2.3. Clonación del promotor del operón *nasSR*

Para la clonación del promotor del operón *nasSR* también se utilizó el plásmido pCB267. Como se conocía por secuenciación en qué región del plásmido pRM19 se encontraba el promotor de este operón, se clonó el fragmento *SalI-EcoRI* de 1.2 kb entre las dianas de restricción *SalI* y *SmaI* de pCB267 como se puede ver en el esquema de la figura 23. Al plásmido obtenido se le denominó pPN61.2.

3.2.3. Introducción de los plásmidos pPN12 y pPN61.2 en distintos fondos genéticos

Las fusiones del operón *nasAB* y de *nasSR* con el gen de la β -galactosidasa descritas antes permitían realizar experimentos encaminados a obtener datos sobre el modelo de regulación de la asimilación de nitrato. Para ello estos plásmidos se introdujeron por transformación en distintas estirpes de *A. vinelandii*, ver tabla VI, seleccionando la resistencia a ampicilina del plásmido. 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 los fragmentos que tienen clonados pPN12 y

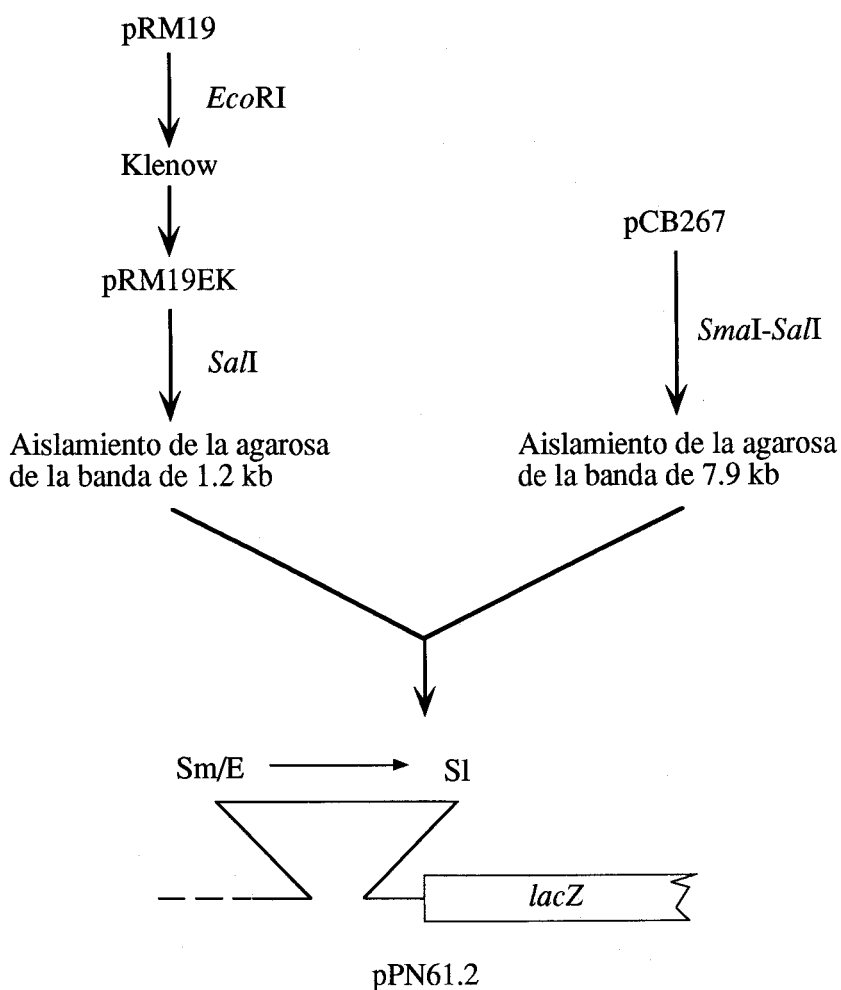


Figura 23. Estrategia seguida para la clonación de la región promotora del operón *nasSR* en el vector pCB267

pPN61.2 y los fragmentos cromosómicos homólogos, dando lugar a una duplicación de estas regiones.

3.2.5. Expresión de las fusiones en distintos fondos genéticos

Para medir los niveles de expresión de los promotores se crecían las distintas estirpes en medio mínimo hasta que alcanzaban una densidad óptica de 0.5, en ese momento se les añadía la fuente de nitrógeno y se incubaban en agitación durante 6 horas. En las tablas VII, VIII y IX aparecen las medidas de actividad β -galactosidasa de los promotores

Capítulo 2

Tabla VI. Genotipo de las estirpes de *A. vinelandii* que tienen integrado el plásmido pPN12 o pPN61.2 en su cromosoma

ESTIRPE	GENOTIPO	INTEGRACION EN EL CROMOSOMA DE pPN12	INTEGRACION EN EL CROMOSOMA DE pPN61.2
UW136	Silv	AS440	AS452
MV724	<i>ntrA::Tn5</i>	AS441	AS453
AS435	<i>ntrC::Tn5</i>	AS442	AS454
AS431	<i>nasS::Ω</i>	AS443	AS455
AS430	<i>nasR::Ω</i>	AS444	AS456
AS434	<i>nasS::KIXX</i>	AS445	-
AS251	<i>nasB::Tn5</i>	AS446	AS457
AS436	<i>nasB::Tn5</i> , <i>nasR::Ω</i>	AS447	-
AS439	<i>nasB::Tn5</i> , <i>nasS::KIXX</i>	AS448	-
AS249	<i>nas-1::Tn5</i>	AS449	AS458
AS252	<i>nas-4::Tn5</i>	AS450	AS459
AS253	<i>chlB::Tn5</i>	AS451	AS460

de los operones *nasAB* y *nasSR* en los distintos fondos genéticos.

Como se puede apreciar en la tabla VII la expresión del operón *nasAB* es mínima en condiciones de fijación y en presencia de amonio, mientras que alcanza niveles más altos en presencia de nitrato. La represión por amonio se observa en los medios con nitrato amónico.

En las estirpes que tienen mutados los genes *ntrA* o *ntrC* no hay transcripción del operón, tabla VII, como cabía de esperar por los datos anteriormente publicados sobre la asimilación de nitrato (Santero *et al.*, 1986; Toukdarian *et al.*, 1986).

Los mutantes que carecen de actividad nitrato reductasa, bien por mutación en la propia apoenzima bien por mutación en alguno de los genes que intervienen en la biosíntesis del cofactor de molibdeno, con la excepción de AS450, presentan una expresión independiente de nitrato, pero siguen estando regulados por amonio, tabla VIII.

No se observa expresión del operón en fondos *nasS::Ω* y *nasR::Ω*. Por tanto, *nasR* es un activador positivo de la expresión del operón *nasAB*, tabla IX. Sin embargo, en la estirpe *nasS::KIXX* hay transcripción del operón y además es independiente de la fuente de nitrógeno en el medio, tabla IX.

Tabla VII. Actividades β-galactosidasa de la fusión en el operón *nasAB-lacZ* en diferentes fondos genéticos

ESTIRPE	GENOTIPO	N ₂	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ NH ₄	NH ₄ ⁺	ClO ₃ ⁻
AS440	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i>	34.7	249.7	126.8	31.3	22.1	120.4
AS441	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i> , <i>ntrA::Tn5</i>	20.2	21.3	ND	18.9	16.7	ND
AS442	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i> , <i>ntrC::Tn5</i>	26.9	26.1	ND	25.2	27.8	ND

Las actividades se midieron en cultivos que habían sido incubados en medio mínimo hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5. Posteriormente se les añadió la fuente de nitrógeno y se dejaron en agitación durante 6 horas para inducir el promotor del operón *nasAB*.

Las actividades β-galactosidasa se expresan en unidades Miller.

Los medios donde crecía el mutante *ntrA* se suplementaron con urea. Esta forma de nitrógeno combinado no reprime la transcripción de este operón pero permite el crecimiento del mutante.

Tabla VIII. Actividades β -galactosidasa de la fusión en el operón *nasAB-lacZ* en diferentes fondos genéticos afectados en la actividad nitrato reductasa

ESTIRPE	GENOTIPO	N ₂	NO ₃ ⁻	NO ₃ NH ₄	NH ₄ ⁺
AS440	Φ <i>nasA-lacZ, nasAB</i>	27.3	242.9	34.2	24.8
AS446	Φ <i>nasA-lacZ, nasAnasB::Tn5</i>	184.9	257.6	36.7	23.2
AS449	Φ <i>nasA-lacZ, nasAB, nas-1::Tn5</i>	108.2	106.5	16.4	12.9
AS450	Φ <i>nasA-lacZ, nasAB, nas-4::Tn5</i>	24.6	218.2	32.4	23.5
AS451	Φ <i>nasA-lacZ, nasAB, chlB::Tn5</i>	177.2	223.6	30.7	22.6

Los experimentos de inducción se realizaron de la misma forma que para el estudio del promotor del operón *nasAB* en los fondos genéticos de la tabla VII. Las actividades β -galactosidasa se expresan en unidades Miller.

Tabla IX. Actividades β -galactosidasa de la fusión en el operón *nasAB-lacZ* en diferentes fondos genéticos afectados en el operón *nasSR*

ESTIRPE	GENOTIPO	N ₂	NO ₃ ⁻	NO ₃ NH ₄	NH ₄ ⁺
AS440	Φ <i>nasA-lacZ, nasAB</i>	33.6	262.4	35.1	20.4
AS446	Φ <i>nasA-lacZ, nasAnasB::Tn5</i>	193.9	267.4	38.5	20.8
AS443	Φ <i>nasA-lacZ, nasAB, nasS::Ω</i>	23.3	24.5	30.9	25.6
AS445	Φ <i>nasA-lacZ, nasAB, nasS::KIXX</i>	333.2	335.8	195.7	189.4
AS444	Φ <i>nasA-lacZ, nasAB, nasR::Ω</i>	17.8	20.3	22.9	21.7
AS448	Φ <i>nasA-lacZ, nasAnasB::Tn5-tet, nasS::KIXX</i>	267.2	318.6	185.4	179.3
AS447	Φ <i>nasA-lacZ, nasAnasB::Tn5, nasR::Ω</i>	23.5	22.8	26.9	28.1

Los experimentos de inducción se realizaron de la misma forma que para el estudio del promotor operón *nasAB* en los fondos genéticos de la tabla VII. Las actividades β -galactosidasa se expresan en unidades Miller.

En cuanto a lo que se refiere a la expresión del promotor del operón *nasSR*, se observa una independencia de la fuente de nitrógeno y del fondo genético como se puede apreciar en la tabla X. Por tanto, se trata de un promotor constitutivo y no dependiente de σ^{54} .

Tabla X. Actividades enzimáticas de estirpes de *A. vinelandii* con la fusión en el operón *nasSR*

ESTIRPE	GENOTIPO	N ₂	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ NH ₄	NH ₄ ⁺	ClO ₃ ⁻
AS452	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSR</i>	154.9	175.8	162.8	181.3	189.8	156.4
AS453	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSR</i> , <i>ntrA::Tn5</i>	ND	ND	ND	156.1	167.8	ND
AS454	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSR</i> , <i>ntrC::Tn5</i>	142.4	156.2	ND	158.8	170.1	ND
AS455	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasS::Ω</i>	166.7	165.3	ND	168.7	175.4	ND
AS456	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSnasR::Ω</i>	167.8	157.2	ND	169.3	161.9	ND
AS457	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSR</i> , <i>nasB::Tn5</i>	145.6	169.9	ND	152.4	163.6	ND
AS458	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSR</i> , <i>nas-1::Tn5</i>	158.2	165.2	ND	178.4	138.6	ND
AS459	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSR</i> , <i>nas-4::Tn5</i>	168.8	163.9	ND	151.6	152.6	ND
AS460	Φ <i>nasS-lacZ</i> , <i>nasSR</i> , <i>chlB::Tn5</i>	167.4	183.4	ND	163.6	157.4	ND

Los experimentos de inducción se realizaron de la misma forma que para el estudio del promotor del operón *nasAB*. Las actividades β -galactosidasa se expresan en unidades Miller.

3.2.6. Discusión

La expresión del promotor *nasAB* es mínima en presencia de amonio y en condiciones de fijación, mientras que es máxima en presencia de nitrato, tabla VII. Es, por tanto, un operón inducible por nitrato y reprimible por amonio. Esta inducción, aunque más baja, también se observa cuando en el medio hay nitrito o clorato, tabla VII.

En un fondo genético *ntrA* o *ntrC* no hay expresión del operón *nasAB*, confirmando los datos que anteriormente se disponían sobre la asimilación de nitrato en *A. vinelandii* (Santero *et al.*, 1986; Toukdarian *et al.*, 1986).

Las mutaciones que afectan a la propia apoenzima de la nitrato reductasa o a los genes que intervienen en la biosíntesis del cofactor de molibdeno, provocan una expresión independiente de nitrato, aunque el amonio sigue reprimiendo, tabla VIII. Todo esto indica que la nitrato reductasa ejerce un efecto de regulación sobre su propio promotor. Casos de autorregulación de la nitrato reductasa han sido propuestos en otros organismos. En *Aspergillus nidulans* (Cove, 1976) y en *Neurospora crassa* (Tomsett *et al.*, 1981) se presentaron pruebas del control autógeno de la nitrato reductasa. Las mutaciones en el gen *nit-3*, gen estructural del apoenzima nitrato reductasa, de *N. crassa* dan lugar a expresión constitutiva desde su propio promotor (Fu y Marzluf, 1988). Se ha propuesto que la nitrato reductasa está implicada en un control autógeno, que podría ejercerse por unión de la nitrato reductasa, en ausencia de nitrato, al producto del gen *nit-4*, efector positivo para la expresión de los genes de la nitrato y la nitrito reductasa en este organismo. Un cambio de conformación de la nitrato reductasa causado por la unión del nitrato podría liberar al producto de *nit-4* y permitir que activara la expresión de *nit-3*. Estos autores también demuestran constitutividad de *nit-3* en un mutante *nit-1*, afectado en el cofactor de molibdeno pero con una apoenzima normal; esto lo explican suponiendo que el apoenzima puede tener una estructura diferente a la del holoenzima lo que impediría su actividad autorreguladora. Esta explicación podría ser válida para los mutantes de *A. vinelandii* afectados en los genes *chlB* y *nas-1*, presuntamente afectados en la biosíntesis del cofactor de molibdeno y que expresan constitutivamente el operón *nasAB*. Sin embargo, en un mutante en el gen *nas-4* la expresión del operón es inducible por nitrato, aunque no presenta actividad nitrato reductasa. Esto puede ser debido a la

presencia de un holoenzima no activo, con un cofactor de molibdeno no maduro, pero que aún conserva la capacidad de regular la transcripción del operón *nasAB*.

En *K. pneumoniae* (Cali *et al.*, 1989) y en *K. aerogenes* (Bender y Friedrich, 1990) se ha observado también constitutividad en la expresión del operón *nasAB* en mutantes de la nitrato reductasa. No obstante, Cali *et al.* (1989) no son partidarios de la hipótesis de la autorregulación, sino que explican este fenómeno como el efecto de un inductor permanente (trazas de nitrato no metabolizado por no existir actividad de reducción de nitrato o un inductor gratuito de naturaleza desconocida) que mantendría inducida la expresión desde el promotor del gen de la nitrato reductasa. En nuestro caso hay un dato que permite descartar esta hipótesis. La estirpe AS450, afectada en el gen *nas-4*, no tiene actividad nitrato pero sí nitrito reductasa y conserva la inducción del operón por nitrato. En este mutante, la nitrato reductasa no estaría reduciendo las supuestas trazas de nitrato, con lo que se debería observar inducción en ausencia de nitrato. Sin embargo, esto no ocurre y la estirpe AS450 sólo expresa el operón *nasAB* cuando se añade nitrato al medio, tabla VIII.

Los mutantes *nasS::Ω* o afectados sólo en *nasR* no tienen transcripción del operón *nasAB*, tabla IX. Sin embargo, en un fondo *nasS::KIXX*, se observa que la transcripción del operón es independiente de la fuente de nitrógeno en el medio, tabla IX. La expresión constitutiva del operón *nasAB* puede ser debida a la mutación en el gen *nasS* o puede estar provocada por una mayor tasa de transcripción del gen *nasR*, ya que el promotor del cassette KIXX es más fuerte que el propio promotor del operón *nasSR*, con lo que se sintetizaría mayor cantidad de proteína NASR que en condiciones fisiológicas, alterándose todo el mecanismo de regulación. También puede ser debido a un efecto de ambos fenómenos. Para aclarar este punto sería de mucha utilidad un mutante no polar en *nasS*, para que el gen *nasR* se exprese desde su propio promotor. Los intentos, hasta ahora, de obtención de dicho mutante han sido infructuosos, pero seguimos en ello.

El modelo de regulación de la asimilación de nitrato en *A. vinelandii* que proponemos a partir de los resultados anteriormente presentados es el siguiente:

Capítulo 2

La transcripción del operón *nasAB* es dependiente del factor sigma-54 de la ARN polimerasa, producto del gen *ntrA*.

En presencia de nitrato y en ausencia de amonio, el producto de *ntrC*, junto al producto del gen *nasR*, actuarían positivamente sobre la transcripción de este operón.

La inducción del operón *nasAB* podría producirse por uno de estos dos mecanismos:

1. En ausencia de nitrato, la nitrato reductasa estaría inhibiendo su propia expresión. El mecanismo de la autorregulación podría ser similar al observado en hongos, es decir, el producto del gen *nasB* podría capturar al producto del gen *nasR*, que en estas condiciones no ejercería el control positivo sobre la transcripción del operón *nasAB*, figura 24.A. Así, en el mutante AS448, *nasS::KIXX*, al haber mayor expresión de *nasR* la población de esta proteína también sería mayor, por lo que la nitrato reductasa no podría interferir con todas las proteínas NASR, quedando algunas libres que provocarían la expresión del operón en ausencia de nitrato.

En presencia de nitrato, la nitrato reductasa sufriría un cambio conformacional provocado por el propio nitrato que dejaría libre a NASR y permitiría la expresión del operón.

La función de NASS sería exclusivamente la del transporte de nitrato.

2. En el fondo genético *nasS::KIXX*, además de una mayor expresión del gen *nasR*, no hay que olvidar que este gen se encuentra mutado y que el fenotipo observado es de una expresión del operón *nasAB* independiente de la fuente de nitrógeno. Por tanto, la proteína NASS podría estar modulando la actividad de NASR en la cepa silvestre.

Este modelo es básicamente igual al anterior. En ausencia de nitrato, la proteína NASR estaría capturada por NASB. Cuando hubiese nitrato en el medio la proteína NASR se liberaría y podría ejercer el control positivo sobre el promotor de este operón. La liberación de NASR se produciría por la acción de NASS, figura 24.B. En este modelo no se puede descartar que NASS no tenga una función en el transporte de

nitrato, podría actuar tanto en el transporte como en la transmisión de la señal del nitrato a NASR.

Por último, el hecho de que en el mutante *nasS::KIXX* se pierda la regulación por amonio y asumiendo que en la cepa silvestre la regulación por amonio está controlada por el sistema *ntrBC* del mismo modo que en enterobacterias, podría estar indicando que la proteína NASR ejerce su función vía NTRC o vía NTRB, figura 25.

La confirmación de este modelo requiere una aproximación más directa al estudio de la función de NASS, NASR, así como de las interacciones propuestas entre los distintos elementos.

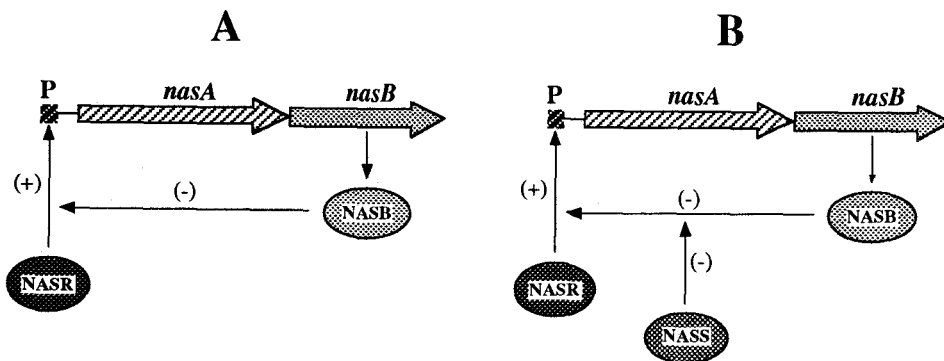


Figura 24. Posibles modelos de interacción entre las proteínas NASS, NASR y NASB de *A. vinelandii*

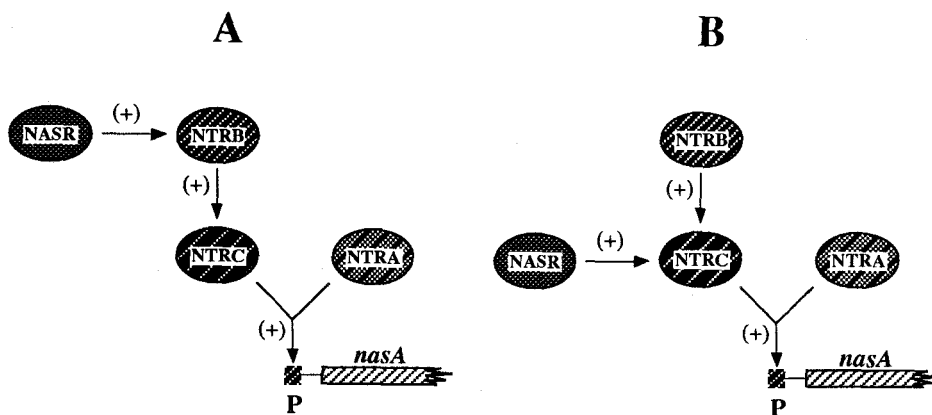


Figura 25. Posibles modelos de activación del promotor *nasAB* de *A. vinelandii*

Capítulo 3

3.3. CARACTERIZACION DE MUTANTES AFECTADOS EN LA REGULACION POR AMONIO DE LA ASIMILACION DE NITRATO

El clorato, un análogo inocuo del nitrato, se reduce por la acción de la nitrato reductasa a clorito, que es tóxico para la bacteria. Basándose en este hecho, en *A. vinelandii*, se pueden seleccionar mutantes que carecen de actividad nitrato reductasa en medio mínimo suplementado con clorato. La selección en clorato también se puede llevar a cabo en medios suplementados con bajas concentraciones de amonio (0.2 g/l), insuficientes para reprimir la síntesis de la nitrato reductasa, pero suficientes para permitir el crecimiento de una estirpe Nif^- . En este segundo medio de selección es posible aislar mutantes afectados simultáneamente en la asimilación de nitrato y en la fijación de nitrógeno.

En nuestro laboratorio se disponía de mutantes afectados simultáneamente en la fijación de nitrógeno y en la asimilación de nitrato (Luque, 1987). Se obtuvieron por mutagénesis con el transposón Tn5 del plásmido pGS9. Este plásmido se transfiere eficazmente a un amplio espectro de bacterias, pero su capacidad de replicación y mantenimiento está restringido a enterobacterias (Selvaraj e Iyer, 1983). Se introdujo por conjugación desde la estirpe de *E. coli* HB101/pGS9, junto con la estirpe HB101/pRK2013 como coadyuvante. Se seleccionaron transconjugantes Km^r de UW136, que posteriormente se sembraron en medio suplementado con clorato y amonio. De los mutantes obtenidos, 3 de ellos, llamados MV92, MV93 y MV94 resultaron tener un fenotipo extraño: Nif^- y Chl^r , pero capaces de utilizar nitrato como fuente de N. Para comprobar que estas estirpes no eran dobles mutantes, se transfirió por transformación la resistencia a kanamicina del Tn5 a la estirpe silvestre UW136, observándose que dicha resistencia iba asociada al fenotipo Nif^- y Chl^r (Luque, 1987).

3.3.1. Actividades nitrato y nitrito reductasa de las estirpes MV92, MV93 y MV94

Se midieron las actividades nitrato y nitrito reductasa de los mutantes MV92, MV93 y MV94 tras cultivarlos en presencia de distintas fuentes de N. Los resultados se muestran en la tabla XI. En NO_3K dichos

Capítulo 3

mutantes presentaban menos actividad nitrato reductasa que la cepa silvestre UW136, del orden de tres veces menos. En cambio, la actividad nitrito reductasa no se alteraba. En NO_3NH_4 , tanto la actividad nitrato como la nitrito reductasa de los mutantes descendía hasta niveles basales.

Tabla XI. Actividades enzimáticas de los mutantes MV92, MV93 y MV94

<u>Estirpes</u>	NO_3^-		NO_3NH_4		NH_4^+	
	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>
UW136	18.4	29.8	7.0	10.9	0.7	1.8
MV92	6.5	25.2	1.3	1.2	0.7	1.6
MV93	6.4	26.4	1.8	1.7	0.8	1.9
MV94	6.7	26.6	1.4	1.6	0.9	1.4

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 distintas fuentes de nitrógeno y cultivándose durante 15 horas.

3.3.2. Aislamiento de los fragmentos cromosómicos que contienen las inserciones de Tn5

Con objeto de analizar si las mutaciones eran debidas a inserciones de Tn5 en la misma o diferentes regiones cromosómicas, se procedió a aislar estos fragmentos a partir de los ADNs de las estirpes mutantes cortados previamente con enzimas que no tenían dianas de restricción en este elemento transponible.

3.3.2.1. Obtención de la sonda

El ADN que se empleó para determinar los pesos moleculares de los fragmentos cromosómicos que contenían el Tn5 en los mutantes fue un fragmento *Pst*I de 0.9 kb interno al gen de la resistencia a kanamicina de dicho transposón. Este se obtuvo cortando el ADN de pUC4-KIXX,

figura 26, con esta enzima de restricción. Los productos de la restricción se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se aisló el fragmento de gel adecuado. La sonda se marcó utilizando métodos no radiactivos como se describe en Materiales y Métodos.

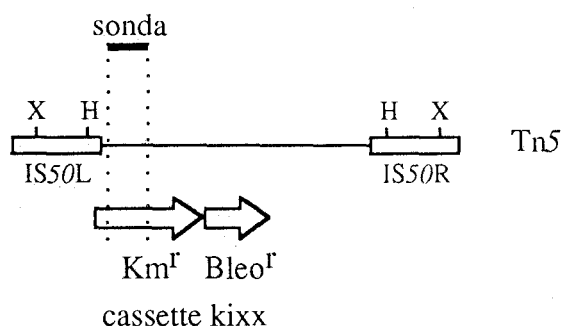


Figura 26. Esquema de la sonda utilizada para los experimentos de localización del transposón Tn5 en el cromosoma de los mutantes MV92, MV93 y MV94

3.3.2.2. Preparación del filtro

Se aisló ADN cromosómico de cada mutante y se cortó con *EcoRI*, enzima que no tiene diana en Tn5. Esto no sólo permitía localizar el fragmento donde se encuentra el transposón sino identificar la región de ADN de *A. vinelandii* que flanquea este elemento transponible para su posterior clonación. El ADN se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se transfirió a filtro de nailon.

3.3.2.3. Hibridación

Se utilizó la sonda de Tn5 frente al ADN total de los mutantes para localizar dicho transposón. En la figura 27 se muestra el resultado de la hibridación. Todos los mutantes presentaban una banda *EcoRI* de hibridación de aproximadamente 9.6 kb.

Este resultado indicaba que los mutantes estaban afectados en la misma región cromosómica *EcoRI*. Para comprobarlo se clonaron los

fragmentos mutantes y se estudiaron los mapas de restricción generados por distintas endonucleasas.

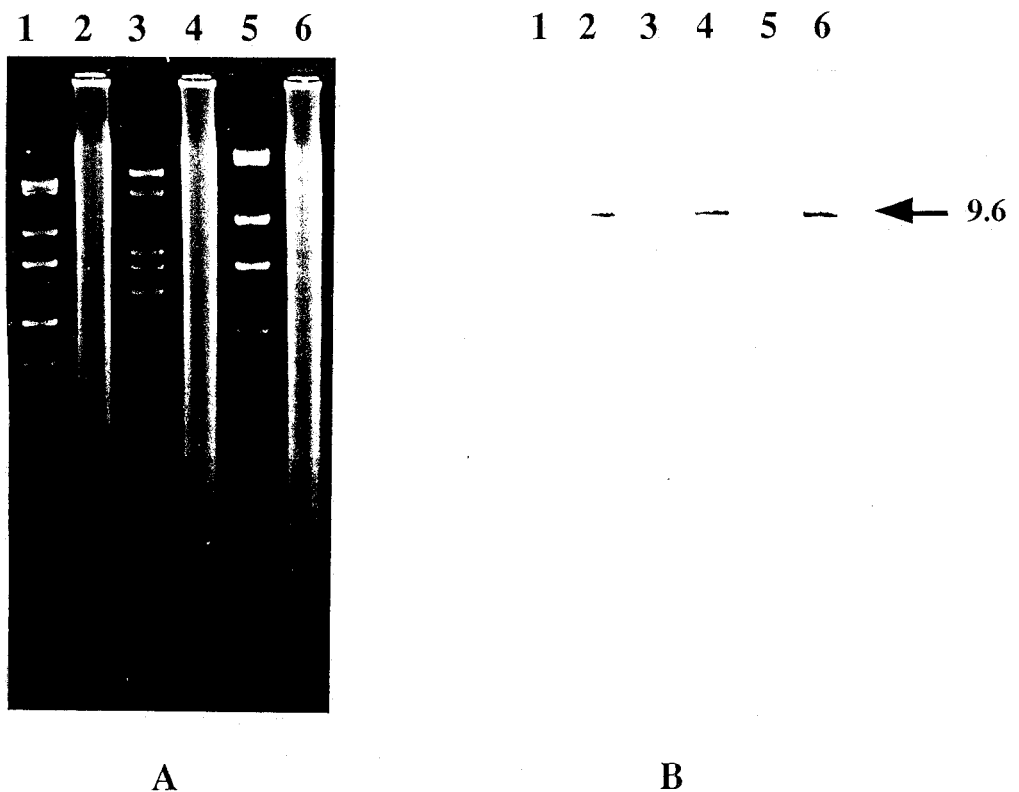


Figura 27. Hibridación con una sonda de Tn5 de los ADN mutantes cortados con *EcoRI*.

A: Electroforesis en gel de agarosa. Los carriles impares contienen marcadores de peso molecular obtenidos a partir de ADN de λ cortado con diferentes enzimas de restricción: *AccI*, 1; *BamHI*, 3; *HindIII*, 5 (para los pesos moleculares ver Materiales y Métodos). Los carriles pares contienen los ADN cromosómicos de los mutantes cortados con *EcoRI*: MV92, 2; MV93, 4; MV94, 6.

B: Resultado de la hibridación sobre filtro de nailon correspondiente al gel de la figura A. Como sonda se empleó un fragmento interno de Tn5.

3.3.2.4. Clonación de los fragmentos genómicos que contienen el Tn5 en los mutantes MV92, MV93 y MV94

Para la clonación de los fragmentos que provocan el fenotipo en MV92, MV93 y MV94, se cortó ADN cromosómico de estos mutantes con *EcoRI* y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se aisló la población de fragmentos *EcoRI* de 9-10 kb mediante "geneclean" (ver Materiales y Métodos), se ligaron al vector pTZ19R también cortado con esta endonucleasa y se transformó a la estirpe 71-18 de *E. coli*. Los

transformantes se seleccionaron en cajas de medio Luria-Bertani con ampicilina y kanamicina. A las colonias que se obtuvieron se les hizo una minipreparación de ADN plasmídico. Una parte de cada minipreparación se cortó con *EcoRI* y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se escogió, para cada mutante, un plásmido que presentase las dos bandas esperadas: la de 2.9 kb de pTZ19R y la de 9.6 kb del inserto. A los plásmidos aislados a partir del ADN genómico de MV92, MV93 y MV94 se les denominó pMAS92, pMAS93 y pMAS94, respectivamente, figura 28.

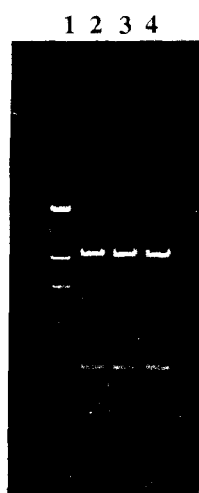


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los plásmidos que contienen los fragmentos cromosómicos portadores de las mutaciones en las estirpes MV92, MV93 Y MV94. El carril 1 lleva ADN de λ cortado con *HindIII*; plásmidos pMAS92, carril 2; pMAS93, carril 3; pMAS94, carril 4, cortados con *EcoRI*.

3.3.2.5. Ligamiento de los transposones clonados y el fenotipo de las estirpes mutantes

Con objeto de comprobar si los transposones clonados en el apartado anterior eran los responsables del fenotipo de las estirpes MV92, MV93 y MV94 se transformó UW136 con cada uno de los plásmidos cortados con *EcoRI*. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo suplementado con amonio y kanamicina para detectar el paso del transposón. Se replicaron 100 colonias de cada transformación a cajas de medio mínimo, medio mínimo suplementado con nitrato, o clorato y amonio, tabla XII. Los resultados indicaban que los transposones

obtenidos a partir de ADN total de los mutantes eran los causantes del fenotipo de las estirpes MV92, MV93 y MV94.

Tabla XII. Fenotipo de los transformantes obtenidos a partir de UW136 con ADN de los plásmidos que portaban el Tn5 de los mutantes MV92, MV93 y MV94

ORIGEN ADN	NIF	NAS	CHL	KM
pMAS92	-	+	r	r
pMAS93	-	+	r	r
pMAS94	-	+	r	r

Se transformó UW136 con ADN de los plásmidos mencionados y cortados con *EcoRI*. Los transformantes se seleccionaron en cajas con amonio y kanamicina. Se picaron 100 transformantes de cada a cajas de medio mínimo, suplementado con nitrato o con clorato y amonio (0.2 g/l).

(+) indica crecimiento; (-) no crecimiento; (r) resistente

3.3.2.6. Mapa de restricción de los plásmidos pMAS92, pMAS93 y pMAS94

Los plásmidos pMAS92, pMAS93 y pMAS94 se sometieron a cortes con distintas enzimas de restricción. Los enzimas empleados fueron: *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* y *XhoI*. Se utilizaron cortes simples y dobles con cada uno de estos enzimas. A partir de los fragmentos de restricción originados se elaboró el mapa que se presenta en la figura 29.

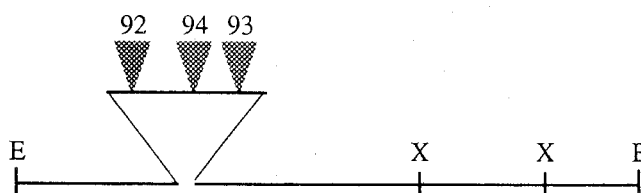


Figura 29. Localización de Tn5 en los plásmidos pMAS92, pMAS93 y pMAS94

3.3.3. Clonación de la región silvestre implicada en el fenotipo de los mutantes

Con el fin de aislar la región silvestre implicada en el fenotipo de hipersensibilidad a la represión por amonio de las actividades nitrato y nitrito reductasa se utilizó una genoteca de ADN genómico de UW136 de *A. vinelandii* construida en el fago λ GEM12 (Ramos, 1992). Se empleó como sonda para rastrear dicha genoteca el fragmento *EcoRI* aislado a partir del ADN total de MV94. Se cortó el plásmido pMAS94 con la restrictasa *EcoRI* y se sometió a electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión. Se extrajo el bloque de agarosa que contenía la banda de 9.6 kb y se marcó por procedimientos no radiactivos.

Se infectó la estirpe KW251 de *E. coli* con parte de la genoteca, ver Materiales y Métodos, de manera que se obtuvieran 3000 unidades formadoras de placas repartidas en 10 cajas de Petri. El ADN se transfirió a filtros de nailon sobre los que se hizo la hibridación.

En este primer experimento se seleccionaron 9 posibles positivos. Con fagos aislados a partir de estas calvas de lisis se infectó de nuevo la cepa KW251 y se repitió en cada caso la hibridación, pero ahora con un número menor de halos por caja (100-200 en una caja por cada positivo). Sólo se confirmó uno, al que se denominó λ S7. A este fago recombinante se le aisló ADN. Se cortó con la endonucleasa *EcoRI*, se sometió a electroforesis en agarosa al 0.8% y se transfirió a filtro de nailon sobre el que se repitió la hibridación con la sonda obtenida del plásmido pMAS94, figura 30. Se observa que pMAS94 hibrida con un fragmento *EcoRI* de 3.8 kb, que se correspondería en tamaño con el ADN de *A. vinelandii* que flanquea a Tn5. Este fragmento se clonó en el vector pTZ19R dando el plásmido pMAS941.

El ADN del plásmido pMAS941 cortado con *EcoRI* y de λ S7 se utilizó para transformar los mutantes MV92, MV93 y MV94. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo. Se replicaron 100 colonias de cada transformación a medio mínimo suplementado con amonio y kanamicina o clorato, el resultado se muestra en la tabla XIII. Estos datos demuestran que los tres mutantes, MV92, MV93 y MV94, se encontraban afectados en la misma región cromosómica *EcoRI*, como se indicaba en el apartado 3.3.2.6.

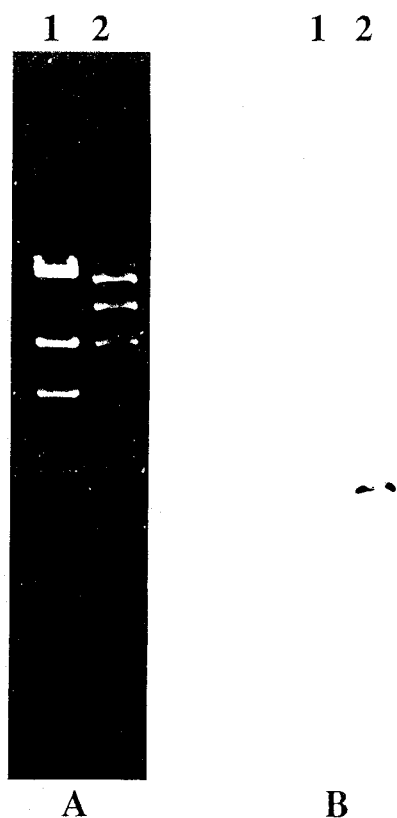


Figura 30. Hibridación con la sonda de pMAS94 cortado con *EcoRI* frente al ADN de λ S7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (A) e hibridación (B). Carril 1, ADN de λ cortado con *HindIII*; carril 2, ADN de λ S7 cortado con *EcoRI*.

Tabla XIII. Fenotipo de los mutantes MV92, MV93 y MV94 transformados con ADN del plásmido pMAS941 cortado con *EcoRI* y de λ S7

ESTIRPE	ADN	NIF ⁺	CHL ^R	KM ^R
MV92	λ S7	100	0	0
	pMAS941 <i>EcoRI</i>	100	0	0
MV93	λ S7	100	0	0
	pMAS941 <i>EcoRI</i>	100	0	0
MV94	λ S7	100	0	0
	pMAS941 <i>EcoRI</i>	100	0	0

Se transformaron los mutantes MV92, MV93 Y MV94 con los ADNs mencionados. Los transformantes se seleccionaron en cajas de medio mínimo. Se picaron 100 transformantes de cada a cajas de medio mínimo suplementado con amonio y clorato o kanamicina.

3.3.4. Mapa de restricción de pMAS941: Implicación del operón *nifBQ* en el fenotipo de los mutantes alterados en la represión por amonio

El plásmido pMAS941 se sometió a digestión con diferentes endonucleasas de restricción. Se emplearon las enzimas: *Bgl*II, *Eco*RI, *Pst*I, *Sal*I, *Sph*I y *Xho*I, también se utilizaron *Apa*I, *Bam*HI y *Hind*III, pero o bien no cortaron en pMAS941 o el único sitio de corte estaba localizado en el vector. El mapa de restricción resultante se muestra en la figura 31.

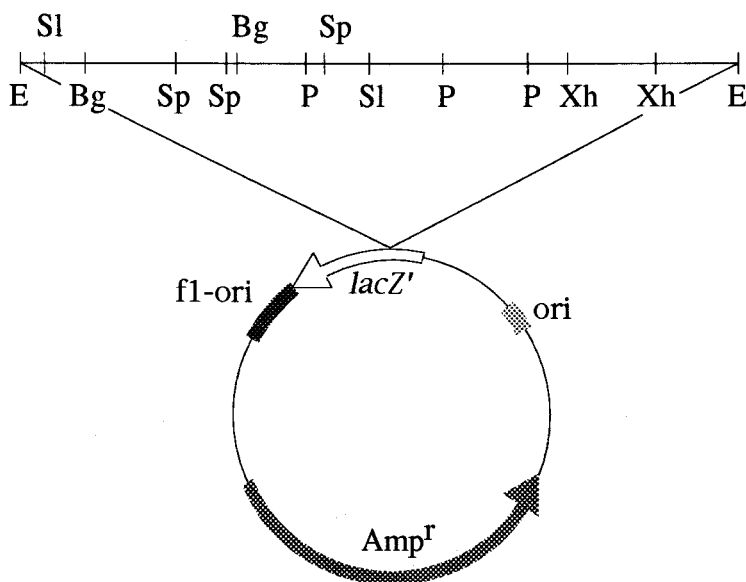


Figura 31. Mapa de restricción de pMAS941

Puesto que los mutantes además de estar alterados en la asimilación de nitrato, eran Nif⁻ se decidió comparar este mapa con los ya publicados para las regiones *nif* de *A. vinelandii* y se comprobó que correspondía al fragmento de 3786 pb del plásmido pRDJ2 (Joerger y Bishop, 1988), que contenía los genes del operón *nifBQ*, figura 30.

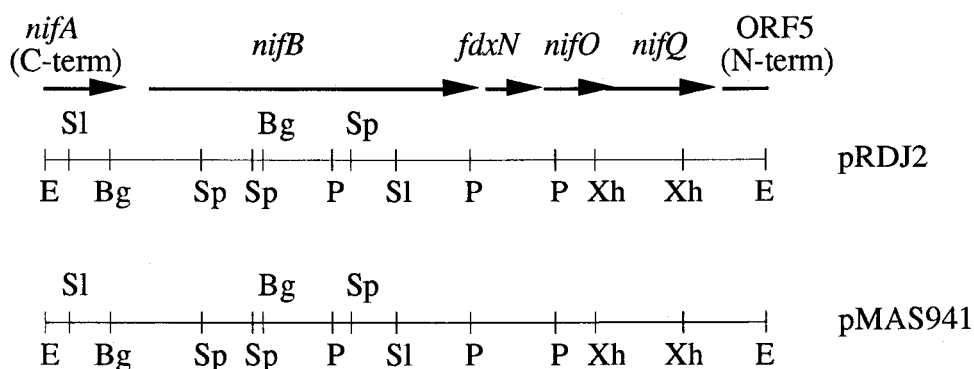


Figura 32. Comparación de los mapas de restricción de los fragmentos cromosómicos clonados en los plásmidos pMAS941 y pRDJ2

En la figura 33 aparece la localización aproximada de los transposones que producen el fenotipo en la estirpes MV92, MV93 y MV94. Todas las inserciones se encontraban en *nifB*, lo que explicaba el fenotipo *Nif⁻* de los mutantes. La hipersensibilidad a la represión por amonio podría ser debida a la mutación en un operón implicado en la biosíntesis de FeMo-co, que repercutiría de alguna manera en la síntesis de Mo-co, ya que ambos cofactores tienen pasos comunes en el metabolismo del molibdato.

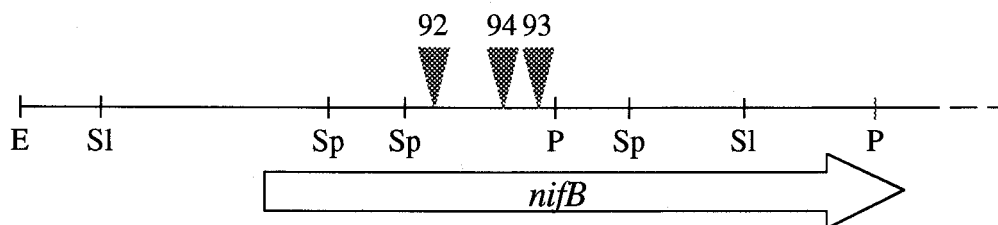


Figura 33. Localización de los transposones de las estirpes MV92, MV93 y MV94 en el operón *nifBQ*

3.3.5. Determinación del gen o genes que provocan el fenotipo

3.3.5.1. Inserciones del elemento genético Ω en el operón *nifBQ*

Para saber que gen o genes estaban implicados en este fenotipo se construyeron inserciones *in vitro* con Ω en pMAS941. Este elemento genético presenta señales de terminación de la transcripción y de la traducción en los dos sentidos a ambos extremos de las resistencias. La

estrategia seguida y la localización de las inserciones se describen en las figuras 34, 35 y 36.

Las inserciones en cada uno de los genes que integran el operón *nifBQ* se introdujeron en la estirpe silvestre UW136 por transformación de los plásmidos pMAS941.1, pMAS941.21, pMAS941.3 y pMAS941.4 cortados con la restrictasa *EcoRI*, seleccionando la resistencia de Ω , espectinomycinina. Posteriormente se comprobó la sensibilidad a ampicilina, marcador del vector, y el crecimiento de las distintas estirpes en medio mínimo o suplementado con amonio y clorato. Los resultados se recogen en la tabla XIV.

Tabla XIV. Crecimiento en medio mínimo y suplementado con amonio + clorato de los mutantes de Ω en los genes que integran el operón *nifBQ*

ESTIRPE	GENOTIPO	NIF	CHL
UW136	Silvestre	+	s
AS401	<i>nifB::</i> Ω	-	s
AS402	<i>fdxN::</i> Ω	+	s
AS403	<i>nifO::</i> Ω	+	s
AS404	<i>nifQ::</i> Ω	+	s

Se transformó UW136 con ADN de los plásmidos pMAS941.1, pMAS941.21, pMAS941.3 y pMAS941.4 cortado con *EcoRI*. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo suplementado con amonio y espectinomycinina, cada transformación se pasó a medio mínimo o suplementado con clorato y amonio.

(+) indica crecimiento, (-) indica no crecimiento y (s) sensibilidad

Como se puede observar en la tabla XIV, ninguna de las inserciones provocaba el fenotipo de resistencia a clorato. Este sorprendente resultado nos hizo pensar que el fenotipo no se debía a una pérdida de función causada por la inserción de Tn5 sino a la expresión constitutiva de los genes distales a Tn5 a partir de un promotor que se transcribe hacia fuera (Berg *et al.*, 1980), por lo que se podía descartar a *nifB* como posible candidato implicado en el fenotipo de resistencia a clorato.

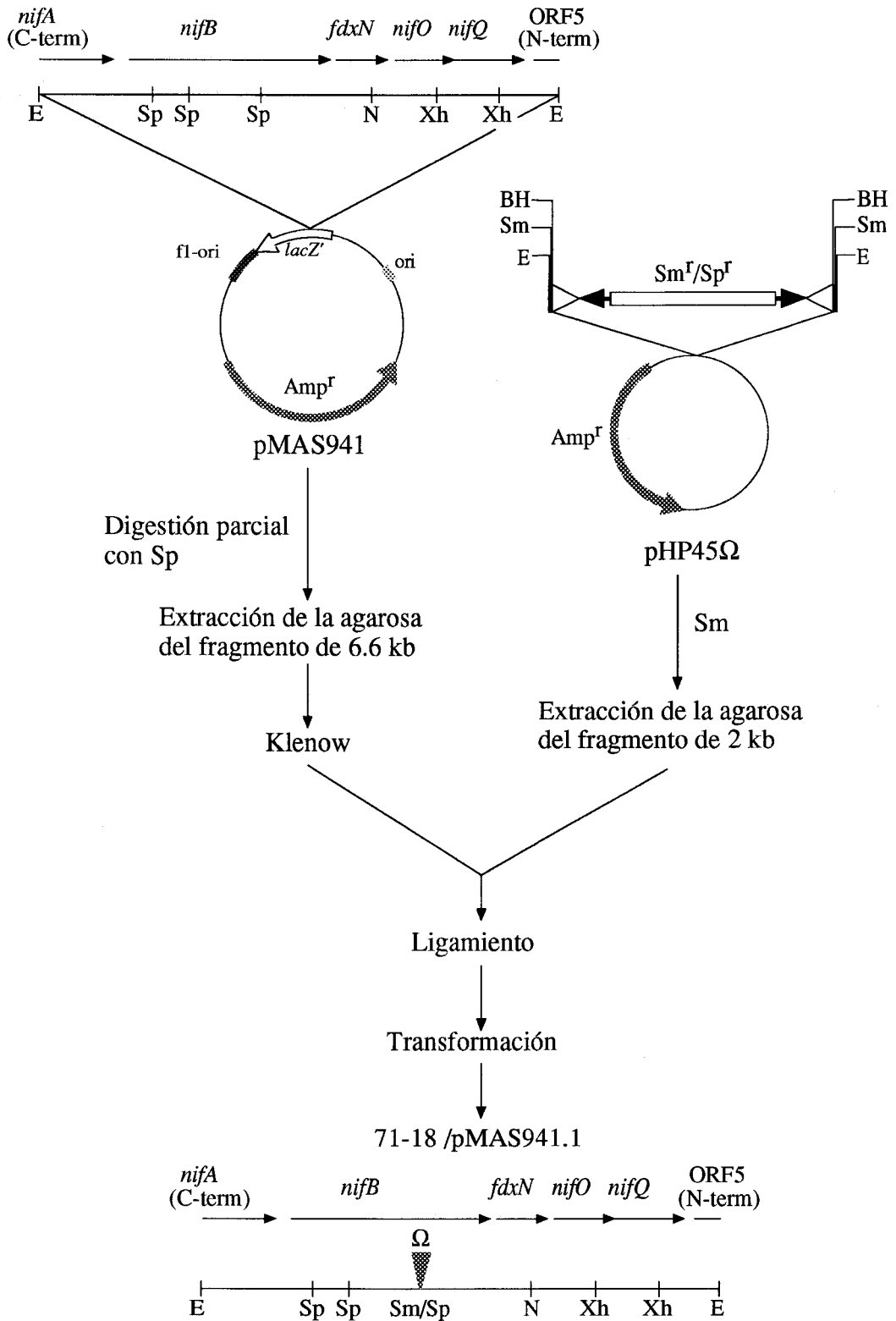


Figura 34. Esquema de la estrategia seguida para la obtención de una inserción de Ω en *nifB*. El corte de restricción *Sph*I también se encontraba en el sitio de múltiples dianas de clonación del vector pTZ19R

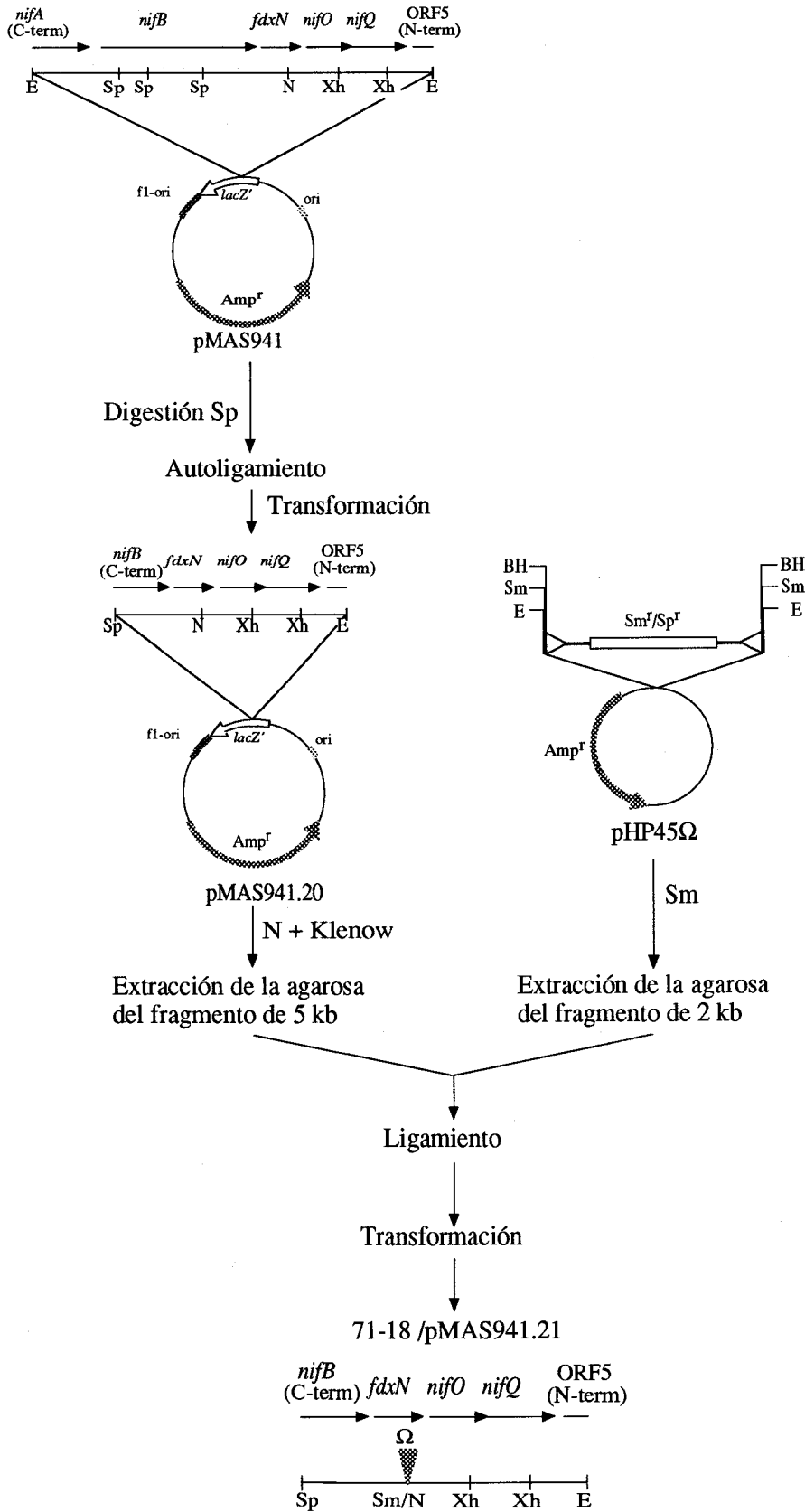


Figura 35. Inserción de Ω en *fdxN*. En *nifB* hay 4 sitios de restricción *NarI* por lo que para clonar Ω en la diana *NarI* de *fdxN* se trató pMAS941 con la restrictasa *SphI* y se autoligó, subclonando el fragmento *SphI-EcoRI* de 2.2 kb del operón *nifBQ* que sólo contiene una diana *NarI* en *fdxN*

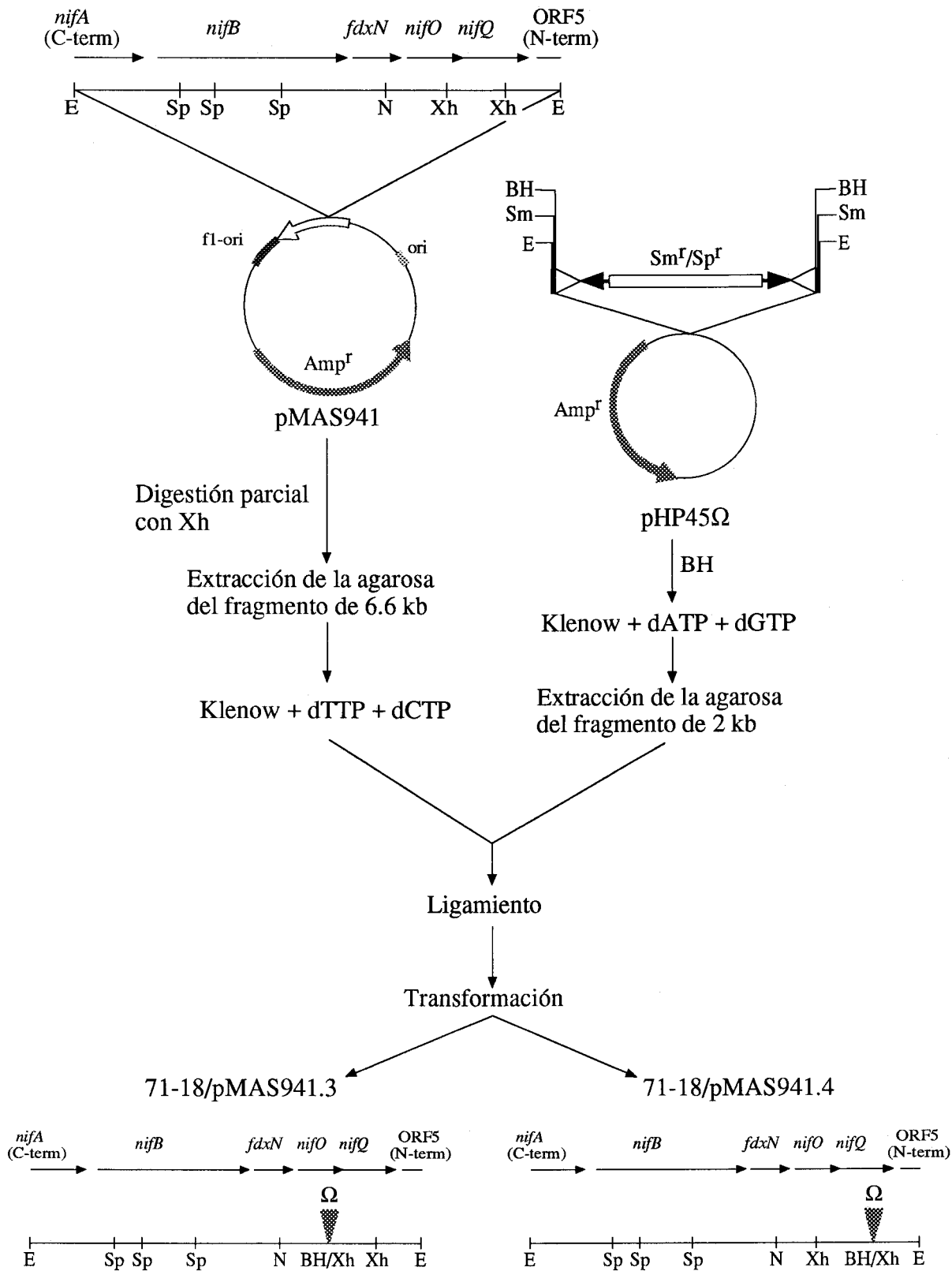


Figura 36. Esquema de la estrategia seguida para insertar Ω en *nifO* y *nifQ*.

3.3.5.2. Expresión de los genes distales a Tn5

Para demostrar la expresión de los genes distales a partir de un promotor que se transcribiría hacia fuera desde Tn5 insertado en *nifB* se han empleado dos aproximaciones. La primera ha consistido en bloquear la transcripción desde el promotor externo para que no se produjese fenotipo. La segunda, estudiar los niveles de expresión del gen implicado en el fenotipo de resistencia a clorato desde su propio promotor y desde el promotor de Tn5. Para esto último se han utilizado fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* de los derivados de Tn5, Tn5-B20 y Tn5-B21.

3.3.5.2.1. Bloqueo de la transcripción desde el promotor de Tn5

Para interrumpir la transcripción del promotor externo de Tn5 se usaron las inserciones de Ω en cada uno de los genes que forman parte del operón *nifBQ*.

Estas inserciones se introdujeron en la estirpe MV92 por transformación de pMAS941.1, pMAS941.21, pMAS941.3 y pMAS941.4 cortados con *EcoRI* y seleccionando en medio mínimo suplementado con amonio la resistencia del cassette y del transposón, espectinomomicina y kanamicina, respectivamente. Posteriormente se comprobó la sensibilidad a ampicilina, resistencia del vector, para asegurar que se había producido un doble hecho de recombinación y no una integración del plásmido completo. La localización de Tn5 en *nifB* y de Ω en los distintos genes se esquematiza en la figura 37.

Cada transformación se analizó en medio mínimo y medio mínimo suplementado con amonio y clorato. En la tabla XV se observa que sólo hay crecimiento en amonio y clorato cuando la transcripción se interrumpe por debajo de *nifO*. Por lo que podemos concluir que el fenotipo de hipersensibilidad a la represión por amonio en los mutantes MV92, MV93 y MV94 es debido a la transcripción de este gen desde un promotor externo de Tn5, aunque no se puede descartar que también estuviera implicado *fdxN*.

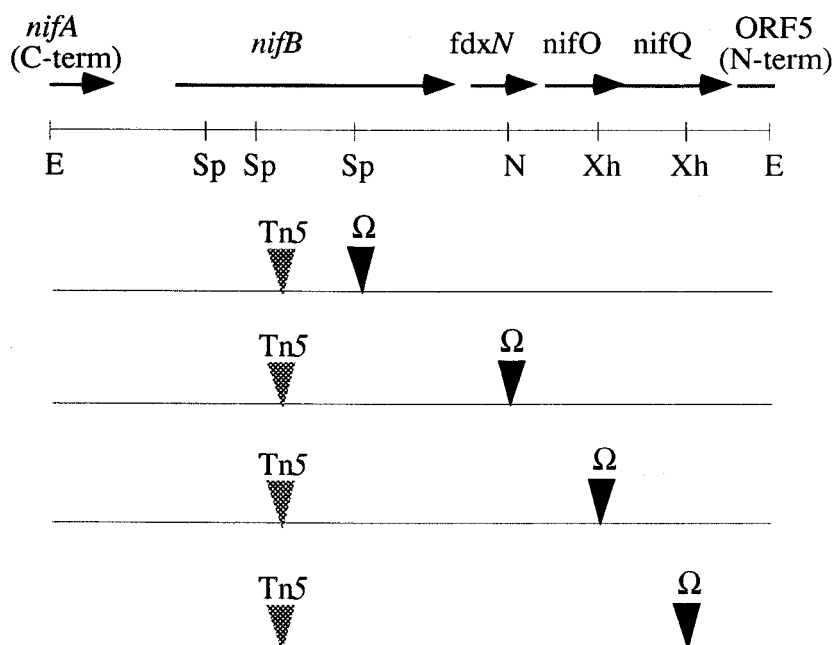


Figura 37. Localización de las inserciones de Ω en las distintas estirpes originadas a partir de MV92

Tabla XV. Fenotipo de los mutantes que contienen Tn5 y Ω integrados en *nifBQ*

ESTIRPE	GENOTIPO	NIF	CHL
UW136	Silvestre	+	s
MV92	<i>nifB</i> ::Tn5	-	r
AS409	<i>nifB</i> ::Tn5; <i>nifB</i> :: Ω	-	s
AS410	<i>nifB</i> ::Tn5; <i>fdxN</i> :: Ω	-	s
AS411	<i>nifB</i> ::Tn5; <i>nifO</i> :: Ω	-	s
AS412	<i>nifB</i> ::Tn5; <i>nifQ</i> :: Ω	-	r

Se transformó MV92 con ADN de los plásmidos con el cassette Ω en cada una de las ORFs del operón *nifBQ* y cortados con *EcoRI*. Los transformantes se seleccionaron en cajas con amonio, kanamicina y espectinomycin. Se picaron 100 transformantes de cada a cajas de medio mínimo y medio mínimo suplementado con clorato y amonio (0.2 g/l).

(+) indica crecimiento; (-) no crecimiento; (r) resistente; (s) sensible

3.3.5.3.2. Obtención de una fusión β -galactosidasa en *nifO*

El plásmido pMAS941 se mutagenizó con Tn5-B20. Este transposón lleva clonado en su extremo el gen *lacZ* sin promotor, figura 38. La mutagénesis se realizó usando como vector λ -B20 en la estirpe S17-1 de *E. coli*, ver Materiales y Métodos.

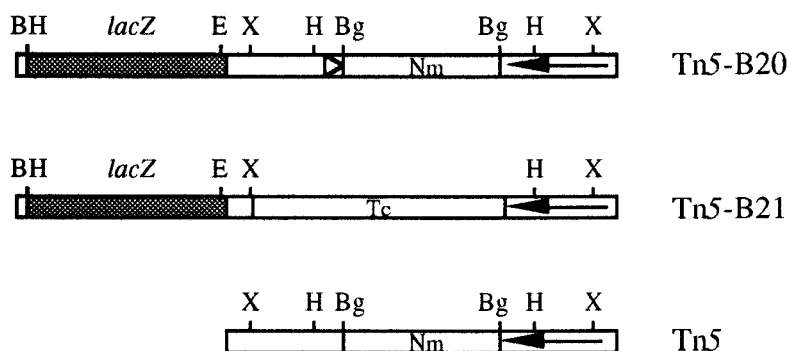


Figura 38. Mapa de restricción de Tn5-B20, Tn5-B21 y Tn5

Las inserciones de Tn5-B20 obtenidas se mapearon con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI y *Xho*I. Se determinó la posición aproximada y la orientación de Tn5-B20 en el operón *nifBQ*.

De todas las inserciones analizadas, sólo nos quedamos con dos para posteriores estudios, figura 39. Una se encontraba en *nifO* en la orientación de transcripción del promotor del operón. Y la otra, en *fdxN*, en la orientación contraria pero cuyo fenotipo sirvió para descartar la implicación del producto de este gen en la resistencia a clorato, como se verá más adelante. Los plásmidos obtenidos se denominaron pMAS941.5 y pMAS941.6, respectivamente.

Se transformó a la estirpe UW136 con estos plásmidos. Se seleccionó la resistencia a kanamicina aportada por el transposón y se probó la resistencia a ampicilina. Este vector no se replica en *Azotobacter*, por tanto sólo nos quedamos con aquellas colonias que eran resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina. A la estirpe con la inserción *nifO*::Tn5-B20 se le denominó AS406, y a la que lleva la inserción en *fdxN*::Tn5-B21, AS407.

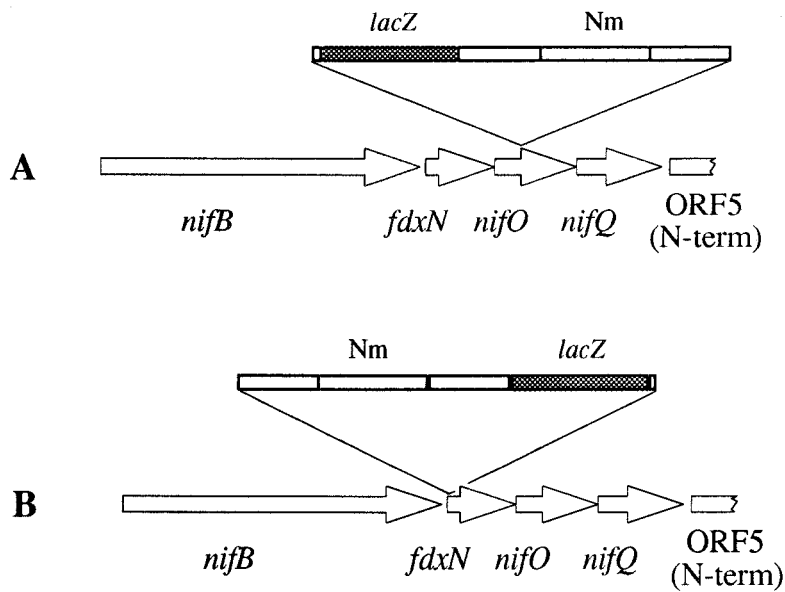


Figura 39. Localización de Tn5-B20 en el operón *nifBQ*. (A) pMAS941.5 y (B) pMAS941.6

Debido a que Tn5-B20 confiere resistencia a kanamicina, no se podía seleccionar la fusión en el fondo genético MV92, por lo que se decidió sustituir esta resistencia por tetraciclina. Para ello se utilizó ADN del fago λ -B21, vector portador de Tn5-B21, derivado tetraciclina resistente de Tn5-B20. Ambos transposones tienen zonas homólogas, que son el indicador *lacZ* y la IS50R, como se puede observar en la figura 38, por lo que un doble hecho de recombinación daría lugar al intercambio del marcador de kanamicina por el de tetraciclina. Con este ADN de λ -B21 se transformó la estirpe AS406, *nifO*::Tn5-B20, seleccionando colonias resistentes a la tetraciclina. La sustitución se determinó comprobando la pérdida de la resistencia a kanamicina y la adquisición de la resistencia a tetraciclina. A la estirpe portadora de Tn5-B21 en *nifO* se denominó AS419.

Las estirpes de *A. vinelandii* con las fusiones en *nifO* se comprobaron por hibridación. Como sonda se empleó un fragmento *EcoRI*-*XhoI* de 2.8 kb del plásmido pMAS941 frente al ADN total de las estirpes AS406, *nifO*::Tn5-B20, y AS419, *nifO*::Tn5-B21, tratados con la enzima *EcoRI*, se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 5% y se

transfirió a filtro de nailon. El patrón de bandas que se puede observar en la figura 40 confirma que los transposones Tn5-B20 y Tn5-B21 se encuentran en el fragmento *XhoI* del operón *nifBQ*.

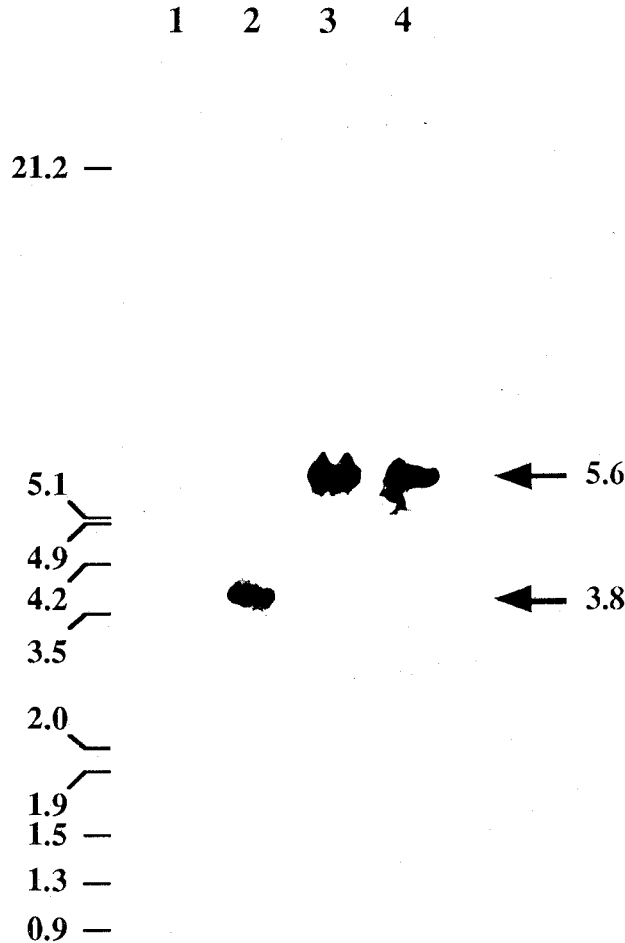


Figura 40. Hibridación de ADN cromosómico de diversas estirpes de *Azotobacter vinelandii* cortado con *EcoRI* y fijado a un filtro de nailon. Las bandas indican los fragmentos que han hibridado con el fragmento *EcoRI-XhoI* de 2.8 kb del plásmido pMAS941. Carril 1, λ cortado con *EcoRI-HindIII*; carril 2, UW136; carril 3, AS406; carril 4, AS419.

En las tablas XVI y XVII se presentan los resultados de crecimiento en distintos medios de los mutantes AS406, AS407 y AS419 y las actividades nitrato y nitrito reductasa en distintas fuentes de nitrógeno combinado, respectivamente. Los resultados de estos experimentos confirman los obtenidos en el apartado anterior. La mutación de *nifO*, estirpes AS406 y AS419, no provoca fenotipo de resistencia a clorato en presencia de bajas concentraciones de amonio, y los niveles de nitrato reductasa son incluso más altos que los de la estirpe silvestre. Los

Capítulo 3

resultados obtenidos con la estirpe AS407, *fdxN*::Tn5-B20, permitió descartar a *fdxN* como gen implicado en el fenotipo de hipersensibilidad al amonio, y concluir que el único gen responsable es *nifO*. La inserción de *fdxN* anula la función de este gen pero al permitir la expresión de *nifO* a partir del promotor de Tn5 provoca el fenotipo de resistencia a clorato.

Tabla XVI. Fenotipo de los mutantes que contienen Tn5-B20 o Tn5-B21 en el operón *nifBQ*

ESTIRPE	GENOTIPO	NO ₃ ⁻	CHL + NH ₄ ⁺	CHL
UW136	Silvestre	+	s	s
AS406	<i>nifO</i> ::Tn5-B20	+	s	s
AS419	<i>nifO</i> ::Tn5-B21	+	s	s
AS407	<i>fdxN</i> ::Tn5-B20	+	r	s

Todas las estirpes se crecieron en medio mínimo suplementado con nitrato, clorato y amonio y sólo con clorato. Se indica con: +, crecimiento; r, resistente; s, sensible

3.3.5.3.3. Construcción de un doble mutante *nifB*::Tn5 y *nifO*::Tn5-B21

Para poder estudiar los niveles de expresión de *nifO* desde el promotor externo de Tn5 se introdujo el transposón que provoca la mutación en la estirpe MV92 en el fondo genético *nifO*::Tn5-B21. Para ello se transformó AS419 con ADN de pMAS92 cortado con *EcoRI*, seleccionando en medios con amonio, primero kanamicina y luego tetraciclina y kanamicina. Se comprobó el crecimiento de los dobles resistentes en medio mínimo suplementado con amonio y clorato y en medio con nitrato. Aquellos que no creciesen en medio con amonio y clorato, pero sí en nitrato eran los candidatos a presentar una doble inserción en *nifBQ*, una de Tn5 en *nifB*, y la otra de Tn5-B21 en *nifO*. A uno de ellos se le denominó AS423, figura 41.

Tabla XVII. Actividades nitrato y nitrito reductasa de los mutantes AS406, AS407 y AS419

<u>Estirpes</u>	<u>NO₃⁻</u>		<u>NO₃NH₄</u>		<u>NH₄⁺</u>	
	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>
UW136	15.8	26.8	6.7	13.5	0.9	2.1
AS406	30.6	29.3	8.4	13.2	0.7	1.4
AS419	27.9	24.8	10.6	12.7	0.9	1.6
AS407	6.6	25.7	1.9	1.6	0.6	1.5

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, se lavaron dos veces con tampón fosfato diluido, se pasaron a medios con distintas fuentes de nitrógeno y se cultivaron durante 15 horas.

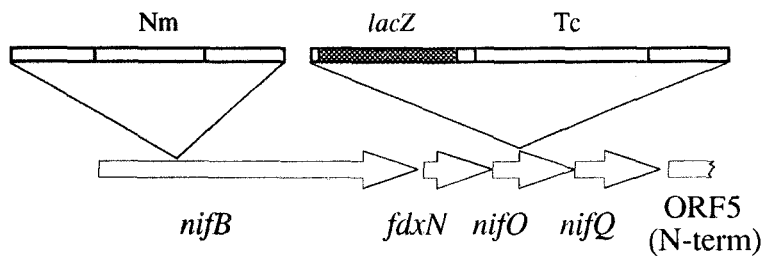


Figura 41. Esquema de las inserciones de Tn5 y Tn5-B21 en AS423

3.3.5.3.4. Niveles de expresión de *nifO* a partir de su propio promotor y del promotor de Tn5

Se han analizado los niveles de expresión de *nifO* a partir de su propio promotor y del promotor de Tn5. Para ello se han medido las actividades β-galactosidasa de las estirpes con las fusiones transcripcionales apropiadas. Las estirpes AS419, *nifO*::Tn5-B21, y AS406, *nifO*::Tn5-B20, nos sirvieron para medir la transcripción a partir del promotor silvestre y la estirpe AS423, *nifB*::Tn5, *nifO*::Tn5-B21, la

Capítulo 3

transcripción a partir del promotor de Tn5 insertado en *nifB*. Las estirpes descritas se cultivaron en medios suplementados con distintas fuentes de nitrógeno. Las actividades β -galactosidasa se presentan en la tabla XVIII.

Tabla XVIII. Actividades β -galactosidasa de fusiones génicas en *nifO*

ESTIRPE	GENOTIPO	N ₂	NO ₃ ⁻	NO ₃ NH ₄	NH ₄ ⁺
AS419	<i>nifO</i> ::Tn5-B21	1968.5	341.6	104.7	110.2
AS423	<i>nifO</i> ::Tn5-B21, <i>nifB</i> ::Tn5	1171.6	1330.9	1437.5	1583.7
AS406	<i>nifO</i> ::Tn5-B20	2547.1	425.6	92.4	122.4

Actividad β -galactosidasa de distintas estirpes de *Azotobacter vinelandii* cultivadas durante 15 horas en medios con distintas fuentes de nitrógeno. Las actividades enzimáticas se expresan en unidades Miller

Puede observarse que:

1. En nitrato, el promotor silvestre se reprime, pero esta represión, no alcanza los niveles basales de los cultivos en presencia de amonio.

2. La expresión del promotor de Tn5 es constitutiva, es decir, independiente de la fuente de nitrógeno.

3. En nitrato, la expresión de *nifO* a partir de Tn5 es del orden de cuatro veces mayor que a partir de su propio promotor.

4. En nitrato amónico, la expresión de *nifO* a partir de Tn5 es un orden de magnitud mayor que la expresión a partir del promotor silvestre.

La expresión constitutiva de *nifO* a partir del promotor de Tn5 podría ser la causa del comportamiento respecto a la nitrato y nitrito reductasa de los mutantes MV92, MV93 y MV94. Como se recordará en la tabla XI, página 112, en medios con nitrato, las actividades nitrato reductasa de estos mutantes son más bajas que la del silvestre, mientras

que las actividades nitrato reductasa están inalteradas. En medios con nitrato amónico, ambas actividades bajan hasta los niveles basales en los mutantes, mientras que las actividades de la cepa silvestre se reducen sólo hasta un tercio de las actividades inducidas.

3.3.6. Niveles de transcripción del promotor del operón *nasAB* en distintos fondos *nifO*

En el apartado anterior hemos visto que la alteración de la expresión de *nifO* influye siempre en los niveles de actividad nitrato reductasa, y en determinadas condiciones también en los niveles de actividad nitrato reductasa. Puesto que no se conoce, hasta el momento, ningún elemento estructural compartido por ambas reductasas, se esperaría que los cambios que afecten sólo a la actividad nitrato reductasa no estén relacionados con la expresión del operón *nasAB*, y los que afecten a los niveles de ambas puedan ser debidos a un cambio en el nivel de transcripción del operón *nasAB*. Para analizar esta cuestión se midió la actividad β -galactosidasa de una fusión transcripcional del gen *lacZ* con el promotor del operón *nasAB* en distintos fondos genéticos y en distintas fuentes de nitrógeno.

Se transformaron las estirpes MV92 y AS403 con ADN de pPN12, plásmido que lleva el indicador *lacZ* bajo el promotor del operón *nasAB*. Se seleccionó la resistencia a ampicilina del plásmido. Este plásmido no se replica en *Azotobacter* y por tanto la resistencia sólo puede conservarse tras un hecho de recombinación entre el ADN de la estirpe receptora y el ADN clonado en pPN12, dando lugar a una duplicación del promotor de *nasAB*. Por un lado se tiene el indicador *lacZ* bajo este promotor, y por otro, el operón silvestre. Posteriormente se comprobaron los marcadores de las estirpes receptoras, es decir, kanamicina en el caso de MV92 y espectinomicina en AS403. Los resultados se presentan en la tabla XIX. Se observa que en nitrato, la expresión en un fondo genético en el que *nifO* se expresa a partir del promotor de Tn5 es el mismo que en un fondo silvestre. En un fondo *nifO::\Omega* la expresión de *nasAB* se duplica. En nitrato amónico, la expresión de *nasAB*, en un fondo silvestre, se reduce unas dos veces y media. En el mutante *nifB::Tn5*, la expresión desciende hasta los niveles basales. Estos resultados concuerdan con las actividades nitrato y nitrato

Capítulo 3

reductasa de los mutantes MV92, MV93 y MV94. Sin embargo, en el mutante *nifO::Ω*, el aumento de la expresión de *nasAB* no se refleja en un aumento de la actividad nitrato reductasa.

Tabla XIX. Actividades β-galactosidasa de la fusión *nasAB-lacZ* en fondos genéticos alterados en la expresión de *nifO*

ESTIRPE	GENOTIPO	NO ₃ ⁻	NO ₃ NH ₄	NH ₄ ⁺
AS440	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i>	235.6	93.4	20.8
AS464	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i> , <i>nifB::Tn5</i>	244.2	15.9	12.8
AS465	Φ <i>nasA-lacZ</i> , <i>nasAB</i> , <i>nifO::Ω</i>	487.1	85.7	19.7

Actividad β-galactosidasa de distintas estirpes de *Azotobacter vinelandii* cultivadas durante 15 horas en medios con distintas fuentes de nitrógeno. Las actividades enzimáticas se expresan en unidades Miller

3.3.7. Discusión

Algunas nitrato reductasas pueden reducir el clorato a clorito, siendo, este último, tóxico para la célula (Piechaud *et al.*, 1969). Por tanto se pueden seleccionar mutantes que carecen de actividad nitrato reductasa por su capacidad de crecer en medios suplementados con este compuesto. Utilizando esta estrategia en medios con concentraciones de amonio a las cuales la estirpe silvestre no tiene totalmente reprimida la nitrato reductasa, y tras mutagénesis de la estirpe silvestre UW136 con Tn5, se aislaron tres mutantes, MV92, MV93 y MV94, afectados simultáneamente en la fijación de nitrógeno y en la asimilación de nitrato (Luque, 1987). Estas estirpes aún siendo Chl^r podían crecer en medio mínimo suplementado con nitrato como única fuente de nitrógeno, es decir, su resistencia a clorato era dependiente de la adición de amonio al medio. Este fenotipo se confirmó cuando se realizaron las medidas de sus actividades nitrato reductasa en distintas fuentes de N. Así, la actividad nitrato reductasa de los mutantes cuando crecían en presencia de nitrato

era inferior, aproximadamente un tercio, a la que presentaba la estirpe silvestre en estas condiciones, mientras que la actividad nitrito reductasa seguía siendo semejante en todos los fondos. El descenso más drástico, se midieron niveles basales de actividad nitrato reductasa, se observaba cuando los mutantes crecían en medio mínimo suplementado con NO_3NH_4 . En este medio también la actividad nitrito reductasa descendía hasta los niveles basales. Resumiendo, estos mutantes se comportaban como si fueran más sensibles que la estirpe silvestre a la represión por amonio.

Para comprobar si este fenotipo se debía a una o más regiones cromosómicas se aislaron los Tn5 de las estirpes MV92, MV93 y MV94. El resultado fue que todas las inserciones se encontraban en el mismo fragmento cromosómico *EcoRI*.

A partir de estos fragmentos mutantes se pudo aislar de una genoteca genómica de *A. vinelandii* construida en λ -GEM12 la región cromosómica silvestre. Comprobándose que dicha región coincidía con el operón *nifBQ* (Joerger y Bishop, 1988). Este operón está formado por cinco fases de lectura abierta, *nifB*, *fdxN*, *nifO*, *nifQ* y ORF5 (Joerger y Bishop, 1988; Rodríguez-Quñones *et al.*, 1993).

Para identificar que gen de este operón estaba implicado en el fenotipo de los mutantes MV92, MV93 y MV94 se construyeron nuevos mutantes con inserciones del cassette Ω en cada una de las fases de lectura abierta. Se comprobó que ninguna de las inserciones provocaba el fenotipo mutante esperado. Por tanto, la mutación en MV92, MV93 y MV93 no estaba causada por la ruptura de un gen del operón *nifBQ* sino por la expresión constitutiva de alguna de las fases de lectura abierta a partir de un promotor externo de Tn5. Este fenómeno fue descrito por Berg *et al.* (1980). Al estudiar la polaridad de las inserciones de Tn5 en el operón *lac* de *E. coli*, detectó dos tercios de mutaciones polares y un tercio en que hay expresión de los genes distales a partir de un promotor asociado al transposón. Este promotor se encuentra en una zona de 187 pb de ambos extremos de Tn5. La expresión constitutiva a partir de este promotor externo de Tn5 también ha sido observada en mutantes de *A. vinelandii* obtenidos por inserción con este transposón (Ramos, 1992; Ramos *et al.*, 1993). Para comprobar esta hipótesis y conocer qué gen del operón *nifBQ* era el responsable de este fenotipo se construyeron una serie de mutantes que tenían inserto Tn5 en *nifB*, y en consecuencia

debían de transcribir de forma constitutiva el resto del operón desde este hipotético promotor externo del transposón, pero además presentaban inserciones de Ω en cada uno de los genes que constituían el operón, consiguiendo la parada de la onda de transcripción en cada una de las ORFs. El fenotipo de hipersensibilidad a la represión por amonio sólo se observaba en aquellos mutantes en los que no se impedía la transcripción de *nifO* desde ese promotor externo. Esto unido al fenotipo de la estirpe AS407, *fdxN::Tn5-B21*, nos permitió concluir que el fenotipo de MV92, MV93 y MV94 se debía a la expresión constitutiva de *nifO*. La expresión constitutiva del promotor de Tn5 se demostró utilizando fusiones transcripcionales del gen de la β -galactosidasa en *nifO*, tabla XVIII.

No se conoce cual es la función de NIFO. Bosch *et al.* (1993) han propuesto que interviene en la metabolización/modificación del molibdeno para su incorporación a FeMo-co. Esta modificación podría dar lugar a una limitación del Mo disponible para la biosíntesis del Mo-co de la nitrato reductasa, por competencia entre ambas vías biosintéticas.

Es prematuro, con los resultados que disponemos, aventurar cómo se ejerce esa competencia entre ambas rutas. No obstante, los resultados del estudio de la expresión del operón *nasAB*, tabla XIX, y las medidas de actividad nitrato y nitrito reductasa en un fondo *nifO^c*, y en un fondo *nifO⁻*, tabla XVII, indican que NIFO interfiere (directa o, más probablemente, de un modo indirecto) tanto con la actividad nitrato reductasa como con la expresión de *nasAB*.

La interferencia con la actividad nitrato reductasa se puso de manifiesto en medio con nitrato, en los mutantes MV92, MV93 y MV94, en los que se reduce hasta tres veces, tabla XI. En este medio no hay interferencia con la expresión de *nasAB*, estirpe AS464, tabla XIX. La interferencia con la expresión de *nasAB* se manifestó en presencia de amonio, tabla XIX. En estas condiciones de cultivo, la expresión del operón *nasAB* en un fondo *nifO* silvestre se reduce poco más de la mitad. En cambio, en un fondo *nifO^c* se reduce del orden de diez veces. Esta es la razón por la que estos mutantes sólo resisten a clorato en presencia de amonio. Otro dato que indica que NIFO interfiere con la expresión de *nasAB* es el comportamiento de los mutantes *nifO⁻*, tabla XVII y XIX. En estas estirpes se duplica la expresión de *nasAB*, en nitrato. Esto se refleja en la actividad nitrato reductasa pero no en la actividad nitrito reductasa,

lo que podría explicarse por la existencia de algún factor limitante para la actividad enzimática de esta proteína, como, por ejemplo el sirohemo.

El efecto de NIFO sobre la regulación del operón *nasAB* puede indicar que el molibdeno, o un producto de su metabolización, tenga un papel regulador de la expresión de dicho operón. Existe un precedente, la nitrato reductasa respiratoria de *E. coli*, en el que se atribuye un papel inductor a un producto de la ruta de biosíntesis de Mo-co (Pascal *et al.*, 1982; Pascal y Chippaux, 1982; Iuchi y Lin, 1987; Kalman y Gunsalus, 1990).

Capítulo 4

3.4. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE GENES IMPLICADOS EN LA ASIMILACION DE NITRATO EN LA ESTIRPE HH103 DE *Rhizobium fredii*

Nos planteamos iniciar un estudio comparativo de la genética de la asimilación de nitrato entre *A. vinelandii* y otra bacteria del suelo. En nuestro Departamento existe una larga tradición en bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Elegimos *Rhizobium fredii* porque disponíamos de una genoteca apropiada (Romero, 1993). El aislamiento de genes implicados en la asimilación de nitrato se realizó por complementación de mutantes de *A. vinelandii* con una genoteca en pLAFR1 de la estirpe HH103.

3.4.1. Actividades nitrato y nitrito reductasa de la estirpe HH103 de *R. fredii*

Se han medido las actividades nitrato y nitrito reductasa de la estirpe HH103 en medio mínimo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno. Para ello se creció dicha cepa en medio rico TY hasta alcanzar 0.8 de densidad óptica a 560 nm. Los cultivos se lavaron dos veces en medio mínimo. Y por último, se incubaron en este medio suplementado con distintas fuentes de nitrógeno durante seis horas a 30°C en agitación. En la tabla XX se presentan las distintas actividades nitrato y nitrito reductasa. Se puede observar que la actividad nitrito reductasa es independiente de la fuente de nitrógeno, mientras que la actividad nitrato reductasa es inducible por nitrato pero no reprimible por amonio.

3.4.2. Complementación de mutantes de *A. vinelandii* afectados en la asimilación de nitrato

Con el objeto de aislar los genes implicados en la asimilación de nitrato de *R. fredii* se complementaron los mutantes AS30, AS36 y AS61 de *A. vinelandii*, afectados en los genes *nasA*, *nasB* y en la región *nasSR*, respectivamente, con una genoteca de la estirpe HH103.

Para ello se conjugó en masa la genoteca con cada uno de los

Tabla XX. Actividades nitrato y nitrito reductasa de la estirpe HH103 de *R. fredii* cultivada en distintas fuentes de nitrógeno

<u>Estirpe</u>	<u>Glutamato</u>		<u>NO₃⁻</u>		<u>NO₃NH₄</u>		<u>NH₄⁺</u>	
	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>
HH103	0.3	85.8	5.2	127.7	5.0	85.0	0.8	85.0

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 medio TY y se pasaron a medio mínimo con distintas fuentes de nitrógeno cultivándose 6 horas.

mutantes. Los transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo suplementado con nitrato como fuente de nitrógeno. Sólo se obtuvo complementación para la asimilación de nitrato, pero no para la fijación de nitrógeno, ya que todos los transconjugantes que crecían en nitrato no lo hacían en medio mínimo. Para poder analizar qué zonas cromosómicas estaban implicadas en la complementación de estas mutaciones, se aisló el ADN plasmídico de una serie de colonias que provenían de cada una de las complementaciones anteriores y se transformó a la estirpe 71-18 de *E. coli*. Del mapa de restricción de cada uno de los cósmidos aislados se concluyó que existen tres tipos de cósmidos que presentan zonas solapantes. A estos cósmidos se les denominó pMAS30.1, pMAS30.3 y pMAS36.1, figura 42. Los cósmidos pMAS30.3 y pMAS36.1 complementaban las mutaciones en *nasA*, *nasB* y en la región *nasSR*. Mientras que pMAS30.1 sólo complementaba para la reducción de nitrito y para la mutación en la región *nasSR*. Para delimitar qué regiones contenían los genes de *Rhizobium* implicados en la asimilación de nitrato se subclonaron los fragmentos *Bam*HI del cósmido pMAS30.3 en el plásmido pRK404. A estas construcciones se les denominaron pMAS30.14, pMAS30.15 y pMAS30.16. Se introdujeron por conjugación en las estirpes AS30, AS36 y AS61 de *A. vinelandii* desde la cepa 71-18 de *E. coli*. Se seleccionó el paso del plásmido en medio mínimo suplementado con amonio y tetraciclina. Posteriormente se comprobó el crecimiento de los transconjugantes en medio mínimo con nitrato, figura 42. Sólo el plásmido pMAS30.15 complementó al mutante AS61, afectado

en *nasSR*. Mientras que los otros dos plásmidos, pMAS30.14 y pMAS30.16, no pudieron complementar las mutaciones en la nitrato y nitrito reductasa de las estirpes AS36 y AS30, respectivamente. Por tanto, la región *nasSR* de *R. fredii* se encuentra en un fragmento *Bam*HI de 5.5 kb. El gen *nasA* de *R. fredii* presenta, probablemente, una diana *Bam*HI interna en el fragmento *Eco*RI de 4.2 kb, mientras que la posición del gen *nasB* no se pudo determinar.

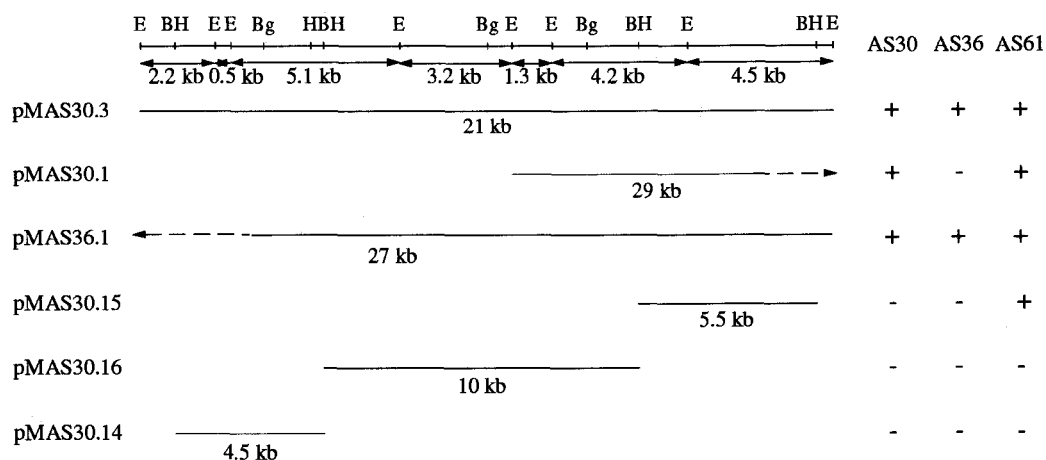


Figura 42. Esquema de los cósmidos que complementaron a los mutantes de *A. vinelandii* afectados en al asimilación de nitrato y de las subclonaciones que se hicieron del cósmido pMAS30.3

3.4.3. Actividades nitrato y nitrito reductasa de los mutantes de *A. vinelandii* complementados con el cósmido pMAS30.3

Se midieron las actividades nitrato y nitrito reductasa de los mutantes de *A. vinelandii* afectados en *nasA*, *nasB* y en *nasSR*, complementados con pMAS30.3 en presencia de distintas fuentes de N. Para ello se introdujo dicho cósmido por conjugación desde *E. coli* a las estirpes UW136, silvestre, AS236, AS237 y AS238, versiones Nif⁺ de las cepas AS30, AS36 y AS61, respectivamente. Los transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo suplementado con tetraciclina. Los resultados se presentan en la tabla XXI.

Los datos de las actividades nitrato y nitrito reductasa confirmaron los resultados de crecimiento de los mutantes complementados con el cósmido pMAS30.3. Se observa que en presencia

Capítulo 4

del cósmido pMAS30.3, las actividades nitrato y nitrito reductasa son independientes de la fuente de nitrógeno.

Tabla XXI. Actividades enzimáticas de las estirpes UW136/pMAS30.3, AS236/pMAS30.3, AS237/pMAS30.3 y AS238/pMAS30.3

<u>Estirpes</u>	<u>- N</u>		<u>NO₃⁻</u>		<u>NH₄⁺</u>	
	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>
UW136	0.5	1.8	12.4	26.4	0.4	2.2
UW136/pMAS30.3	8.3	41.0	9.4	33.7	8.9	34.5
AS236	0.4	0.5	8.0	2.0	0.4	0.8
AS236/pMAS30.3	7.9	43.8	8.1	32.5	10.8	30.5
AS237	0.2	24.4	0.1	26.9	0.1	2.4
AS237/pMAS30.3	7.6	42.8	9.1	41.6	8.0	30.6
AS238	0.1	1.5	0.2	1.2	0.2	1.0
AS238/pMAS30.3	12.7	42.3	15.0	38.5	15.8	37.7

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 tetraciclina y se pasaron a medios con distintas fuentes de nitrógeno durante 15 horas.

3.4.4. Identificación de un operón implicado en la reducción de nitrato en *R. fredii*

Como se ha podido comprobar en el apartado 3.4.2, el cósmido pMAS30.1 no complementa para la reducción de nitrato. Esto puede ser debido a que el gen *nasB* está en la zona no solapante de los tres cósmidos, o bien que dicho gen se encuentre en la región solapante pero que presente una diana *EcoRI* interna.

Con objeto de localizar el gen *nasB* se subclonó el fragmento *EcoRI* de 3.2 kb del cósmido pMAS30.3, que se encuentra en la zona no

solapante, en pTZ19R. El plásmido resultante se denominó pMAS3.2. A continuación, se insertó el cassette Ω en la diana de restricción *Bgl*III, dando lugar al plásmido pMAS3.2 Ω . La estrategia seguida y la localización de la inserción se describe en la figura 43.

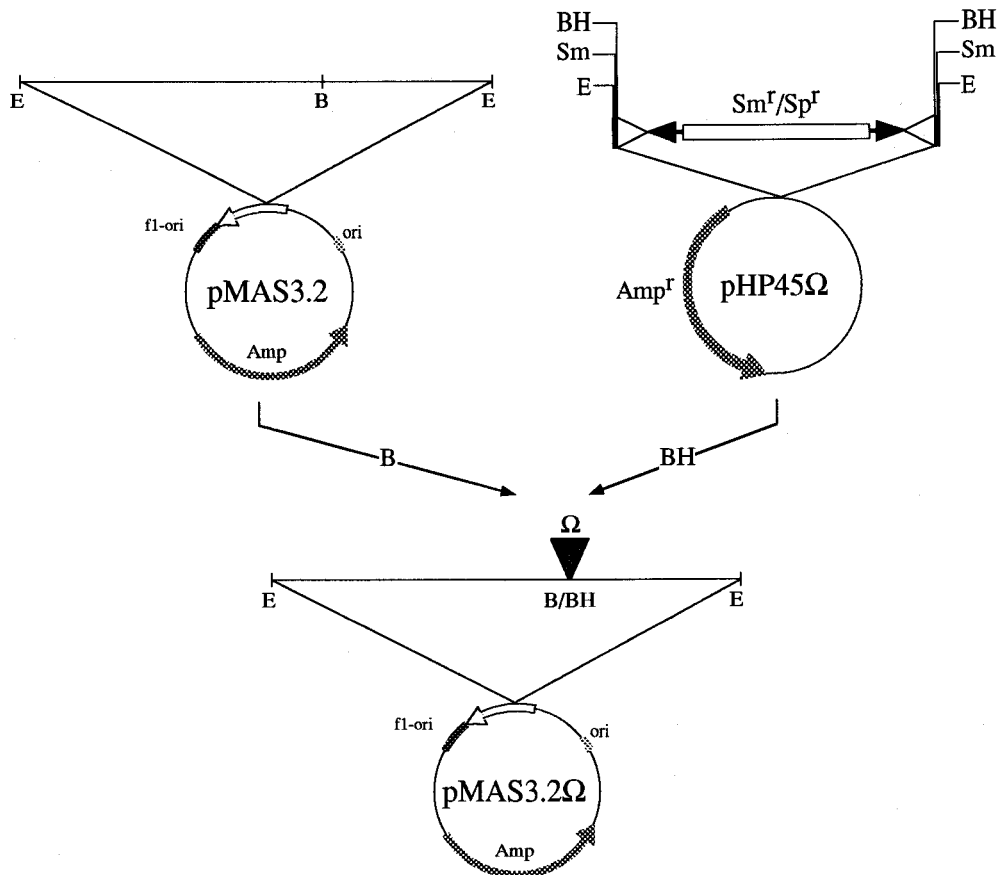


Figura 43. Estrategia seguida para obtener una inserción del cassette Ω que afecte al gen *nasB* de *R. fredii*

Para comprobar si la inserción afectaba ciertamente al gen *nasB*, la construcción anterior con el cassette Ω se introdujo en el cósmido pMAS30.3 por recombinación homóloga en *E. coli*. Esto se realizó transformando la cepa C600 de *E. coli* con el cósmido pMAS30.3, seleccionando los transconjugantes tetraciclina resistentes. Posteriormente, se transformó la estirpe C600/pMAS30.3 con el plásmido pMAS3.2 Ω seleccionando el nuevo plásmido mediante la resistencia a ampicilina. Por último se obtuvo el plásmido recombinante, cósmido con la inserción Ω , transfiriendo los marcadores tetraciclina, resistencia de pMAS30.3, y la espectinomicina, cassette Ω , a la estirpe DH5 α y

Capítulo 4

eligiendo los ampicilina sensibles, a la nueva construcción se le denominó pMAS30.32 Ω .

El plásmido pMAS30.32 Ω se introdujo por conjugación en las estirpes UW136, AS236, AS237 y AS238 de *A. vinelandii*. Se midieron las actividades nitrato y nitrito reductasa en distintas fuentes de nitrógeno. Los resultados se muestran en la tabla XXII.

Tabla XXII. Actividades enzimáticas de las estirpes UW136/pMAS30.32 Ω , AS236/pMAS30.32 Ω , AS237/pMAS30.32 Ω y AS238/pMAS30.32 Ω

<u>Estirpes</u>	<u>-N</u>		<u>NO₃⁻</u>		<u>NH₄⁺</u>	
	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>
UW136/pMAS30.32 Ω	2.6	50.0	7.5	37.7	4.4	30.4
AS236/pMAS30.32 Ω	2.0	54.0	5.0	37.1	3.7	23.4
AS237/pMAS30.32 Ω	0.4	40.8	0.5	38.2	0.3	21.5
AS238/pMAS30.32 Ω	3.3	45.6	7.2	41.6	5.3	23.8

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 tetraciclina y se pasaron a medios con distintas fuentes de nitrógeno durante 15 horas.

Se observa que las actividades nitrito reductasa siguen siendo independientes de la fuente de nitrógeno en todos los fondos genéticos como ocurría con el cósmido pMAS30.3, tabla XXI, mientras que las actividades nitrato reductasa bajan en todos los casos. La estirpe AS237/pMAS30.32 Ω no presenta actividad nitrato reductasa. Por lo que se concluye que el gen *nasB* no está, o al menos no está completo, en la zona solapante de los tres cósmidos sino, probablemente, en una región cromosómica que incluiría el fragmento *EcoRI* de 3.2 kb adyacente al fragmento *EcoRI* de 1.3 kb del cósmido pMAS30.1.

Para localizar la nitrito reductasa se siguió la misma estrategia que para localizar la nitrato reductasa. Se clonó el cassette Ω en el punto de restricción *BamHI* del fragmento *EcoRI* de 4.2 kb del cósmido pMAS30.3, subclonado previamente en pMAS4.2. El plásmido resultante

se le denominó pMAS4.2 Ω . En la figura 44 se presenta un esquema de la estrategia seguida. El fragmento *Eco*RI con la inserción del cassette Ω se introdujo en el cósmido pMAS30.3 por recombinación homóloga en *E. coli*, a este plásmido se le denominó pMAS30.42 Ω .

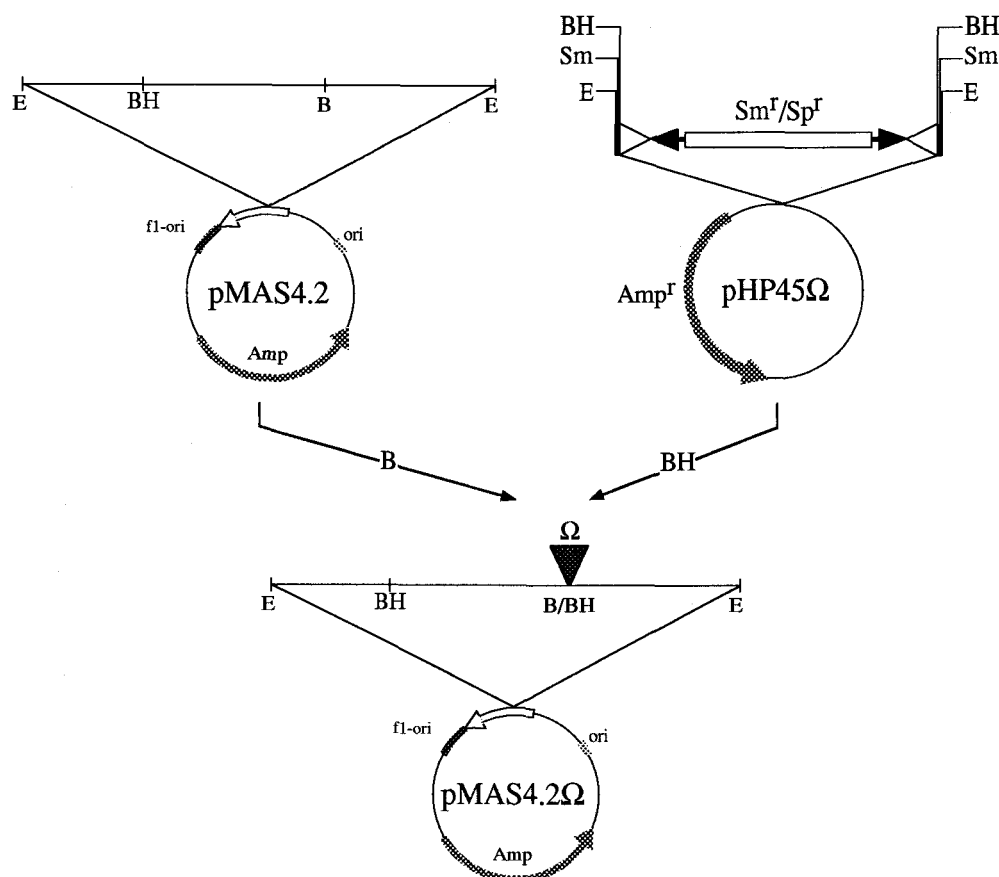


Figura 44. Estrategia seguida para obtener una inserción del cassette Ω que afecte al gen *nasA* de *R. fredii*

El plásmido pMAS30.42 Ω se transfirió por conjugación a las estirpes UW136, AS236, AS237 y AS238 de *A. vinelandii*. Se midieron las actividades nitrato y nitrito reductasa en distintas fuentes de nitrógeno. Los resultados se muestran en la tabla XXIII.

La estirpe AS236/pMAS30.42 Ω no tiene actividad nitrito reductasa, por lo que se deduce que el gen de la nitrito reductasa, *nasA* de *R. fredii*, tiene una diana de restricción *Bam*HI dentro del fragmento *Eco*RI de 4.2 kb del cósmido pMAS30.3. La estirpe AS237//pMAS30.42 Ω

Tabla XXIII. Actividades enzimáticas de las estirpes UW136/pMAS30.42Ω, AS236/pMAS30.42Ω, AS237/pMAS30.42Ω y AS238/pMAS30.42Ω

<u>Estirpes</u>	<u>-N</u>		<u>NO₃⁻</u>		<u>NH₄⁺</u>	
	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>	<u>NAS</u>	<u>NIS</u>
UW136/pMAS30.42Ω	6.1	18.6	10.5	15.7	5.2	8.14
AS236/pMAS30.42Ω	7.5	0.6	6.3	0.8	6.5	0.4
AS237/pMAS30.42Ω	0.6	23.5	0.7	17.7	0.8	10.1
AS238/pMAS30.42Ω	5.7	22.7	8.8	19.2	5.4	11.6

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 tetraciclina y se pasaron a medios con distintas fuentes de nitrógeno y cultivándose durante 15 horas.

tiene unos niveles de nitrito reductasa similares a la cepa UW136/pMAS30.42Ω y no tiene actividad nitrato reductasa. De estos resultados se deduce que los niveles de nitrito reductasa observados en estas estirpes corresponden al enzima de *A. vinelandii* y, lo que es más importante, que el gen de la nitrito reductasa de *R. fredii* forma parte del mismo operón que el de la nitrato reductasa, *nasB*. La polaridad de la inserción Ω en *nasA* sobre *nasB* indica que la organización de los genes *nasA* y *nasB* de *R. fredii* es la misma que la de *A. vinelandii*, *pnasAB*.

3.4.5. Construcción de mutantes de *R. fredii* en los genes *nasA* y *nasB*

Se decidió utilizar los genes *sacB-sacR* de *B. subtilis* para poder seleccionar el intercambio de marcadores por recombinación homóloga de los fragmentos clonados en los plásmidos pMAS3.2Ω y pMAS4.2Ω sobre la estirpe silvestre HH103. Esta herramienta genética sirve para conferir sensibilidad a la sacarosa en las bacterias Gram negativas. Si se clonan estos genes en el vector donde se tiene el fragmento que se quiere sustituir y se cultivan las bacterias en sacarosa y en el marcador

correspondiente, se seleccionará el doble hecho de recombinación, ya que cualquier otra alternativa resultaría inviable.

Así pues, en primer lugar se clonaron los genes *sacB-sacR* en el vector pMP092, a este plásmido se le denominó pMAS39. Posteriormente, se clonaron los fragmentos *EcoRI* que tenían las inserciones del cassette Ω en este plásmido. De esta manera se consiguieron los plásmidos pMAS39.32 Ω y el pMAS39.42 Ω . La estrategia seguida se presenta en las figuras 45 y 46.

El siguiente paso fue integrar los fragmentos por recombinación homóloga en la estirpe HH103 de *R. fredii*. Se transfirieron los plásmidos pMAS39.32 Ω y el pMAS39.42 Ω por conjugación a esta cepa y se seleccionaron transconjugantes en medio TY con espectinomicina, ácido nalidíxico, para contraseleccionar *E. coli*, y tetraciclina. Las estirpes HH103/pMAS39.32 Ω y HH103/pMAS39.42 Ω se sembraron en medio TY con sacarosa, al 12%, y espectinomicina. Tras comprobar los marcadores de las colonias que habían crecido en este medio, se contabilizaron 59 en un caso y 60 en el otro, respectivamente, que eran tetraciclina sensibles, habían perdido el plásmido, y kanamicina sensibles, que habían perdido el cassette "sac-km". Nos quedamos con una colonia de cada una de las sustituciones de la copia silvestre por la mutante. A la estirpe con el cassette Ω insertado en el gen *nasA* se le denominó RS1 y RS2 a la que lleva la inserción que afecta al gen *nasB*. Esta estirpes se comprobaron por hibridación, figura 47 y 48.

A continuación, se midieron las actividades nitrato y nitrito reductasa de las estirpes HH103, RS1 y RS2 en medio mínimo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno. Para ello se crecieron dichas cepas en medio rico TY hasta alcanzar el final de la fase exponencial. Los cultivos se lavaron dos veces en medio mínimo. Y por último, se incubaron en medio mínimo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno durante seis horas en agitación a 30°C. En la tabla XXIV se presentan las distintas actividades nitrato y nitrito reductasa. Se puede observar que la estirpe RS1, que tiene una inserción del cassette Ω en el gen *nasA*, sigue aún presentando actividad nitrato reductasa, que por polaridad no debería de tener, y nitrito reductasa. El mutante RS2, que tiene la inserción que afecta al gen *nasB*, también sigue teniendo actividad

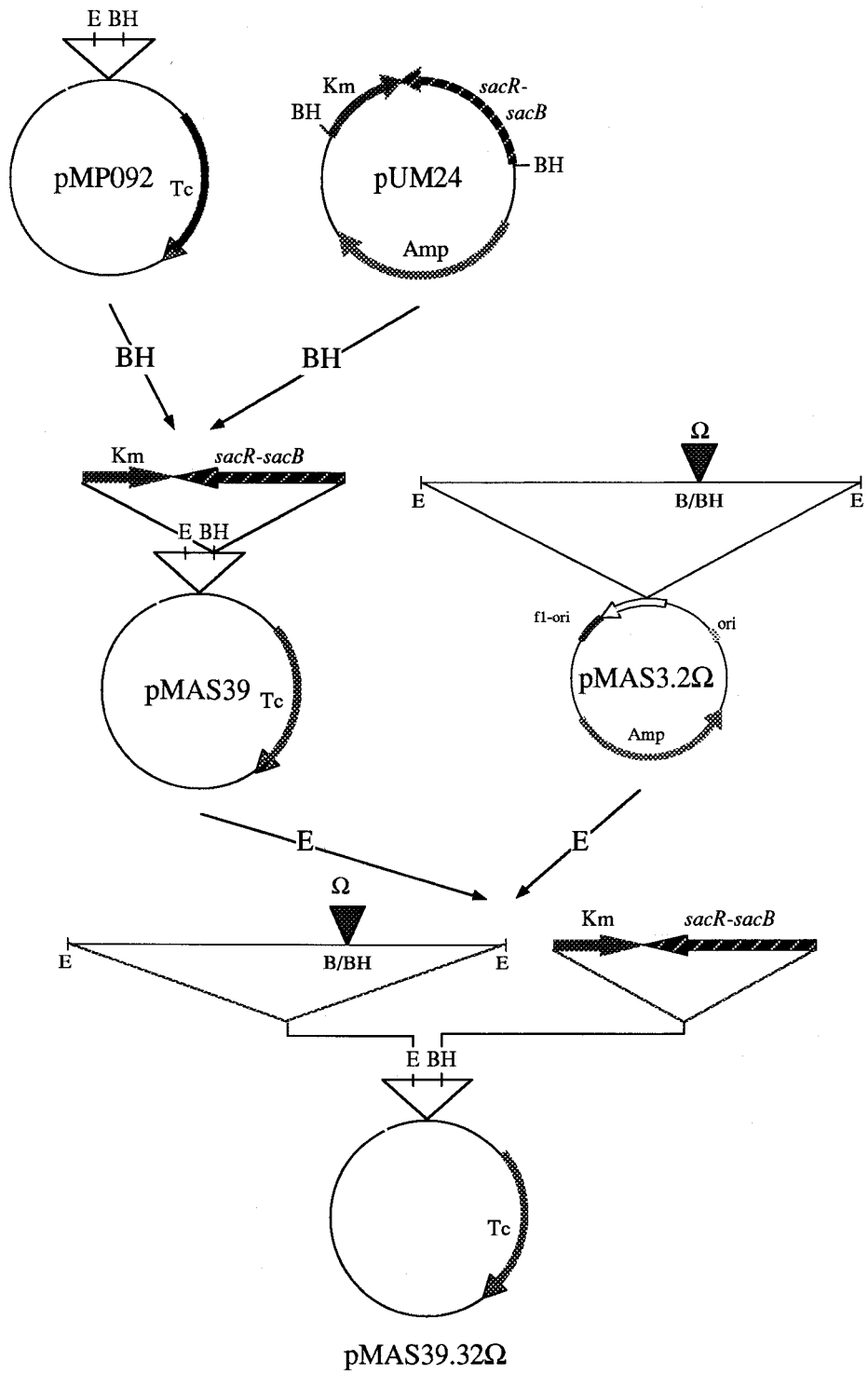


Figura 45. Esquema de la construcción del plásmido pMAS39.32Ω

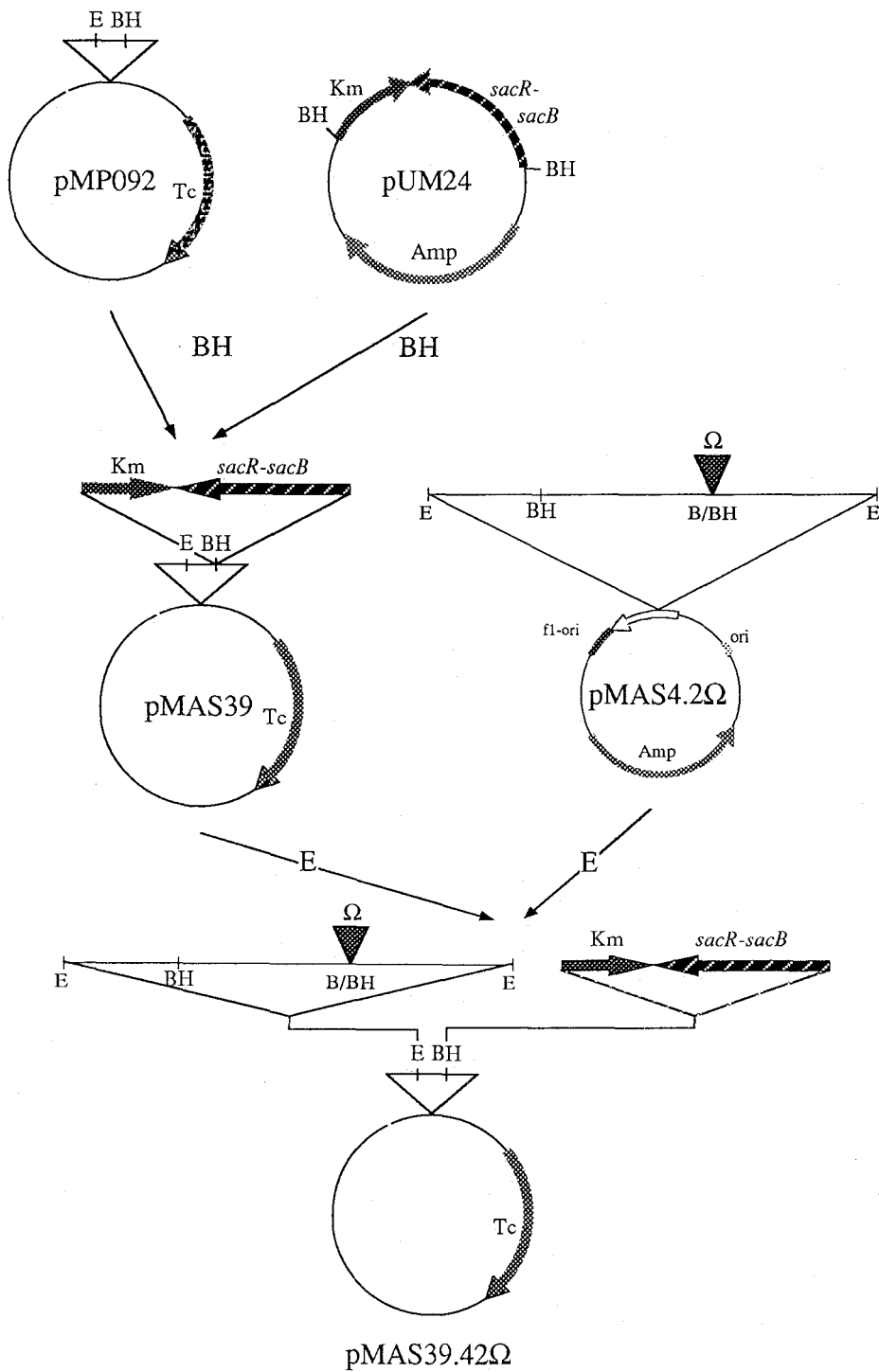


Figura 46. Esquema de la construcción del plásmido pMAS39.42Ω

1 2 3 4



Figura 47. Hibridación de la sonda de 3.2 kb del plásmido pMAS3.2 frente al ADN cromosómico de las estirpes HH103 (carril 3) y RS1 (carril 2), el plásmido pMAS3.2 (carril 1) cortados con *EcoRI*; ADN de λ cortado con *HindII* (carril 4).

1 2 3 4

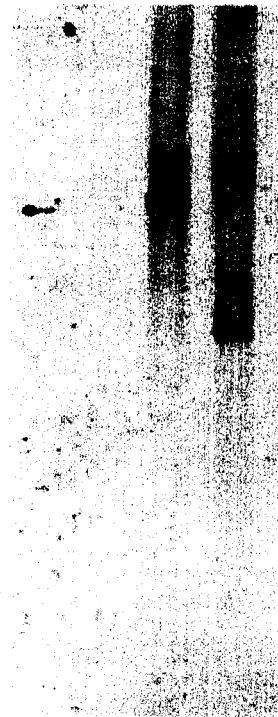


Figura 48. Hibridación de la sonda de 4.2 kb del plásmido pMAS4.2 frente al ADN cromosómico de las estirpes HH103 (carril 4) y RS1 (carril 3), el plásmido pMAS3.2 (carril 1) cortados con *EcoRI*; ADN de λ cortado con *HindII* (carril 2).

nitrito reductasa. Por tanto, en *R. fredii* deben de existir más de una nitrito reductasa y una nitrito reductasa.

3.4.6. Clonación del promotor del operón *nasAB* de *R. fredii*

Debido a la existencia en *R. fredii* de más de una nitrito reductasa y nitrito reductasa, para el estudio de la regulación del operón *nasAB* recurrimos a medir los niveles de un indicador distinto de las actividades nitrito reductasa y nitrito reductasa. Para ello, se clonó el promotor de dicho operón en el plásmido pMP220, derivado de pMP092, tetraciclina resistente, IncP, de bajo número de copias y que contiene el indicador *lacZ*, delante del cual hay una región de múltiples dianas para la clonación.

Tabla XXIV. Actividades nitrato y nitrito reductasa de las estirpes HH103, RS1 y RS2 de *R. fredii* cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno

Estirpe	Glutamato		NO₃⁻		NO₃NH₄		NH₄⁺	
	NAS	NIS	NAS	NIS	NAS	NIS	NAS	NIS
HH103	0.8	89.7	6.5	120.9	5.7	87.9	0.9	88.6
RS1	0.5	98.1	59.2	116.6	2.2	104.2	1.5	69.1
RS2	0.7	95.2	71.3	109.2	3.8	83.8	1.7	87.6

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 medio TY y se pasaron a medio mínimo con distintas fuentes de nitrógeno cultivándose 6 horas.

Por los experimentos de complementación y de inserción con el cassette Ω se conocía la localización aproximada y la orientación del promotor del operón *nasAB*. Este se encuentra en el fragmento *Bam*HI-*Eco*RI de 1.5 kb del plásmido pMAS30.15. Dicha región se clonó entre las dianas *Bgl*II y *Eco*RI del vector pMP220, construcción que se denominó pPNR2. En esta construcción, la región promotora está en la orientación inversa a la de transcripción del indicador *lacZ*. Para cambiar el sentido del promotor, el plásmido pPNR2 se cortó con *Hind*III y se volvió a ligar, el plásmido obtenido se denominó pPNR2R, figura 49.

3.4.7. Expresión de la fusión del promotor *nasAB* en las estirpes HH103 y RS2 de *R. fredii*

El plásmido pPNR2R se transfirió por conjugación desde *E. coli* a las estirpes HH103 y RS2 de *R. fredii*. Las cepas HH103/pPNR2R y RS2/pPNR2R se cultivaron en medio rico TY hasta alcanzar una densidad óptica a 560 nm de 0.8. Se lavaron dos veces en medio mínimo y se crecieron en medio mínimo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno. Se midieron las actividades β -galactosidasa que se muestran en

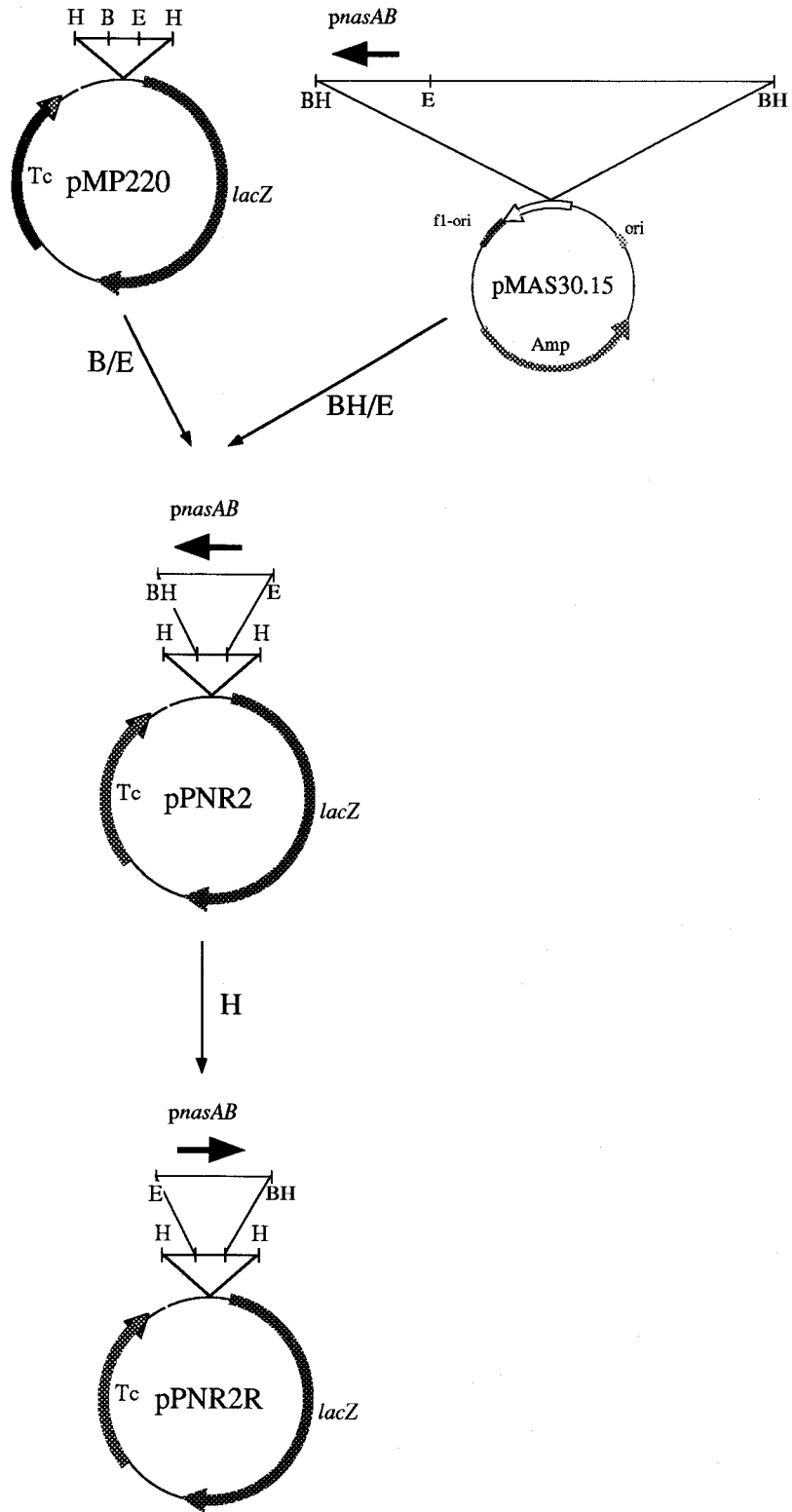


Figura 49. Esquema de la construcción de una fusión *lacZ* en el promotor del operón *nasAB* de *R. fredii*

la tabla XXV. Se puede observar que tanto la estirpe silvestre como el mutante RS2 se comportan igual en todos los medios. Según estos datos, el operón *nasAB* de *R. fredii* no es inducible por nitrato ni por nitrito, ya que se expresa en ausencia de ambos. En medios con nitrato amónico o amonio no hay transcripción de *nasAB*. Por tanto, se trata de un operón reprimible por amonio. La regulación parece diferente de la del operón *nasAB* de *A. vinelandii*. Estos resultados no concuerdan con los datos de actividades nitrato y nitrito reductasa de la estirpe HH103. En las tablas XX y XXIV, se vió que la actividad nitrito reductasa era independiente de la fuente de nitrógeno, y que la actividad nitrato reductasa era inducible por nitrato pero no reprimible por amonio.

Tabla XXV. Actividades β -galactosidasa de la fusión en el operón *nasAB-lacZ* en los fondos genéticos silvestre y *nasB::\Omega*

ESTIRPE	GLUTAMATO	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ NH ₄	NH ₄ ⁺
HH103/pPNR2R	8917.2	7535.1	4419.6	144.7	174.8
RS2/pPNR2R	7123.7	5443.7	3532.6	169.5	173.8

Las actividades se midieron en cultivos que habían sido incubados en medio rico TY hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8. Posteriormente se les pasó a medio mínimo suplementado con distintas fuente de nitrógeno y se dejaron en agitación durante 6 horas para inducir el promotor del operón *nasAB*.

Las actividades β -galactosidasa se expresan en unidades Miller.

3.4.8. Discusión

Las bacterias del género *Rhizobium* son muy versátiles en cuanto a la utilización de nitrato. En condiciones aeróbicas pueden asimilarlo. Además, en microaerobiosis, pueden asimilarlo y, de forma simultánea, utilizarlo en sustitución del oxígeno como aceptor final de la cadena de transporte de electrones y reducirlo hasta la forma de óxidos de nitrógeno e incluso nitrógeno molecular. La desnitrificación se ha demostrado tanto en células de vida libre como en bacteroides (Daniel *et al.*, 1980).

Los niveles de oxígeno parecen tener una influencia determinante en la expresión del sistema desnitrificante en *Rhizobium*, más aún que la

propia presencia de nitrato (Daniel y Gray, 1976), si bien, ambos, nitrato y bajas tensiones de oxígeno, parecen ser requeridas en la expresión de la nitrato reductasa (Daniel y Appleby, 1972). La óxido nitroso reductasa también se expresa a bajas concentraciones de oxígeno en ausencia de nitrato o nitrito (Matsubara, 1971; Payne *et al.*, 1971).

En *Bradyrhizobium japonicum* cultivado microaeróbicamente con nitrato se ha descrito la existencia de una enzima asociada a las membranas cuyo tamaño molecular, estimado mediante cromatografía de exclusión molecular, fue de 236 kDa (Delgado *et al.*, 1992). Sin embargo, mediante el empleo de geles de poliacrilamida se ha comprobado la existencia de dos nitratos reductasas asociadas a membrana, cuyos tamaños eran de 160 kDa (NR_I) y 200 kDa (NR_{II}). La actividad de ambas reductasas está sometida a un doble control e independiente: inhibición por oxígeno e inducción por microaerobiosis y por nitrato. La expresión de NR_I requiere condiciones de microaerobiosis, mientras que NR_{II} sólo se expresa en condiciones microaerobióticas y en presencia de nitrato (Fernández-López y Bedmar, 1993).

La enzima NR_I (160 kDa) está compuesta por tres subunidades de tamaño molecular relativo 116 kDa, 68 kDa y 56 kDa. La enzima NR_{II} (200 kDa) se disocia, durante el proceso de purificación, en dos formas activas de 160 kDa y 120 kDa, que pueden, a su vez, separarse mediante electrolución. Cada forma activa de la enzima NR_{II} está constituida por cuatro subunidades de tamaños moleculares de 116 kDa, 68 kDa, 59 kDa y 56 kDa y las dos presentan idéntico perfil peptídico después de tratarlas con tripsina, por lo que pueden considerarse como dos isoformas activas de la enzima NR_{II} (Fernández-López y Bedmar, 1993).

Por complementación con una genoteca de la estirpe HH103 de *R. fredii* de mutantes de *A. vinelandii* afectados en el gen estructural de la nitrito reductasa, *nasA*; en el gen estructural de la nitrato reductasa, *nasB*; o en la región reguladora *nasSR*, se han aislado tres cósmidos, dos de los cuales contienen los genes equivalentes *nasA*, *nASB* y *nasSR* de *R. fredii* y un tercero sólo *nasA* y *nasSR*, tabla XXI y figura 42.

La región *nasSR* de *R. fredii* está contenida en un fragmento *Bam*HI de 5.5 kb. El tamaño de la región que contiene los genes *nasA* y *nasB* no se ha delimitado.

Los resultados obtenidos con los mutantes de inserción del cassette Ω , indican que, al igual que en *A. vinelandii*, los genes *nasA* y *nasB* de *R. fredii* forman parte de un mismo operón, en el que *nasA* está por delante de *nasB*, tablas XXII y XXIII.

En la tabla XXIII se observa que la inserción de Ω en el plásmido pMAS30.3, anula la capacidad de complementar tanto al mutante en la nitrato reductasa, AS237, como al mutante en la nitrito reductasa, AS236, de *A. vinelandii*. Por lo tanto, la actividad nitrato reductasa de la estirpe AS236/pMAS30.42 Ω , la actividad nitrito reductasa de AS237/pMAS30.42 Ω y la de ambas reductasas de las cepas UW136/pMAS30.42 Ω y AS238/pMAS30.42 Ω corresponden a las enzimas de *A. vinelandii*. El hecho de que estén desreguladas, aparecen tanto en nitrógeno como en amonio, se podría atribuir a la presencia de los genes *nasSR* de *R. fredii*, que también van en el plásmido pMAS30.42 Ω . Es posible que los niveles de expresión de los genes *nasSR* de *R. fredii* sean más elevados que los de *A. vinelandii* y se produzca el mismo fenómeno que se describió en el apartado 3.2 al expresar *nasR* desde un promotor fuerte como el de la kanamicina del cassette KIXX. El efecto de *nasSR* de *R. fredii* sobre la expresión de *nasAB* de *A. vinelandii* se pone de manifiesto, una vez más, en los resultados de la tabla XXII. El plásmido pMAS30.32 Ω , que lleva una inserción de Ω en uno de las dianas *Bgl*/II del cósmido pMAS30.3, no complementa al mutante en la nitrato reductasa de *A. vinelandii*. Sin embargo, se observa actividad nitrato reductasa en nitrógeno y en amonio cuando dicho plásmido se transfirió a las cepas UW136, AS236 y AS238, actividad correspondiente necesariamente a la enzima de *Azotobacter*.

R. fredii debe tener más de una nitrato reductasa y de una reductasa de nitrito que se expresan en condiciones aeróbicas, puesto que los mutantes RS1 y RS2, que llevan una inserción que afecta a los genes *nasA* y *nasB*, respectivamente, conservan ambas actividades. Un dato sorprendente es que en dichos mutantes la actividad nitrato reductasa aumenta significativamente en comparación con la estirpe silvestre HH103, tabla XXIV. Este resultado puede indicar que la nitrato reductasa aislada, la codificada por el gen *nasB*, regula negativamente la expresión de otra nitrato reductasa.

No se tienen muchos datos sobre la genética de la asimilación de nitrato en *Rhizobium*. Los resultados preliminares que aquí se presentan

Capítulo 4

apuntan a que se trata de un sistema más complejo que en *A. vinelandii*. La presencia de más de una nitrato y nitrito reductasa complica el estudio de la regulación. Un ejemplo de ello son los resultados que se recogen en las tablas XX y XXV. La actividad nitrato reductasa de la estirpe silvestre HH103 es inducible por nitrato y no se reprime por amonio, y la actividad nitrito reductasa es constitutiva, si bien en nitrato aumenta ligeramente, tabla XX. Sin embargo, cuando se analiza la expresión del promotor del operón *nasAB*, midiendo los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión pPNR2R, el operón parece reprimible por amonio y no requiere de nitrato para su expresión, tabla XXV. Serán necesarios más experimentos para aclarar esta aparente contradicción y contemplar la posibilidad de que en *Rhizobium* exista un control post-transcripcional del operón *nasAB*.

4. CONCLUSIONES

La estirpe AS61 de *A. vinelandii*, que carece de las dos actividades reductasas, se encuentra afectada en una región cromosómica denominada *nasR*, contenida en un fragmento *EcoRV-BglII* de 2210 pb. En dicho fragmento están presentes dos genes, *nasS* y *nasR*, que forman parte de la misma unidad transcripcional.

La expresión del promotor del operón *nasSR* de *A. vinelandii* es independiente de la fuente de nitrógeno. Siendo un promotor σ^{70} típico.

La expresión del promotor del operón *nasAB* de *A. vinelandii* es:

- a) Inducible por nitrato, nitrito y clorato.
- b) Reprimible por amonio.
- c) Dependiente de σ^{54} .
- d) Regulado positivamente por NTRC y NASR.
- e) Regulado negativamente por la propia nitrato reductasa.

La expresión constitutiva del gen *nifO* provoca un fenotipo de hipersensibilidad a la represión por amonio del operón *nasAB* de *A. vinelandii*. La proteína NIFO interfiere, además, con la actividad nitrato reductasa.

En *R. fredii* hay más de una nitrato reductasa y de una reductasa de nitrito que se expresan en aerobiosis.

Los genes *nasA* y *nasB* de *R. fredii*, aislados por complementación de mutantes de *A. vinelandii* afectados en la apoenzima de la nitrato reductasa o de la nitrito reductasa, forman parte de una misma unidad transcripcional en la que *nasA* se transcribe antes que *nasB*.

La actividad nitrato reductasa de *R. fredii* es inducible por nitrato y no es reprimible por amonio, y la actividad nitrito reductasa es constitutiva. Mientras que la expresión del promotor del operón *nasAB* es reprimible por amonio y no se requiere de nitrato para la inducción.

5. BIBLIOGRAFIA

- Abe, N., Y. Maruyama y K. Onodera**, 1990. Analysis of nitrogenase reaction using monoclonal antibodies against α -subunit of component I of *A. vinelandii*. En: Nitrogen Fixation Developments in Plant and Soil Sciences. Vol. 48, pp 37-42. Ed. M. Polsinelli, R. Materassi y M. Vincenzini. Kluwer Academic Publ.
- 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.
- Arnol, W., A. Rump, W. Klipp, U.B. Priefer y A. Pühler**, 1988. Nucleotide sequence of a 24.206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. J. Mol. Biol., **203**: 715-738.
- 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.
- 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.
- Berg, D.E., A. Weiss y L. Crossland**, 1980. Polarity of Tn5 insertion mutations in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **142**: 439-446.
- 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**: 4024-4029.

Bibliografía

- 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. y W.J. Brill**, 1977. Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutants strains unable to fix nitrogen. *J. Bacteriol.*, **130**: 954-956.
- Bishop, P.E., F.B. Dazzo, E.R. Appelbaum, R.J. Maier y W.J. Brill**, 1977a. Intergeneric transfer of genes involved in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Science*, **198**: 938-940.
- 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., D.M.L. Jarlenski y D.R. Hetherington**, 1980. Evidence for alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 7342-7346.
- Bishop, P.E., M.E. Hawins y R.R. Eady**, 1986a. N₂-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., J.C. Gutiérrez, F. Ramos y M. Tortolero**, 1991a. Isolation and characterization of R-primes of *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **80**: 213-216.

- 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., M. Drummond, P. Woodley y C. Kennedy**, 1993. Sequence and molecular analysis of the *nifL* gene of *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.*, **8**: 869-879.
- 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 α and β 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.
- Bosch, R., F. Rodríguez-Quiñones y J. Imperial**, 1993. El gen *nifO* de *Azotobacter vinelandii* es necesario para la fijación de nitrógeno en presencia de nitrato. VI Reunión Nacional de fijación de nitrógeno. Santa Cruz de Tenerife. España.
- Bothe, H. y K.P. Häger**, 1981. Electron transport to assimilatory nitrate reductase in *Azotobacter vinelandii*. *Z. Naturforsch.*, **36**: 1030-1035.
- Brigle, K.E., M.C. Weiss, W.E. Newton D.R. Dean**, 1987. Products of the iron-molybdenum cofactor-specific biosynthetic genes, *nifE* and *nifN*, are structurally homologous to the products of

Bibliografía

- the nitrogenase molybdenum-iron protein genes, *nifD* and *nifK*. J. Bacteriol., **169**: 1547-1553.
- Burris, R.H., D.J. Arp, D.R. Benson, D.W. Emerich, R.V. Hageman, T. Ljones, P.W. Ludden y W.J. Sweet, 1980.** The biochemistry of nitrogenase. En: Nitrogen Fixation. W.D.P. Stewart y J.R. Gallon (Eds). Academic Press.
- Cali, B.M., J.L. Micca y V. Stewart, 1989.** Genetic regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5al. J. Bacteriol., **171**: 2666-2672.
- Candau, P, 1979.** Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- 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 modificaton. J. Bacteriol., **154**: 387-394.
- Chisnell, J.R., R. Premakumar y P.E. Bishop, 1988.** Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., **170**: 27-33.
- 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 de Vera, A, 1986.** Análisis genético con transposones en *Azotobacter vinelandii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- 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 encode 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.

Cove, D.J., 1976. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*. Study of mutants altered in nitrate assimilation. Mol. Gen. Genet., **145**: 147-159.

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

Daniel, R.M. y C.A. Appleby, 1972. Anaerobic-nitrate, symbiotic and aerobic growth of *Rhizobium japonicum*: effects of cytochrome P-450, other haemproteins, nitrate and nitrite reductases. Biochim. Biophys. Acta, **275**: 347-354.

Daniel, R.M. y J. Gray, 1976. Nitrate reductase from anaerobically grown *Rhizobium japonicum*. J. Gen. Microbiol., **96**: 247-251.

Daniel, R.M., I.M. Smith, J.A.D. Phillip, H.D. Ratcliffe, J.W. Drozd y A.T. Bull, 1980. Anaerobic growth and denitrification by *Rhizobium japonicum* and other rhizobia. J. Gen. Microbiol., **120**: 517-521.

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.

Delgado, M.J., J. Olivares y E.J. Bedmar, 1992. Constitutive and nitrate-induced, membrane-bound nitrate reductase from *Bradyrhizobium japonicum*. Curr. Microbiol., **24**: 121-124.

Devereaux, J., P. Haeberli y O. Smithies, 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res., **12**: 387-395.

Doran, J.L. y W.J. Page, 1983. Heat sensitivity of *Azotobacter vinelandii* genetic transformation. J. Bacteriol., **155**: 159-168.

Bibliografía

- 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.
- 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.
- 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-López, M. y E.J. Bedmar,** 1993. Metabolismo del nitrato en microorganismos fijadores de dinitrógeno: Respiración del nitrato en *Bradyrhizobium japonicum*. VI Reunión nacional de fijación de nitrógeno. Sta. Cruz de Tenerife.
- Fisher, R.J. y W.J. Brill,** 1969. Mutants of *Azotobacter vinelandii* unable to fix nitrogen. Biochim. Biophys. Acta, **184**: 99-105.
- 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.
- Fu, Y.H. y G.A. Marzluf,** 1988. Metabolic control and autogenous regulation of *nit-3*, the nitrate reductase structural gene of *Neurospora crassa*. J. Bacteriol., **170**: 4067-4070.
- 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.
- Garland, P.B., J.A. Downie y B.A. Haddock,** 1975. Proton translocation and the respiratory nitrate reductase of *Escherichia coli*. Biochem. J., **152**: 547-559.

- Glick, B.R., H.E. Brooks y J.J. Pasternak, 1985.** Transformation of *Azotobacter vinelandii* with plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, **162**: 276-279.
- Goldman, Engelman y Steiz, 1986.** *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **15**: 321-353.
- González-López, 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.
- 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.
- Guerrero, M.G., J. M. Vega y M. Losada, 1981.** The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **32**: 169-204.
- Gussin, G.N., C.W. Ronson y F.M. Ausubel, 1986.** Regulation of nitrogen fixation genes. *Ann. Rev. Genet.*, **20**: 567-591.
- Hageman, R.V. y R.N. Burris, 1978.** Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 2699-2702.
- 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.
- Hattori, A, 1962.** Adaptative formation of nitrate reducing system in *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.*, **3**: 371-377.

Bibliografía

- 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 N₂-fixation in the rhizosphere of sugarcane planted under semi-arid conditions of Egypt. *Per. Ecol. Biol. Sci.*, **16**: 23-37.
- Hemschemeier, S., M. Grund, B. Keuntje y R. Eichenlaub, 1991.** Isolation of *Escherichia coli* mutants defective uptake of molybdate. *J. Bacteriol.*, **173**: 6499-6506.
- 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.
- Herrero, A. y M.G. Guerrero, 1986.** Regulation of nitrite reductase in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 2463-2468.
- 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.
- 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-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.
- Jacobson, M.R., K.E. Bribble, L.T. Bennett, R.A. Setterquist, M.S. Wilson, V. L. Cash, J. Beynon, W.E. Newton y D.R. Dean, 1989.** Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **171**: 1017-1027.
- 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.
- 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., M.R. Jacobson y P.E. Bishop, 1989.** Two *nifA*-like genes required for expression of alternative nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **171**: 1075-1086.
- Johann, S. y SM. Hinton, 1987.** Cloning and nucleotide sequence of the *chID* locus. *J. Bacteriol.*, **169**: 1911-1916.
- 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.

Bibliografía

- 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., 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.
- Kennedy, C. y A. Toukdarian**, 1987. Genetics of Azotobacters: Applications to nitrogen fixation and related of metabolism. Ann. Rev. Microbiol., **41**: 227-258.
- Kuhlemeier, C.J, T. Logtenberg, W. Stoorvogel, H.A.A. Heugten, W.E. Borrias y G.A. van Arkel**, 1984a. Cloning of nitrate reductase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. J. Bacteriol., **159**: 36-41.
- Kuhlemeier, C.J., W.J.P. Teeuwesen, M.J.T. Janssen y G.A. van Arkel**, 1984b. Cloning of a third nitrate reductase gene from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 using a shuttle gene library. Gene, **31**: 109-116.
- Kyte, J. y R.F. Doolittle**, 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol., **157**: 105-132.
- Liang, J., L. Scappino y R. Haselkorn**, 1992. The *patA* gene product, which contains a region similar to CheY of *Escherichia coli*, controls heterocyst pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**: 5655-5659.
- 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.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- 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 amoniaco. 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.

Bibliografía

- 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., 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* nitrogenase from oxygen damage. En Nitrogen Fixation. Proceedings of the 9th international congress on nitrogen fixation, p 34. 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.
- 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.

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. Ana. Biochem., **87**; 207-210.

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.

Matsubara, T., 1971. Studies on denitrification .XIII. Some properties of the N₂O-anaerobically grow cell. J. Biochem., **69**: 991-1001.

McInerney, M.J., K.S. Holme, P. Hoffman y D.V. Dervartanain, 1984. Respiratory mutants of *Azotobacter vinelandii* with elevated levels of cytochrome *d*. Eur. J. Biochem., **141**: 447-452.

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≡N fixation. pp. 293-302.

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 y R.J. Maier, 1992. Cloning and characterization of the structural gene for the "Fe-S II" protein form *Azotobacter vinelandii*. En Nitrogen Fixation. Proceedings of the 9th international congress on nitrogen fixation, p 467. Cancun (Mexico).

Bibliografía

- 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.
- Nagpal, P., S. Jafri, M.A. Reddy y H.K. Das,** 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **171**: 3133-3138.
- 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.
- Ohmori, K. y A. Hattari,** 1970. Induction of nitrate and nitrite reductase in *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.*, **11**: 873-878.
- 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 CO₂ concentration. *Plant Physiol.*, **80**: 525-530.
- Omata, T., T. Ogawa, Y. Marcus, D. Friedberg y A. Kaplan,** 1987. Adaptation to low CO₂ level in a mutant of *Anacystis nidulans* R2 which requires high CO₂ for growth. *Plant Physiol.*, **83**: 892-894.
- 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.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. Andriesse 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.
- 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.
- Parkinson, J.S, 1993.** Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*, **73**: 857-871.
- Parkinson, J.S y E.C. Kofoid, 1992.** Communication modules in bacterial signaling proteins. *Ann. Rev. Genet.*, **26**: 71-112.
- 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.
- Payne, W.J., P.J. Riley y C.D. Cox, 1971.** Separate nitrite, nitric oxide and nitrous oxide reducing fractions from *Pseudomonas perfectomarinus*. *J. Bacteriol.*, **106**: 356-361.

Bibliografía

- Peakman, T., J. Crouzet, J.F. Mayaux, S. Busby, S. Mohan, N. Harborne, J. Wootton, R. Nicolson y J. Cole, 1990.** 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.
- Pearson, W.R. y D.J. Lipman, 1988.** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 2444-2448.
- Piechaud, M., F. Pichinoty, E. Azoulay, P. Couchoud-Beamont y J. Gendre, 1969.** Recherche sur des mutants bacteriens aifan perdu des activités catalytiques liées a la nitrate-reductase A. Description des methodes d'isolement. *Anu. Inst. Pasteur*, **116**: 276-287.
- 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.
- Raina, R., U.K. Bageshwar y H.K. Das, 1993.** The *Azotobacter vinelandii nifL*-like gene: nucleotide sequence analysis and regulation of expression. *Mol. Gen. Genet.*, **237**: 400-406.
- Rajagopalan, K.V. y J.L. Johnson, 1992.** The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.*, **15**: 10199-10202.
- Ramakrishnan, G. y A. Newton, 1990.** FlbD of *Caulobacter crescentus* is a homologue of the NtrC (NR_I) protein and activates σ^{54} -dependent flagellar gene promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 2369-2373.
- 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.

- Robertson, L.A. y J.G. Kuenen**, 1984. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch. Microbiol.*, **139**: 351-354.
- Robson, R.L.**, 1979. Characterization of an oxygen-stable nitrogenase complex isolation from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. J.*, **181**: 569-575.
- Robson, R.L. y 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.
- Robson, R.L., R.R. Eady, T.H. Richardson, R.W. Miller, M. Hawkins y J. Postgate**, 1986. The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. *Nature*, **322**: 388-390.
- Rodríguez-Quñones, F., R. Bosch y J. Imperial**, 1993. Expression of the *nifBfdxNnifOQ* region of *Azotobacter vinelandii* and its role in nitrogenase activity. *J. Bacteriol.*, **175**: 2926-2935.
- Romero Portillo, F.**, 1993. Estudio genético de la nodulación de *Rhizobium fredii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- 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.
- Sadoff, H.L., B. Shimei y S. Ellis**, 1979. Characterization of *Azotobacter vinelandii* deoxyribonucleic acid and folded chromosomes. *J. Bacteriol.*, **138**: 871-877.
- Santero Santurino, E.**, 1986. Aislamiento y caracterización de mutantes del metabolismo del nitrógeno en *Azotobacter vinelandii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Santero, E., F. Luque, J.R. Medina y M. Tortolero**, 1986. Isolation of *ntrA*-like mutants of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **166**: 541-544.

Bibliografía

- 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.
- 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.*, **153**: 591-599.
- Selvaraj, G. y V.N. Iyer, 1983.** Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. *J. Bacteriol.*, **156**: 1292-1300.
- Shah, V.K. y W.J. Brill, 1977.** Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 3249-3253.
- Shethna, Y.I, 1970.** Non-heme iron (iron-sulfur) proteins of *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **205**: 58-62.
- Sias, S.R. y J.L. Ingraham, 1979.** Isolation and analysis of mutants of *Pseudomonas aeruginosa* unable to assimilate nitrate. *Arch. Microbiol.*, **122**: 263-270.
- 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.
- 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.

Stephes, P.J., C.E. McKenna, B.E. Smith, H.T. Nguyen, M. McKenna, A.J. Thompson, F. Devlin y J.B. Jones, 1979. Circular dichroism and magnetic circular dichroism of nitrogenase proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 2585-2589.

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.

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.

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.

Tabor, S. y C.C. Richardson, 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 1074-1078.

Thayer, J.R. y R.C. Huffaker, 1982. Kinetic evaluation, using ¹³N, reveals two assimilatory nitrate transport system in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **149**: 198-202.

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.

Bibliografía

- Thompson, B.J., E. Domingo y R.C. Warner, 1980.** Pseudolysogeny of azotobacter phages. *Virology*, **102**: 267-277.
- Tomsett, A.B., N.S. Dunn-Coleman y R.H. Garret, 1981.** The regulation of nitrate assimilation in *Neurospora crassa*:: the isolation and genetic analysis of *nmr-1* mutants. *Mol. Gen. Genet.*, **182**: 229-233.
- Tortolero, M., R. Vila y A. Paneque, 1975.** Ferredoxin-dependent nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Plant. Sci. Lett.*, **5**: 141-145.
- Tortolero, M., E. Santero y J. Casadesús, 1983.** Plasmid transfer and mobilization of *nif* markers in *Azotobacter vinelandii*. *Microbios Lett.*, **22**: 31-35.
- 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.
- 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 β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **24**: 339-343.
- Vancura, V, 1961.** Detection of gibberelic acid in *Azotobacter* cultures. *Nature*, **192**: 88-89.
- 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.

- 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-Palás, M.A., 1991.** *ntcA*: Un gen regulador de la asimilación de nitrógeno en la cianobacteria *Synechococcus*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Vega-Palás, 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-Palás, 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.
- Vila, R., J.A. Bárcena, A. Llobell y A. Paneque, 1977.**
Characterization of a membrane-bound nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **75**: 682-688.
- Yabuki, Y., E. Mori y G. Tamaru, 1985.** Nitrite reductase in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**: 3061-3062.
- Yakunin, A.F., A.A. Tsygankov, I.N. Gogotov y M. Jha, 1990.**
Effect of Mo, V and W on the growth and nitrogenase synthesis in phototrophic bacteria. En: Nitrogen Fixation Developments in Plant and Soil Sciences. Vol. 48, pp 583-584. Ed. M. Polsinelli, R. Materassi y M. Vincenzini. Kluwer Academic Publ.
- 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.

6. ABREVIATURAS

ACF	Factor activo de conversión
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNasa	Deoxirribonucleasa
ARN	Acido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
ATP-asa	Adenosina-trifosfatasa
b	Base
cal	Caloría
Ci	Curio
CTAB	Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio
Chl	Clorato
Da	Dalton
dATP	Desoxiadenosín-5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitidín-5'-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosín-5'-trifosfato
dTTP	Desoxitimidín-5'-trifosfato
dUTP	Desoxiuridín-5'-trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Acido etilén-diamino-tetraacético
EGTA	Acido etilén glicol-bis (β -amino etil eter) tetraacético
etidio	3,8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridio
FAD ⁺ , FADH	Flavín-adenín-dinucleótido y su forma reducida
FeMo-co	Cofactor de hierro y molibdeno
g	gramo
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GMP	Guanosín-5'-monofosfato
GOGAT	Glutamato sintetasa
GS	Glutamina sintetasa
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
l	Litro
M	Molar
Mo-co	Cofactor de molibdeno
MOPS	Acido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MPT	Molibdopteridina

Abreviaturas

MTAB	Mezcla de bromuros de alquiltrimetil amonio
N'NEDA	N- [naftil-(1)] etilendiamina-diclorhidrato
NAD ⁺ , NADH	Nicotinamida-adenosín-dinucleótido (nucleótido difosfopiridínico) y su forma reducida
NADP ⁺ , NADPH	Nicotinamida-adenosín-dinucleótido (trifosfopiridínico-nucleótido) y su forma reducida
NAS	Actividad nitrato reductasa
Nas	Capacidad de reducción de nitrato
Nif	Capacidad de fijar nitrógeno
NIS	Actividad nitrito reductasa
Nis	Capacidad de reducción de nitrito
NR	Nitrato reductasa respiratoria
NTB	Azul de nitrotetrazolio
ONPG	o-nitrofenil β -D-galactopiranosido
ORF	Fase de lectura abierta
pb	par de bases
PEG	Polietilén-glicol
pI	Punto isoeléctrico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
t	Tiempo
Tris	2-amino-2(hidroxiometil)1,3,-propanodiol
UR/UT	Uridililtransferasa
v	Volumen
X-fosfato	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
°C	Grado centígrado

Antibióticos:

Amp/Ap	Ampicilina	Sm	Estreptomicina
Ble	Bleomicina	SpC/Sp	Espectinomicina
Cm	Cloranficol	Tet/Tc	Tetraciclina
Kam/Km	Kanamicina	Nal	Acido nalidíxico

Enzimas de restricción:

BH	<i>Bam</i> HI	H	<i>Hind</i> III	S/SI	<i>Sal</i> I
B/Bg	<i>Bgl</i> II	N	<i>Nar</i> I	Sm	<i>Sma</i> I
Bs	<i>Bss</i> III	Nr	<i>Nru</i> I	Sp	<i>Sph</i> I
E	<i>Eco</i> RI	P/Ps	<i>Pst</i> I	Xb	<i>Xba</i> I
EV	<i>Eco</i> RV	Sc	<i>Sac</i> I	X/Xh	<i>Xho</i> I

Bases nitrogenadas:

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

Aminoácidos:

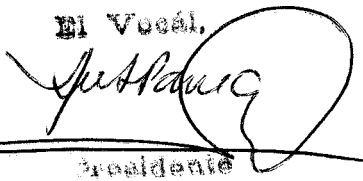
Ala	A	Alanina	Leu	L	Leucina
Arg	R	Arginina	Lys	K	Lisina
Asn	N	Asparagina	Met	M	Metionina
Asp	D	Acido aspártico	Phe	F	Fenilalanina
Cys	C	Cisteína	Pro	P	Prolina
Glu	E	Acido glutámico	Ser	S	Serina
Gln	Q	Glutamina	Thr	T	Treonina
Gly	G	Glicina	Trp	W	Triptófano
His	H	Histidina	Tyr	Y	Tirosina
Ile	I	Isoleucina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

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. Juan Carlos Gutiérrez Martínez
titulada Estudio del oxígeno mas AB de asimilación de
nutrato en Azotobacter vinelandii y Phaeobium pectus
acordó otorgarle la calificación de Apto cum laude

Sevilla, 70 de Octubre 1994

El Vocel,


Presidente

El Vocal,


El Secretario.

El Vocal,


El Decretado,



