

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Molecular**

**TESIS DOCTORAL**

**Regulación de la expresión de las oxidasas terminales de la  
cadena de transporte de electrones de *Pseudomonas putida* y  
su efecto en represión catabólica**

**Ana Ugidos Valladares**

**Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)**

**Madrid, 2008**

**Memoria presentada por Ana Ugidos Valladares para optar al grado de  
Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid**

**Directores de Tesis**

**Dr. Fernando Rojo de Castro**

**Dra. Gracia Morales Kucharski**

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca predoctoral del CSIC,  
programa I3P.

***A mi familia***  
***A Jesús***

“No es, como muchos creen, el cuadro, la foto o el grabado el arte mismo  
sino tan sólo los vestigios, al óleo, a las sales de plata  
o al ácido nítrico, que delatan la partida de cartas que es el proceso creativo.  
Confieso que creo, desde hace ya tiempo, que la obra de arte es el hombre:  
sí, esa parcela de tiempo con ojos, que trata de trascender lo que le rodea,  
que trata de entender aquello que toca  
y aquello que no alcanza...”

“...Espejo de azogue”

*José Noriega*

*(El gato gris)*

“No todo lo que puede ser contado cuenta y  
no todo lo que cuenta puede ser contado.”

*A. Einstein*

## Agradecimientos

A Fernando Rojo, por enseñarme con paciencia a sobrevivir a los avatares diarios del laboratorio y escucharme con atención en mis ataques de dudas. Ahora comprendo la importancia de ser independiente.

A Gracia Morales, por llevarme de la mano en mis primeros pasos por la ciencia.

A Renata Moreno, por ayudarme cuando más lo necesitaba interesándose por mi trabajo y sugiriendo soluciones.

A Luis Yuste, por resolver todas esas dudas con las que nos atascamos inevitablemente. Me ha encantado compartir *pravada* contigo, y escuchar tus frases increíbles capaces de hacerme perder el hilo de cualquier idea que pudiera rondar mi cabeza. Ha sido un lujo y una suerte trabajar a tu lado.

A Alejandro Dinamarca, que con su paciencia sudamericana me ayudó con el trabajo del fermentador. Me encantaron tus enseñanzas, tus comentarios científicos (y los que no lo eran tanto) y tu apoyo optimista a mi trabajo.

A mi Ali querida, que me ha hecho reír tantas veces que no podría enumerarlas. He disfrutado con tus chistes y con los juegos de palabras que nadie más entiende. Guardo cada una de tus risas con el mayor de los cariños.

A Pilar, que nos ha traído un sinfín de historias gallegas (y de más allá...), por compartirlas en cualquier ocasión y circunstancia, me ha encantado escucharte.

A mis primos, como no, Álvaro y Laura (incluso a Pedrito...). Por esas risas tan familiares y entrañables. Por hacerme comprender que no es lo mismo tener retardo que ser retardado, por esas partidas de squash en las que (para qué falsa modestia) hemos demostrado que somos más que buenas. Qué tardes, qué calidad, somos unas leyendas vivas, ¿o no? Me ha encantado acompañaros en vuestro rincón.

A Leo, ese pedazo de huracán cubano que nos revoluciona en cuanto llega. ¡Qué inyección de optimismo!

A Juan Fran, que aún hoy desde lejos tuvo su papel importante en esta historia. Contigo se nos fue nuestra poca cordura.

A Blanca (qué santa paciencia, ¿no?), a Esther, a Álvaro, a José Luis, que también han aportado lo suyo.

A mi familia, por su apoyo incondicional desde el primer momento y hasta el final. Especialmente a mis padres, que me han dado la posibilidad de estudiar, de viajar y de conocer. Con el tiempo uno valora lo que tiene y lo que ha tenido. A mi abuelina, que con sus 90 años sigue estando más cuerda que cualquiera, con una mente privilegiada. A mi tía, que me ha cuidado tantos días y que me ha ilustrado con una parte de sus amplios conocimientos. A mi hermana, que sigue siendo mi favorita. A mi familia Gijonense, que aún desde lejos se ha preocupado por mí.

A Jesús, por compartir conmigo un mundo ajeno a todo. Por hacerme reír (incluso de mí misma), por descubrirme tus ideas, por hacerme olvidar lo duro que ha sido y tener la paciencia de escucharme a diario. Sin tu apoyo me habría atascado hace tiempo.

A mis amigos más cercanos, que aún desde lejos siempre parece que están aquí. A Javi y Vero, incondicionales desde hace ya mucho tiempo. Nuestras cenas nunca tendrán precio. A Alvarito, tu culto punto de vista siempre supone el inicio de algo...

A los que habéis compartido los cafés diarios, las comidas, las tardes, los viernes de hastío... conmigo, siempre riendo. Ha sido una suerte pasar estos años con vosotros. Sois unos golfos encantadores...

## INDICE

<b>Lista de figuras y tablas</b>	5
<b>Summary</b>	7
<b>Abreviaturas</b>	8
<b>Introducción</b>	9
<b>1.- Ruta de degradación de alcanos</b>	11
<b>2.- Represión catabólica</b>	14
2.1.- Crc	15
2.2.- Cyo	17
2.3.- Otros factores: PtsN y PtsO	17
<b>3.- La respiración en <i>Pseudomonas</i></b>	18
<b>4.- Regulación de la expresión de los componentes de la cadena de transporte de electrones</b>	22
4.1.- FNR: un sensor de oxígeno	23
4.2.- Proteínas de la familia RegB/RegA, un sistema de regulación redox altamente conservado	25
<b>Objetivos</b>	29
<b>Materiales y métodos</b>	31
<b>1.-Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos</b>	32
<b>2.-Medios y condiciones de cultivo</b>	34

<b>3.-Técnicas experimentales</b>	35
3.1- Extracción de DNA, digestiones y ligaciones	35
3.2- Transformación	35
3.3- Amplificación de DNA	35
3.4- Fusiones transcripcional y traduccional a <i>lacZ</i>	36
3.5- Obtención de estirpes mutantes en cepas de interés	37
3.5.1.- Estirpes mutantes en citocromo oxidasas	37
3.5.2.- Estirpes mutantes en reguladores	39
3.6- Ensayos de $\beta$ -galactosidasa	40
3.7- Extracción de RNA	40
3.8- Condiciones de crecimiento para la purificación de RNA	40
3.9- PCR cuantitativa de tiempo real	41
3.10- Microarrays	42
3.11- Purificación de membranas y cuantificación de citocromo oxidasas	42
3.12- Mutagénesis dirigida, sobreexpresión y purificación de las proteínas Anr*, RoxR y RoxR*	43
3.13.- Ensayos de retraso en gel, <i>footprinting</i> con DNasa I e interferencia por radical hidroxilo	44
<b>Resultados</b>	46
<b>1.- Efecto de la inactivación de las oxidasas terminales CIO, Aa3, Cbb3.1, Cbb3.2 y del complejo <i>bc1</i> en la inducción de la ruta de degradación de alcanos</b>	46
<b>2.- Regulación de la expresión de las oxidasas terminales de la cadena de transporte de electrones de <i>P. putida</i></b>	49
2.1.- Efecto de ANR sobre la expresión de las oxidasas terminales Cyo, CIO, Aa3, Cbb3.1 y Cbb3.2	51
2.1.1.- Medida de los niveles de los mRNA de las oxidasas terminales por PCR de tiempo real	51
2.1.2.- Cuantificación de los niveles de citocromo oxidasas a partir de sus espectros de absorción	54

2.2-Unión de ANR* a DNA	55
2.2.1.- Identificación de los sitios de unión de ANR* a los promotores de las oxidasas terminales Cyo, Cbb3.1 y CIO	55
2.2.2.- Identificación de los nucleósidos importantes para la unión de ANR* a DNA	58
2.3.- Efecto del par sensor/regulador RoxS/RoxR sobre la expresión de las diferentes oxidasas terminales de <i>P. putida</i>	61
2.3.1.- Efecto de RoxR sobre las oxidasas terminales Cyo, CIO, Aa3, Cbb3.1 y Cbb3.2	61
2.3.2.- Unión de RoxR al promotor de <i>cyoA</i>	63
2.4.- Análisis de la expresión de los genes <i>cyo</i> en distintas condiciones y fondos genéticos mediante fusiones transcripcionales y traduccionales al gen <i>lacZ</i>	67
2.4.1- Expresión de Cyo en LB	68
2.4.2- Expresión de Cyo en medio mínimo	69
2.4.3- Efecto de la inactivación de ANR sobre la expresión de Cyo en distintas condiciones de crecimiento	70
2.4.4- Efecto de la inactivación de RoxS y RoxR sobre la expresión de Cyo en distintas condiciones de crecimiento	71
<b>3.- Efecto de los reguladores globales ANR y RoxR en represión catabólica y en el transcriptoma de la célula</b>	<b>73</b>
3.1.- Efecto de la inactivación de ANR sobre la represión catabólica	73
3.2.- Efecto de la inactivación de RoxS/RoxR sobre la represión catabólica	75

3.3.- Efecto de los reguladores ANR y RoxR sobre el transcriptoma celular	76
<b>Discusión</b>	81
1.-Cyo es la única oxidasa terminal de <i>P. putida</i> implicada en represión catabólica	82
2.-Los reguladores globales ANR y RoxR coordinan la expresión de las oxidasas terminales de <i>P. putida</i> en respuesta a oxígeno y carbono	83
2.1.-Efecto de ANR	84
2.2.-Efecto de RoxR	90
2.3.-Regulación de Cyo	94
3.-Efecto de ANR y RoxR sobre el metabolismo celular	96
3.1.-Represión catabólica	96
3.2.- Efecto sobre el transcriptoma celular	97
<b>Conclusiones</b>	98
<b>Bibliografía</b>	101

## Lista de figuras y tablas

Figura 1.-Ruta de degradación de alcanos codificada por el p <sub>ásmido</sub> OCT de <i>P. putida</i>	14
Figura 2.-Modelo de regulación del mRNA de <i>alkS</i> por Crc.	16
Figura 3.-Modelo de cadena respiratoria	20
Figura 4.-Modelo de cadena de transporte de electrones en <i>P. putida</i>	21
Figura 5.-Regulación de la expresión de los pigmentos fotosintéticos en <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	27
Figura 6.-Efecto de la inactivación de las distintas oxidasas terminales sobre la expresión de la ruta de degradación de alcanos	48
Figura 7.-Efecto de ANR sobre la expresión de los genes que codifican las distintas oxidasas terminales	53
Tabla 1.-Contenido en citocromos <i>b</i> y <i>c</i> en preparaciones de membrana de distintas cepas de <i>P. putida</i>	55
Figura 8.-Unión de ANR* a los promotores <i>PcyoA</i> , <i>PcioA</i> y <i>PccoN1</i>	57
Figura 9.-Complejos formados por la unión de ANR* a los promotores de <i>cioA</i> y <i>cyoA</i>	58
Figura 10.-Nucleósidos necesarios para la unión de ANR al promotor <i>PcioA</i>	60
Figura 11.-Efecto de RoxR sobre la expresión de los genes que codifican las distintas oxidasas terminales.	63
Figura 12.-Unión de RoxR* al promotor <i>PcyoA</i> (retardo en gel).	65
Figura 13.-Unión de RoxR* a <i>PcyoA</i> (footprint y radical hidroxilo)	66
Figura 14.-Comparación entre la expresión de la oxidasa terminal <i>Cyo</i> y la represión catabólica ejercida sobre el promotor <i>PalkB</i> en medio LB con buena aireación	68
Figura 15.-Correlación entre la expresión de la oxidasa terminal <i>Cyo</i> y la represión catabólica ejercida sobre el promotor <i>PalkB</i> en medio mínimo con succinato o	69

con citrato como única fuente de carbono, con alta aireación	
Figura 16.-Expresión de <i>Cyo</i> en diferentes condiciones al inactivar <i>anr</i> .	71
Figura 17.-Expresión de <i>Cyo</i> al inactivar el regulador <i>RoxR</i>	72
Figura 18.-Efecto de ANR sobre la represión catabólica	74
Figura 19.-Expresión de <i>PalkB</i> en las estirpes PBS4, PBS4S y PBS4R creciendo en medio mínimo suplementado con succinato como única fuente de carbono	75
Tabla 2.-Cambios en el transcriptoma celular al comparar KT2440 y KT2440A en fase estacionaria en medio rico LB	78
Figura 20.-Respuesta de la cadena de transporte de electrones de <i>P. putida</i> a oxígeno y carbono en función de ANR y <i>RoxR</i>	93

## SUMMARY

*Pseudomonas putida*, a free-living bacterium, can use many different compounds as carbon and energy source. Expression of the genes encoding the diverse catabolic pathways involved in the assimilation of these compounds is tightly regulated in response to environmental and physiological signals. This is achieved by a number of regulatory systems that respond not only to the presence of the compound to be assimilated, but to other signals that allow to coordinate and optimize metabolism. One of these regulatory systems is the so-called *catabolite repression control*, which allows the hierarchical assimilation of individual carbon sources when these are present in mixtures at high concentrations. The molecular mechanisms governing catabolite repression in Pseudomonads are not well understood, but are different from those characterized in other model microorganisms. Several proteins have been implicated in this regulatory process. This work is focused on one of them, namely the Cythochrome o Ubiquinol Oxidase (Cyo).

Cyo is one of the terminal oxidases of the *P. putida* electron transport chain. This organism has a branched electron transport chain including at least five terminal oxidases. Cyo and the cyanide insensitive oxidase (CIO) are ubiquinol oxidases, while the other three, named Cbb3.1, Cbb3.2 and Aa3, are cythochrome *c* oxidases. In addition to its role as a terminal oxidase, Cyo seems to have a role in global regulation of gene expression by sending signals that finally affect the expression of many genes, several of them involved in transport and catabolism of carbon sources. The levels of Cyo vary according to oxygen availability and the carbon source being used, but the regulators controlling expression of the *cyo* genes in Pseudomonads were unknown at the start of this project. This work has identified two transcriptional regulators that not only regulate Cyo levels, but coordinate as well the expression of several terminal oxidases. One of them, ANR, is an oxygen-responsive global transcriptional regulator that controls expression of the genes encoding the Cyo, CIO and Cbb3.1 terminal oxidases. The other one is RoxR, a transcriptional regulator that responds to the RoxS sensor protein, and which coordinates expression of all five terminal oxidases in response to oxygen levels and the carbon source being used. The molecular mechanisms through which these proteins control gene expression have been investigated in detail. The results emphasize the relevance and complexity of the global regulatory networks that connect the different aspects of cellular metabolism, integrating environmental and physiological signals.

## Abreviaturas

$\sigma$	Factor sigma
A	Absorbancia
AMP	Adenosín monofosfato
ANR	Regulador anaeróbico del catabolismo de la arginina y nitrato ( <i>anaerobic regulation of argine catabolism and nitrate regulation</i> ).
ArcB/A	Control respiratorio aerobio ( <i>aerobic respiratory control</i> )
ATP	Adenosín trifosfato
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CRP	Proteína receptora de cAMP ( <i>cAMP receptor protein</i> )
DCPK	Diciclopropilcetona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
FNR	Regulación de la fumarato y nitrato reductasa ( <i>fumarate and nitrate reductase regulation</i> ).
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido
H <sup>+</sup>	Protón
LB	Medio Luria Bertani
mRNA	RNA mensajero
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida-adenín-dinucleótido (oxidado)
NADH	Nicotinamida-adenín-dinucleótido (reducido)
TBE	Tampón Tris borato EDTA
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rif	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
RNAP	RNA polimerasa
SDS	Sodio dodecil sulfato
tet	Tetraciclina
wt	Estirpe silvestre

## **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

El suelo es un ambiente en el que coexisten infinidad de microorganismos que participan de manera importante en diferentes actividades, como las relacionadas con el reciclaje de elementos o el flujo de energía. Se caracteriza por ser un medio en el que condiciones tales como la humedad, concentración de oxígeno, salinidad, nutrientes, compuestos tóxicos, etc... cambian con frecuencia. Entre las bacterias que viven en el suelo se encuentran microorganismos especialistas, que sobreviven en nichos específicos donde las condiciones cambian poco, y también microorganismos generalistas, capaces de tolerar una amplia gama de cambios. Las bacterias generalistas que habitan el suelo son capaces de aprovechar de manera eficiente los recursos del medio que las rodea utilizando diferentes fuentes de carbono, pero, sobre todo, deben ser capaces de tolerar de manera adecuada los cambios del hábitat en que viven (Dos Santos et al. 2004).

Dentro de los microorganismos que viven en el suelo se encuentran las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. Se trata de bacterias Gram negativas, ubicuas y saprofitas, con flagelos polares y un metabolismo respirador antes que fermentativo (Timmis 2002). En este género se engloba un amplio grupo de especies con una gran diversidad metabólica, capaces de degradar y mineralizar compuestos muy diferentes. Son versátiles metabólicamente, fisiológicamente y genéticamente, y cumplen una función significativa en procesos tan importantes como el ciclo de los elementos, degradación y reciclaje de compuestos xenobióticos, protección de plantas frente a patógenos... (Timmis 2002). Muchas *Pseudomonas* pueden utilizar más de 100 fuentes de carbono y energía diferentes, dentro de las que se incluyen compuestos difícilmente degradables como determinados hidrocarburos o compuestos aromáticos.

*Pseudomonas putida* KT2440, cuyo genoma se ha secuenciado (Nelson et al. 2002), es un microorganismo extremadamente versátil. Considerado como una bacteria generalista capaz de sobrevivir eficazmente a los cambios físico-químicos a los que se ve sometida en su hábitat natural, es además capaz de utilizar una amplia gama de sustratos como fuente de carbono. Posee un genoma de 6,1 Mb en el que casi el 10% de los genes codificados están implicados en transducción de señales o en regulación génica, un número muy elevado en relación al tamaño del genoma

(Nelson et al. 2002). Tiene 24 factores sigma, que le permiten responder adecuadamente a una amplia variedad de señales, tanto internas como externas y posee 80 óxido-reductasas, estas últimas pertenecientes a diferentes familias y con una especificidad de sustrato aún desconocida (Dos Santos et al. 2004). El análisis genómico muestra además la presencia de rutas metabólicas para la degradación de varios compuestos aromáticos, muchos de los cuales derivan de la descomposición de la lignina y aparecen asociados a plantas (Nelson et al. 2002). Su capacidad para crecer en presencia de concentraciones de oxígeno muy bajas le permite sobrevivir en ambientes como la rizosfera, donde aprovecha los diversos nutrientes secretados por las raíces de las plantas como fuente de carbono y energía. Además de las rutas metabólicas centrales, *P. putida* posee 105 islas genómicas con un contenido en GC diferente al del 80% del genoma. Algunas de estas islas incrementan su potencial metabólico, y suponen una defensa frente a distintas situaciones de estrés, tanto bióticas como abióticas (Weinel et al. 2002).

*P. putida* KT2440 es un microorganismo no patógeno, fácil de manipular genéticamente y con una gran versatilidad metabólica, por lo que se ha utilizado ampliamente como sistema modelo. Conocer la regulación de las rutas catabólicas, especialmente de compuestos aromáticos e hidrocarburos, resultaría útil para diversas aplicaciones biotecnológicas, como la biorremediación o las biotransformaciones (Wackett 2003; Pieper et al. 2004). Entre las rutas que permiten la degradación de hidrocarburos se encuentra la ruta de degradación de alcanos codificada por el plásmido OCT de *P. putida* GPo1, modelo de trabajo utilizado en nuestro laboratorio.

### **1.-Ruta de degradación de alcanos**

En bacterias, tanto la degradación de nutrientes como la biosíntesis de nuevos componentes debe estar finamente regulada, lo que les permite sobrevivir a unas condiciones ambientales que cambian con rapidez. Con objeto de garantizar esa supervivencia, las bacterias poseen sistemas de regulación que evitan un gasto innecesario de energía, manteniendo un control de las rutas metabólicas que se expresan en un determinado momento. Dichos sistemas coordinan la expresión de unas rutas y la represión de otras, al mismo tiempo que responden a estímulos muy diversos, no siempre relacionados.

Para aprovechar la energía de manera óptima, los microorganismos deben ser capaces de elegir la fuente de carbono más adecuada cuando se encuentran frente a varios sustratos potenciales. Para ello se establece un orden, de manera que la ruta necesaria para la degradación del compuesto no preferido se mantiene reprimida hasta que el sustrato preferido es degradado. Esta jerarquía para consumir unas fuentes de carbono antes que otras es lo que se denomina *represión catabólica*, un proceso complejo cuyos mecanismos moleculares no son iguales en todos los microorganismos.

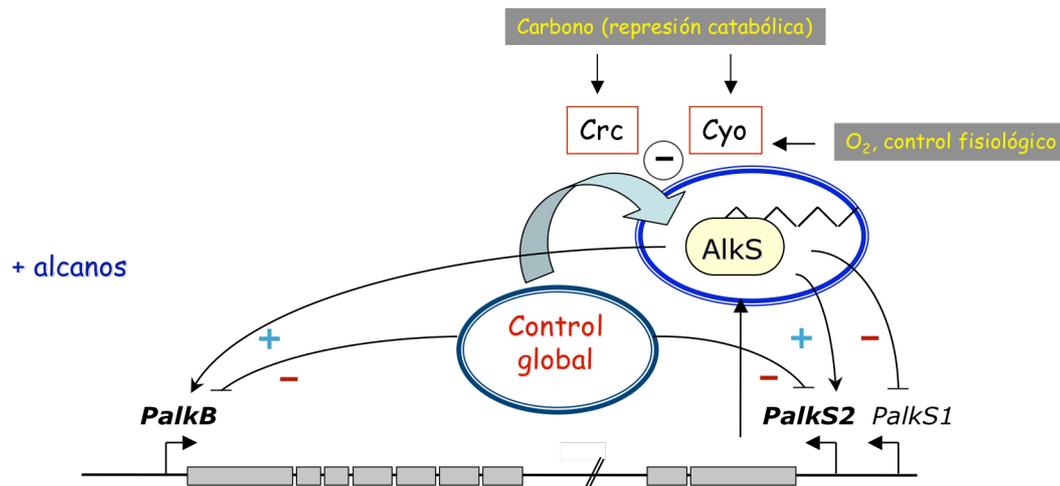
Entre los compuestos que se pueden utilizar como fuente de carbono figuran los alcanos. Estos compuestos son hidrocarburos altamente reducidos que constituyen el 50-70% del petróleo crudo (van Beilen y Witholt 2004). Están presentes en la naturaleza como producto de distintos procesos bioquímicos que tienen lugar en plantas, algas o diferentes microorganismos, además de como consecuencia de diversos vertidos contaminantes. Existen diferentes grupos de microorganismos capaces de utilizarlos como fuente de carbono y energía, o incluso de utilizarlos de forma casi exclusiva, como *Alcanivorax borkumensis* (van Beilen et al. 2004; van Beilen y Funhoff 2007).

Entre los microorganismos capaces de degradar alcanos se encuentra la cepa GPo1 de *P. putida*, que posee una ruta codificada en el plásmido OCT que permite la progresiva oxidación de los alcanos de cadena media: C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub> (Chakrabarty et al. 1973). La expresión de esta ruta está sujeta a un control estricto, que garantiza que la bacteria sólo utilice los alcanos como fuente de carbono y energía cuando no hay otros sustratos disponibles que se metabolicen preferentemente. Por un lado, hay una regulación específica mediada por un regulador que activa la transcripción de los genes involucrados en la ruta sólo cuando el compuesto a degradar está presente. Superpuesta a esta regulación específica hay una regulación global bastante compleja y mediada por distintos reguladores que afectan a diversos grupos de genes. Esto va a ayudar a coordinar la asimilación de los alcanos con otros aspectos del metabolismo de la bacteria.

La asimilación de alcanos se inicia con la oxidación del grupo metilo terminal para dar un alcohol, proceso en el que participan una alcano hidroxilasa presente en la membrana y dos enzimas citosólicas: rubredoxina y rubredoxina reductasa (AlkT). Posteriormente, el alcohol es oxidado hasta el correspondiente aldehído por la alcohol

deshidrogenasa (AlkJ), que a su vez es oxidado por una aldehído deshidrogenasa (AlkH). Ésta dará lugar a un ácido graso capaz de incorporarse al ciclo de Krebs. El NADH participa cediendo electrones a AlkT en el primer paso de oxidación del alcano (van Beilen et al. 1994).

Los genes de esta ruta se agrupan en dos operones, *alkBFGHJKL* y *alkST*, separados entre sí 9,7 kb (van Beilen et al. 2001). Su expresión está regulada por la proteína AlkS (Fig.1). Cuando no hay alcanos en el medio, AlkS se expresa desde el promotor *PalkS1* y actúa al mismo tiempo como represor de su propio promotor, manteniendo unos niveles de expresión bajos y constantes. Sin embargo, cuando hay alcanos en el medio, AlkS activa la expresión desde el promotor *PalkS2* (Canosa et al. 2000). Esto permite que se sintetice mayor cantidad de AlkS y que se pueda activar eficientemente la expresión del promotor *PalkB*, desde el que se expresan los genes que codifican para las enzimas responsables de la degradación de alcanos. Superpuesto a esto hay un control global en el que participan las proteínas Crc (*Catabolite Repression Control*) y Cyo (Citocromo o Ubiquinol Oxidasa). Este control global reprime la inducción de la ruta por alcanos en determinadas condiciones: cuando la célula crece en medio rico LB, en medio mínimo con ciertos ácidos orgánicos como fuente de carbono (piruvato, lactato o succinato), siempre y cuando la concentración de O<sub>2</sub> en el medio sea alta (Yuste et al. 1998; Dinamarca et al. 2002; Dinamarca et al. 2003). La represión por fuente de carbono se considera un caso clásico de represión catabólica, mientras que la regulación por oxígeno encaja mejor dentro del término *control fisiológico* (Rojo y Dinamarca 2004).



**Figura 1.** Ruta de degradación de alcanos codificada por el plásmido OCT de *P. putida*. Los genes se agrupan en dos operones, *alkBFGHJKL* y *alkST*, ambos regulados por la proteína AlkS. En ausencia de alcanos, *alkS* se expresa desde *PalkS1*, un promotor reconocido por  $\sigma^S$ -RNAP, aunque sus niveles se mantienen constantes, porque AlkS es capaz de reprimir la expresión de este promotor. En presencia de alcanos, AlkS activa la transcripción de los promotores *PalkB* y *PalkS2*, este último para permitir una mayor expresión de AlkS. Superpuesto a esto, el control global mediado por Crc y Cyo reprime la expresión de la ruta si en el medio hay otras fuentes de carbono que la célula prefiere antes que alcanos.

## 2.-Represión catabólica

El proceso de represión catabólica se ha estudiado fundamentalmente en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, donde se sabe que es consecuencia de una respuesta reguladora global bastante compleja (Stulke y Hillen 1999). En *E. coli* la represión catabólica regula la asimilación de azúcares de manera que, cuando hay glucosa en el medio de crecimiento, ésta es la que se metaboliza en primer lugar. El transporte de glucosa por el sistema de transporte de azúcar por fosfotransferasa está acoplado a fosforilación, que activa mecanismos que impiden importar otros azúcares por el proceso denominado exclusión de inductor. Además, cuando la glucosa se consume, los niveles de cAMP se incrementan y éste se une a la proteína CRP (cAMP

*receptor protein*). El complejo cAMP-CRP es capaz de unirse a un elevado número de promotores sobre los que funciona como activador o como represor de la transcripción (Saier et al. 1995). En *B. subtilis*, la represión catabólica responde fundamentalmente a dos proteínas, Hpr y CcpA. La fosforilación de Hpr determina si esta proteína controla la actividad de algunos reguladores de operones catabólicos o si actúa como correpresor de CcpA. Cuando la concentración intracelular de fructosa 1,6 bifosfato (FBP) es alta (como consecuencia de la metabolización de la glucosa), el complejo Hpr-CcpA-FBP se une al DNA y regula la expresión de muchos promotores catabólicos (Stulke y Hillen 2000).

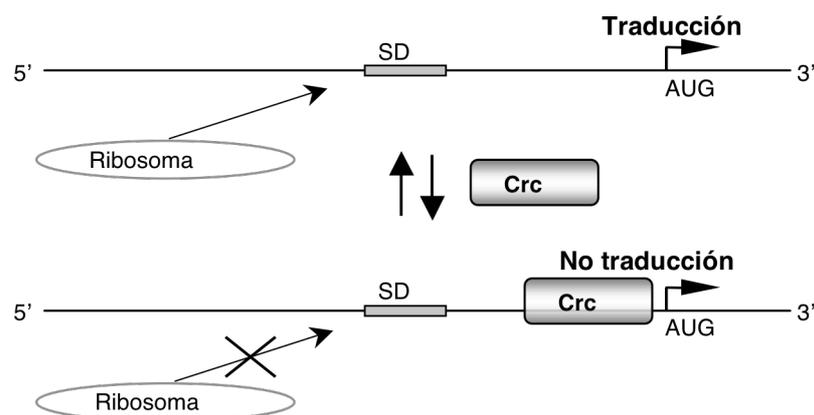
En *Pseudomonas* la represión catabólica se ha analizado para el catabolismo de algunos azúcares, aminoácidos, hidrocarburos y compuestos aromáticos (Rojo y Dinamarca 2004). En estos microorganismos, la fuente de carbono preferida no es la glucosa, sino los ácidos orgánicos o diferentes aminoácidos. Esto probablemente se deba a los ambientes en los que suelen vivir las *Pseudomonas*, ya que son compuestos generados por un gran número de plantas y otros organismos. Entre los factores implicados en esta regulación se puede descartar CRP. La proteína Vfr de *P. aeruginosa*, que tiene un 80% de similitud con CRP de *E. coli*, no participa en represión catabólica, sino en *quorum sensing* (Albus et al. 1997). Además, los niveles de cAMP no parecen cambiar en función de la fuente de carbono o la fase de crecimiento. La proteína equivalente a CRP en *P. putida* tampoco participa en represión catabólica, sino en la regulación de la motilidad y el desarrollo del flagelo (Milanesio 2007). Entre los factores que participan en represión catabólica, o en el control fisiológico de rutas catabólicas, se incluyen Crc, Cyo o factores que afectan a rutas catabólicas dependientes del factor sigma alternativo  $\sigma^{54}$  (o  $\sigma^N$ ) como PtsN/PtsO, IHF, FtsH o ppGpp (Rojo y Dinamarca 2004; Cases y de Lorenzo 2005).

### 2.1.- Crc

En bacterias existen reguladores específicos, que responden a un determinado estímulo en respuesta al cual regulan la expresión de uno o pocos genes, y reguladores globales, que afectan a grupos amplios de genes. Crc es un regulador global, capaz de controlar la asimilación de distintas fuentes de carbono en *Pseudomonas*, reprimiendo la expresión de diversas rutas catabólicas. Entre los genes reprimidos, se encuentran los implicados en el metabolismo de algunos azúcares,

aminoácidos y compuestos nitrogenados, tanto en *P. aeruginosa* como en *P. putida* (MacGregor et al. 1996). También es capaz de regular la asimilación de hidrocarburos, puesto que reprime la ruta de degradación de alcanos codificada por el plásmido OCT de *P. putida* GPo1 (Yuste y Rojo 2001), y la ruta de degradación de tolueno y xileno codificada por el plásmido TOL (Aranda-Olmedo et al. 2005). Crc ejerce un papel importante en la regulación de rutas catabólicas relacionadas con el metabolismo de diversos compuestos aromáticos. Concretamente, es capaz de reprimir las vías de degradación del homogentisato, benzoato y protocatecuato (Morales et al. 2004). A su vez, los niveles de Crc parecen estar regulados de manera que su concentración es mayor en condiciones que implican una mayor represión catabólica sobre las rutas que controla (Ruiz-Manzano et al. 2005).

El mecanismo de acción de Crc sólo ha empezado a desvelarse recientemente. A pesar de que la similitud entre Crc y ciertas endorribonucleasas y enzimas de reparación del DNA es del 25-38%, Crc no es capaz de unirse al DNA (MacGregor et al. 1996). Entre los genes que regula se encuentra *alkS*, el activador transcripcional de la ruta de degradación de alcanos codificada por el plásmido OCT de *P. putida* GPo1. La regulación de *alkS* por Crc es post-transcripcional, de manera que Crc es capaz de unirse a la zona donde se inicia la traducción del mRNA de *alkS*, impidiendo por tanto que este se traduzca (Moreno et al. 2007) (Fig. 2).



**Figura 2.** Modelo de regulación del mRNA de *alkS* por Crc. Crc se uniría a la región 5' del mRNA de *alkS*, evitando la unión de los ribosomas y por lo tanto el inicio de la traducción.

## 2.2.-Cyo

La citocromo o ubiquinol oxidasa Cyo, inicialmente descrita como “un pigmento de unión a CO” (Castor y Chance 1959), es la principal oxidasa terminal de la cadena de transporte de electrones en condiciones de alta aireación, tanto en *P. putida* como en *E. coli*, puesto que recoge la mayoría del flujo de electrones en dichas condiciones. Está codificada por el operón *cyoABCDE* y es capaz de bombear protones al espacio periplásmico de la bacteria, de manera que contribuye a generar un gradiente electroquímico de protones que permite la síntesis de ATP (Hirayama et al. 1998). Su inactivación supone una reducción en la represión catabólica ejercida sobre las rutas de degradación del fenol y de alcanos (Petruschka et al. 2001; Dinamarca et al. 2002), apoyando la idea de que la cadena de transporte de electrones puede recoger y transmitir señales relacionadas con el estatus fisiológico de la célula (Rojo y Dinamarca 2004). Además, los niveles de Cyo están regulados, ya que dependen tanto de la fuente de carbono como de la presión parcial de oxígeno en el medio en el que crecen las bacterias (Sweet y Peterson 1978; Cotter et al. 1990; Dinamarca et al. 2003).

A pesar de que la ausencia de Cyo provoca una disminución en la represión catabólica, no elimina totalmente este efecto, ni sobre la ruta de degradación del fenol, ni sobre la de alcanos (Petruschka et al. 2001; Dinamarca et al. 2002). Se sabe que hay más factores implicados en la represión catabólica (Rojo y Dinamarca 2004). Dado que Cyo forma parte de una compleja cadena respiratoria cuya composición está sujeta a una fina regulación en función de las condiciones fisiológicas, cabe la posibilidad de que no sea el único punto de la cadena respiratoria del que parte una señal reguladora.

## 2.3.- Otros factores: *PtsN* y *PtsO*

La expresión de ciertas rutas catabólicas depende de promotores que son reconocidos por una forma de RNA polimerasa unida al factor sigma alternativo  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ). El inicio de la transcripción a partir de estos promotores necesita la presencia de determinado tipo de activadores capaces de unirse al DNA. Entre ellos se encuentra la

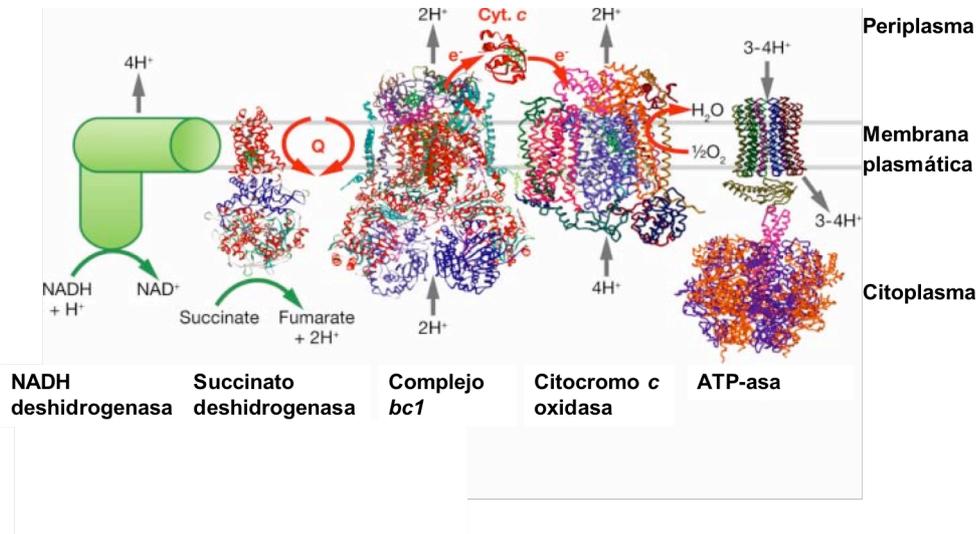
proteína IHF (*integration host factor*), capaz de estabilizar la unión de la RNA polimerasa al promotor correspondiente (Perez-Martin y De Lorenzo 1995; Bertoni et al. 1998), o de favorecer el inicio de la transcripción en un paso posterior, después de que la RNA polimerasa ha ocupado el promotor (Sze et al. 2001). Entre las rutas que dependen de este factor sigma se encuentra la ruta de degradación de tolueno y xileno codificada por el plásmido TOL de *P. putida*. Cuando hay inductores en el medio, XylR activa la expresión de esta ruta a partir del promotor *Pu* (Cases et al. 1999). Al igual que sucede con la ruta de degradación de alcanos, superpuesta a la regulación por XylR hay una regulación global, que mantiene la ruta reprimida incluso en presencia de inductores. En la regulación global participan, entre otras, dos proteínas, PtsN (IIA<sup>Ntr</sup>) y PtsO (NPr) (Cases et al. 1999; Cases et al. 2001).

PtsN y PtsO son proteínas similares a fosfotransferasas de la familia PTS (*phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system*). A pesar de que en muchas bacterias el sistema PTS aparece asociado al transporte de azúcares a través de la membrana, en *P. putida* PstN y PtsO no parecen participar en el transporte de glucosa. Se transcriben junto a *rpoN* (gen que codifica  $\sigma^{54}$ ). La ausencia de *ptsN* hace que *Pu* no responda a la represión por glucosa, a pesar de que se mantiene el consumo de este azúcar (Cases et al. 1999). Sin embargo, la ausencia de *ptsO* provoca una inhibición de la actividad de *Pu* incluso en ausencia de glucosa (Cases et al. 2001). Además de participar en la regulación de *Pu*, estas dos proteínas parecen implicadas en la regulación de la producción de polihidroxicanoatos en *P. putida* (Velazquez et al. 2007). Todos estos datos sugieren que PtsN y PtsO forman parte de una ruta de transmisión de señales capaz, al menos, de inhibir la inducción de *Pu* por tolueno o xileno cuando hay glucosa u otros carbohidratos preferidos presentes en el medio.

### **3.-La respiración en *Pseudomonas***

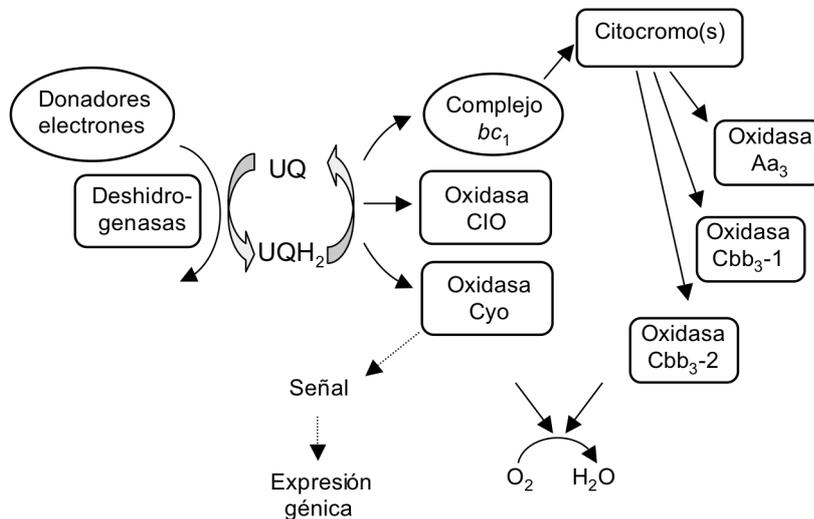
La respiración es un conjunto de procesos redox en los que se transfieren electrones entre diferentes componentes de la cadena respiratoria que tienen distinto potencial de óxido-reducción. Esta transferencia de electrones va acoplada a la producción de energía. Dependiendo del aceptor final de electrones y de la capacidad adaptativa de la bacteria, la cadena respiratoria puede ser más o menos compleja.

En microorganismos la respiración permite la generación de un gradiente electroquímico entre el citoplasma de la célula y el espacio periplásmico. En éste último se mantiene una elevada concentración de  $H^+$  que, aprovechados por la ATP-asa, permite la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico en un proceso acoplado a la entrada de  $H^+$  en el citoplasma. Para esto, en la cadena respiratoria de la membrana plasmática de la célula actúan una serie de complejos metaloproteicos entre los que hay una continua transferencia de electrones acoplados a un bombeo de protones al espacio periplásmico. En esencia, las ubiquinonas de la membrana de la célula son capaces de recoger los electrones donados por distintos compuestos, tales como el NADH, el lactato o el succinato, reduciéndose al mismo tiempo. Desde el ubiquinol, reducido, los electrones pueden reducir directamente a las ubiquinol oxidasas, o, en algunas especies, pueden reducir al complejo *bc1* que, a su vez, puede transferir los electrones a citocromos que los acaban cediendo a distintas citocromo *c* oxidasas (Fig. 3). En el último paso de la cadena respiratoria las citocromo *c* oxidasas reducen el oxígeno a agua. Simultáneamente a esta transferencia de electrones, hay un bombeo de protones al espacio periplásmico, que permite generar el gradiente necesario para la síntesis de ATP. Cuando este gradiente no es lo suficientemente elevado, el proceso se invierte y la ATP-asa funciona hidrolizando ATP y generando de nuevo un gradiente a través de la membrana (Deckers-Hebestreit y Altendorf 1996).



**Figura 3.** Modelo de cadena respiratoria (Hosler et al. 2006). Compuestos como el NADH o el succinato ceden los electrones a las ubiquinonas de la membrana (Q). De ahí son recogidos por el complejo *bc1*, que los cede a los citocromos *c*, y estos a su vez a la citocromo *c* oxidasa correspondiente, que reduce al agua. La ATP-asa aprovecha el gradiente de H<sup>+</sup> generado para sintetizar ATP.

A pesar de que el origen evolutivo de las citocromo oxidadas es confuso (Castresana et al. 1994; Musser y Chan 1998), todas ellas actúan como aceptores de electrones, y permiten a las bacterias colonizar una amplia variedad de medios donde las condiciones cambian con frecuencia. Estos sistemas altamente especializados para respirar les permiten optimizar el rendimiento energético en función de las condiciones de crecimiento (Richardson 2000). En *P. putida*, un microorganismo capaz de sobrevivir en medios con una concentración de oxígeno muy limitada, la cadena de transporte de electrones es extremadamente compleja y posee dos ubiquinol oxidadas, Cyo y CIO, y tres citocromo *c* oxidadas, Cbb3.1, Cbb3.2 y Aa3 (Fig. 4). En *P. aeruginosa* este sistema se complica un poco más, puesto que es capaz de respirar anaerómicamente utilizando nitrato como aceptor final de electrones y puede fermentar arginina o piruvato en condiciones anaeróbicas (Williams et al. 2007).



**Figura 4.** Modelo de cadena de transporte de electrones en *P. putida*, derivado de los genes presentes en el genoma de la cepa KT2440 (Nelson et al. 2002). Los electrones fluyen de la manera ya indicada. Desde Cyo parece que se envía una señal capaz de modificar la expresión de un elevado número de genes.

Las diferencias entre las citocromo oxidasas se basan en su afinidad por el oxígeno, su potencial de oxidación/reducción (traducido en la facilidad que tienen para captar o ceder electrones) y su capacidad para bombear protones al espacio periplásmico. De todas ellas, Cyo es la principal oxidasa terminal de la cadena de transporte de electrones en condiciones de alta aireación, tanto en *P. putida* y *P. aeruginosa* como en *E. coli*. La oxidasa terminal alternativa CIO, que en *E. coli* se denomina Cyo, está presente en estas tres especies bacterianas. Sin embargo, *E. coli* carece de las oxidasas terminales Aa<sub>3</sub>, Cbb<sub>3</sub>.1 y Cbb<sub>3</sub>.2, presentes en *P. putida* y *P. aeruginosa*. En *P. aeruginosa*, CIO, Cbb<sub>3</sub>.1 y Cbb<sub>3</sub>.2 parecen permitir el crecimiento de la bacteria cuando la concentración de oxígeno disminuye hasta concentraciones microaeróbicas (0,4-2% O<sub>2</sub>) y la ausencia de todas ellas no permite el crecimiento en dichas condiciones (Alvarez-Ortega y Harwood 2007).

Diversos resultados indican que la expresión de las diferentes oxidasas terminales de distintos microorganismos, como *Rhodobacter capsulatus*, *P. aeruginosa* y *P. putida*, está coordinada (Swem y Bauer 2002; Morales et al. 2006). La sobreexpresión de CIO en *P. aeruginosa* provoca cambios graves en el metabolismo de la célula (Tavankar et al. 2003) y la respuesta de *P. aeruginosa* a diferentes concentraciones de oxígeno no se produce por la activación de un regulón específico de condiciones microaeróbicas, sino por un cambio continuo en distintos grupos de genes que se superponen (Alvarez-Ortega y Harwood 2007). En *E. coli*, un microorganismo con una cadena respiratoria menos compleja, Cyo se expresa sólo en condiciones de alta aireación, aunque no se ha descrito que participe en ningún proceso de represión catabólica. Se sabe que su expresión se modifica en respuesta a dos reguladores globales: FNR, capaz de responder directamente a las concentraciones de oxígeno, y ArcA, que forma parte de un par regulador ArcB/ArcA donde ArcB es el sensor que responde al oxígeno a través de cambios en las ubiquinonas de la membrana y que modifica al regulador de transcripción ArcA (Cotter et al. 1990; Georgellis et al. 2001; Shalel-Levanon et al. 2005). Cuando disminuye la tensión de oxígeno, la expresión de Cyo también lo hace, y al mismo tiempo se induce otra oxidasa terminal alternativa, Cyd, con mayor afinidad por el oxígeno, de manera que la expresión de ambas oxidasas está coordinada y responde al estado metabólico de la célula. La expresión de Cyd depende a su vez de 3 reguladores globales: FNR, ArcA y HN-S (Govantes et al. 2000).

A pesar de la importancia que en *Pseudomonas* tiene una regulación conjunta y adecuada de toda la cadena de transporte de electrones, se sabe muy poco sobre quién participa en estos procesos y cómo se coordina la expresión de todas las citocromo oxidasas en respuesta a cambios en las condiciones de crecimiento.

#### **4.-Regulación de la expresión de los componentes de la cadena de transporte de electrones**

La regulación de la cadena de transporte de electrones aparece estrechamente ligada a los procesos de óxido-reducción. En el caso de las bacterias, la falta de membranas que separen distintos compartimentos celulares dificulta que pueda haber

más de un estado redox dentro de la misma célula, de manera que no hay posibilidad de optimizar ciertos procesos celulares (Green y Paget 2004). En un único espacio, el citoplasma, deben coexistir gran cantidad de reguladores que sean capaces de integrar señales diferentes aunque relacionadas y que además permitan una rápida respuesta de la célula a los cambios ambientales a los que se puede ver sometida. A pesar de que el citoplasma es un ambiente reductor, debido a las altas concentraciones de compuestos reductores como el glutatión, pueden existir también compuestos que se encuentren en estado oxidado. Así, en condiciones aeróbicas hay parejas redox (como el NADH/NAD<sup>+</sup>) que permanecen mayoritariamente en estado oxidado, debido a una rápida transferencia de los electrones hacia el oxígeno (Green y Paget 2004). Dado que una parte importante de los procesos redox se basa en la presencia de oxígeno, existe un problema añadido, el estrés oxidativo, capaz de causar daños importantes en componentes celulares esenciales. Para evitarlo, las bacterias poseen sensores que les permiten detectar señales redox y derivar respuestas que llevan a modificaciones del metabolismo o a la expresión de proteínas que protegen frente al estrés oxidativo.

Se conocen diversos mecanismos para detectar señales redox donde se ven implicados grupos hemo, flavinas, nucleótidos de piridina, grupos de [Fe-S] o cisteínas presentes en determinado tipo de proteínas. Cada uno de ellos transmite una señal en respuesta a algún tipo de cambio en el estado redox de la bacteria. Entre ellos hay reguladores capaces de responder a cambios en grupos tiol, como Spx de *Bacillus subtilis* (Nakano et al. 2005); a la relación NADH/NAD<sup>+</sup>, como Rex de *Streptomyces coelicolor* (Brekasis y Paget 2003); al estado de óxido-reducción de las ubiquinonas de la membrana, como ArcB/ArcA de *E. coli* (Georgellis et al. 2001); a la concentración de oxígeno en el medio, como FNR de *E. coli* (Crack et al. 2004); o a cambios en una citocromo oxidasa, como PrrB/PrrA en *Rhodobacter sphaeroides* (Oh et al. 2004).

#### 4.1-FNR: un sensor de oxígeno

Los microorganismos pueden adaptar su metabolismo en función de la disponibilidad de oxígeno en el medio. Los más versátiles, capaces de utilizar oxígeno u otros aceptores finales de electrones y de fermentar, pueden seleccionar la forma más adecuada de obtener energía. La respiración aeróbica (con el oxígeno como aceptor final de electrones) se prefiere a la respiración anaeróbica (donde hay

aceptores de electrones diferentes al oxígeno, como el nitrato), que a su vez se prefiere a la fermentación (Green y Paget 2004). En los dos primeros casos, la obtención de energía es por fosforilación oxidativa, mientras que en la fermentación únicamente existe fosforilación a nivel de sustrato. Esta gradación refleja por tanto la preferencia por la manera más eficaz y menos costosa de obtener energía. Dado que la presencia de oxígeno tiene un papel tan importante en el metabolismo celular, son abundantes los reguladores que tienen un grupo de [Fe-S] capaz de responder directa o indirectamente a la presencia o ausencia de oxígeno. Entre ellos se encuentran SoxR, las aconitasas, IscR y FNR (Green y Paget 2004).

FNR (*fumarate and nitrate reductase regulation*) es un regulador transcripcional presente en *E. coli* que pertenece a una familia de reguladores bastante amplia, dentro de los cuales el más característico es CRP (Busby y Ebright 1999; Korner et al. 2003). Son proteínas con capacidad para unirse al DNA y modificar el patrón de expresión de determinados genes en respuesta a una gran variedad de estímulos. Entre ellos se encuentra el oxígeno, al que FNR es capaz de responder gracias a un grupo de [Fe-S]. En ausencia de oxígeno el grupo [4Fe-4S] parece formar una estructura cúbica que permite que FNR dimerice para unirse a los promotores que regula (Lazazzera et al. 1996). A medida que la concentración de oxígeno en el medio se incrementa, el grupo [4Fe-4S] cambia a [2Fe-2S], una estructura plana. Esto provoca a su vez un cambio en la conformación de FNR, que permanece como monómero incapaz de unirse al DNA (Crack et al. 2004). FNR parece estar presente en el citoplasma en concentraciones similares tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Shalel-Levanon et al. 2005). En condiciones anaeróbicas, cuando FNR se encuentra como dímero, funciona como un regulador global, capaz de modificar la expresión de un gran número de genes (Kang et al. 2005), algunos de los cuales también responden a ArcB/ArcA (Shalel-Levanon et al. 2005).

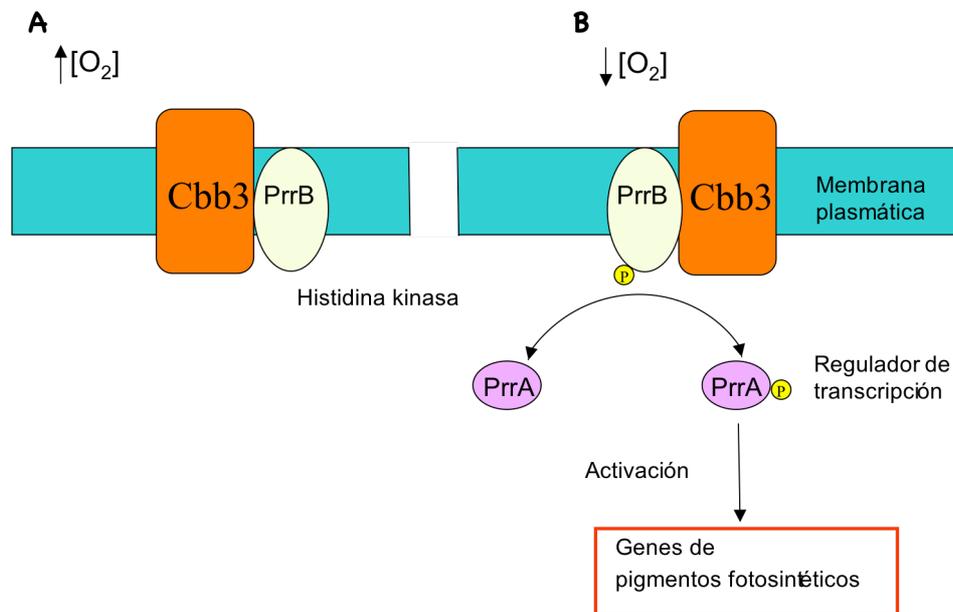
En *P. aeruginosa* hay una proteína llamada ANR que es homóloga a FNR de *E. coli* (Zimmermann et al. 1991; Winteler y Haas 1996). ANR es capaz de regular la expresión de las enzimas necesarias para la respiración con nitrato (Arai et al. 1997; Schreiber et al. 2007) y de algunas oxidasas terminales, entre las que se encuentran CIO y Cbb3.2 (Cooper et al. 2003; Comolli y Donohue 2004). No parece tener efecto alguno sobre Cbb3.1 y no se ha estudiado su efecto sobre las oxidasas terminales Cyo y Aa3. ANR también está presente en *P. putida*, aunque no se ha estudiado su función.

#### 4.2- Proteínas de la familia RegB/RegA, un sistema de regulación redox altamente conservado

*Rhodobacter capsulatus* y *Rhodobacter sphaeroides* son microorganismos capaces de fotosintetizar cuando la concentración de oxígeno en el medio es lo suficientemente baja, entre el 1 y el 3% (Du et al. 1998; Oh et al. 2004). Cuando esto sucede, la célula sintetiza membranas intracitoplásmicas que contienen los fotosistemas necesarios para transformar la luz en energía química. Sin embargo, cuando el oxígeno aparece de nuevo en el medio, hay un rápido descenso en la síntesis de los componentes del aparato fotosintético y un cambio a una forma alternativa de obtención de energía, por medio de la degradación de compuestos orgánicos (Pemberton et al. 1998). Estos fotosistemas, codificados por los operones *puf*, *puc* y *puh*, son estructuras complejas y por lo tanto altamente costosas para la célula. Es por ello que su expresión está sometida a una regulación muy estricta, que también depende de la presencia o ausencia de luz. Estos promotores se activan por medio del par sensor/regulador RegB/RegA únicamente cuando las condiciones de crecimiento son anaeróbicas. RegB es una histidina kinasa con varios dominios hidrofóbicos insertados en la membrana citoplásmica, capaz de autofosforilarse o de funcionar como fosfatasa según las condiciones (Elsen et al. 2004). RegA es el regulador de la respuesta correspondiente. Se han encontrado proteínas muy similares a RegB/RegA en  $\alpha$ - y  $\gamma$ - proteobacterias. En general, estos sistemas sensor/regulador se encargan de controlar la expresión de genes implicados en una amplia variedad de procesos redox como fotosíntesis, fijación de carbono, fijación de nitrógeno, oxidación de hidrógeno, desnitrificación, respiración aerobia y anaerobia, transporte de electrones y aerotaxis (Elsen et al. 2004). Dentro de los múltiples procesos en los que se ven implicados, es especialmente interesante el caso de PrrB/PrrA (homólogos de RegB/RegA) en *R. sphaeroides*.

*R. sphaeroides* es un microorganismo que posee una cadena respiratoria ramificada donde hay, al menos, dos citocromo *c* oxidasas y una quinol oxidasa (Oh y Kaplan 2002). Las citocromo *c* oxidasas, del tipo Aa3 y Cbb3, catalizan la reducción del oxígeno utilizando los electrones procedentes del complejo *bc1*. La oxidasa Aa3 es mayoritaria en condiciones aeróbicas, mientras que Cbb3 es la oxidasa predominante en condiciones limitantes de oxígeno, inferiores al 3% (Oh y Kaplan 2002; Oh et al. 2004). Esta oxidasa es capaz, además, de funcionar como un sensor de O<sub>2</sub> o del estado redox de la bacteria y de recoger el poder reductor en condiciones anaeróbicas

(Oh y Kaplan 2002). En condiciones aeróbicas, el flujo de electrones a través de la oxidasa Cbb3 parece generar una señal represora de los genes implicados en la síntesis de los pigmentos fotosintéticos que es transmitida por las proteínas PrrB/PrrA (Oh y Kaplan 2000; Oh et al. 2004). Cuanto mayor es el flujo de electrones a través de esta oxidasa, mayor es la señal represora transmitida a través de su subunidad catalítica CcoN hacia la proteína sensora PrrB (Kim et al. 2007). La actividad de PrrB se desplaza hacia el modo de fosfatasa, impidiendo por tanto la fosforilación del regulador de transcripción PrrA y que este active los promotores que le corresponden. Por el contrario, cuando la concentración de oxígeno disminuye lo suficiente (y es por tanto menor el flujo de electrones a través de Cbb3), PrrB funciona como kinasa, fosforilando a PrrA que es capaz de activar los genes implicados en fotosíntesis (Fig.5). Dado que Cbb3 es una oxidasa con alta afinidad por el O<sub>2</sub> (Oh y Kaplan 1999), el flujo de electrones a través de Cbb3 en condiciones fisiológicas se ve limitado únicamente cuando la concentración de O<sub>2</sub> es lo suficientemente baja. Incluso en condiciones anaeróbicas hay cantidades suficientes de Cbb3, lo cual permite a *R. sphaeroides* mantener un control transcripcional de los genes fotosintéticos, y garantizar una respuesta inmediata en el caso de que la presión parcial de O<sub>2</sub> se incremente de nuevo (Oh y Kaplan 2001). Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de información que corrobora este modelo, el proceso de regulación no debe ser tan sencillo y hay otros dos modelos que sugieren una regulación más compleja. Uno de ellos propone que la proteína sensora del par regulador RegB/RegA posee un dominio redox muy conservado en otros sensores del mismo tipo (Elsen et al. 2004), lo cual sugiere que estos reguladores deberían responder no sólo a la presencia o ausencia de una citocromo oxidasa, sino también al estado redox de la célula. Dentro de ese dominio, cambios en la Cys 265 implican que RegB funcione como dímero (y fosforile a RegA) o como tetrámero (y permanezca inactiva) (Swem et al. 2003). El otro modelo sugiere que RegB posee un dominio capaz de diferenciar el estado de óxido-reducción de las ubiquinonas de la membrana, y de responder en consecuencia (Swem et al. 2006). Confirmando esta diversidad en la capacidad para responder a un estímulo, se sabe que para poder fijar CO<sub>2</sub> y utilizarlo como fuente de carbono, PrrB/PrrA también funciona como activador de los promotores *cbb<sub>I</sub>* y *cbb<sub>II</sub>*, que codifican los genes necesarios para la fijación de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, al inactivar Cbb3 y crecer las células en condiciones quimioautótrofas, no se observan cambios en la expresión de ninguno de los dos promotores, sugiriendo que PrrB debe responder a algo más que la actividad de Cbb3 (Gibson et al. 2002).



**Figura 5.** Regulación de la expresión de los genes de los pigmentos fotosintéticos en *R. sphaeroides*. La citocromo oxidasa Cbb3 se encuentra en la membrana plasmática de la célula. A) Mientras la concentración de oxígeno se mantiene elevada, Cbb3 evita la fosforilación de PrrB. B) Cuando se produce un fuerte descenso en la presión parcial de O<sub>2</sub>, Cbb3 deja de reprimir la fosforilación de PrrB, que rápidamente fosforila a PrrA. PrrA funciona como un regulador transcripcional capaz de unirse a los promotores de los genes implicados en la biosíntesis de los pigmentos fotosintéticos, activándolos (Oh, J. y Kaplan, S. 2001).

PrrB/PrrA permite, por tanto, un complejo mecanismo de respuesta al estado redox de la bacteria, capaz de actuar como un activador imprescindible de una vía alternativa de obtención de energía más costosa que la respiración desde el punto de vista energético: la fotosíntesis. Además, es capaz de ejercer ese efecto en respuesta a un cambio en la señal transmitida por una oxidasa terminal de la cadena de transporte de electrones.

Por otra parte, en *P. aeruginosa* la expresión de la oxidasa terminal CIO está regulada por un par regulador homólogo a PrrB/PrrA llamado RoxS/RoxR, que parece responder de manera similar a la falta de Cbb3.1 o de Cbb3.2 (Comolli y Donohue

2002). La ausencia de Cbb3.1 o de Cbb3.2, o la presencia de cianuro en el medio de crecimiento (capaz de inhibir todas las citocromo oxidadasas, excepto CIO) supone un incremento en la expresión de CIO, que no tiene lugar si se inactiva RoxR. Estos resultados parecen confirmar que, en *Pseudomonas*, este par sensor/regulador también es capaz de responder a la presencia o ausencia de una citocromo oxidasa, corroborando por tanto que hay una relación importante entre las distintas oxidadasas terminales.

A pesar de los modelos descritos, no hay más información sobre la regulación de la expresión de los componentes de la cadena de transporte de electrones en *P. aeruginosa*. En *P. putida* apenas hay evidencias experimentales sobre este proceso. Esta tesis pretende avanzar en este problema en *P. putida*.

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

En este trabajo se pretenden abordar los siguientes objetivos:

1.- Averiguar si Cyo es la única oxidasa terminal de la cadena de transporte de electrones capaz de enviar una señal que provoque un fenómeno de regulación global de la expresión génica, o si hay otras oxidasas terminales implicadas.

2.- Identificar reguladores capaces de modificar la expresión de Cyo y de otras oxidasas terminales de la bacteria.

3.- Determinar a qué estímulos responden los reguladores identificados, como cambios en la oxigenación o en la fuente de carbono.

4.- Analizar el efecto de los reguladores identificados sobre la represión catabólica.

5.- Averiguar si dichos reguladores, además de modificar la composición de la cadena respiratoria, tienen un efecto más general sobre el transcriptoma celular.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1.-Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las estirpes y plásmidos usados en el desarrollo de este trabajo se enumeran a continuación.

Cepa/plásmido	Descripción	Referencia
<b>Cepas <i>E. coli</i></b>		
CC118 $\lambda$ pir	CC118 lisogenizada con el fago $\lambda$ pir.	(de Lorenzo y Timmis 1994)
ER2566	Cepa para sobreexpresión de plásmidos pTYB	New England Biolabs
HB101	Hospedador de pRK2013	(Sambrook y Russell 2001)
TG1	Hospedador para manipulaciones de DNA y transformaciones.	(Sambrook y Russell 2001)
XL1-Blue	Hospedador para manipulaciones de DNA y transformaciones.	(Sambrook y Russell 2001)
<b>Cepas <i>P. putida</i></b>		
CYTC2	KT2442 con la fusión transcripcional <i>PcyoA::lacZ</i>	(Morales et al., 2006)
CYTC2A	CYTC2 con <i>anr::tet</i>	Este trabajo
CYTC2R	CYTC2 con <i>RoxR::tet</i>	Este trabajo
CYTR1	KT2442 con la fusión traduccional <i>PcyoA::lacZ</i>	(Morales et al., 2006)
CYTR1A	CYTR1 <i>anr::tet</i>	Este trabajo
CYTR1R	CYTR1 <i>RoxR::tet</i>	Este trabajo
KT2440		(Bagdasarian et al. 1981)
KT2440A	KT2440 con <i>anr::tet</i>	Este trabajo
KT2440R	KT2440 con <i>RoxR::tet</i>	Este trabajo
KT2442	Derivado Rif <sup>R</sup> de KT2440	(Franklin et al., 1981)
PBS4	KT2442 con la fusión transcripcional <i>PalkB::lacZ</i> y el gen <i>alkS</i>	(Yuste et al 1998)
PBS4A	PBS4 con <i>anr::tet</i>	Este trabajo
PBS4AA3	PBS4 con <i>aa3::tet</i>	(Morales et al., 2006)
PBS4B1	KT2442 con <i>cyoB::tet</i>	(Dinamarca et al., 2002)
PBS4CB1	PBS4 con <i>ccb3.1::tet</i>	(Morales et al., 2006)
PBS4CB2	PBS4 con <i>ccb3.2::tet</i>	(Morales et al., 2006)
PBS4CO	PBS4 con <i>cio::tet</i>	(Morales et al., 2006)
PBS4Pe1	PBS4 con <i>PetABC::tet</i>	Este trabajo
PBS4R	PBS4 con <i>RoxR::tet</i>	Este trabajo
PBS4S	PBS4 con <i>RoxS::tet</i>	Este trabajo
<b>Plásmidos</b>		
pGEMT-Easy	Ap <sup>R</sup> , vector para clonar fragmentos de PCR	Promega
pGETA	Ap <sup>R</sup> , pGEMT-Easy con el gen <i>anr</i>	Este trabajo
pGETA -Te	Ap <sup>R</sup> , pGEMT-Easy con <i>anr::tet</i>	Este trabajo
pGTEA3	Ap <sup>R</sup> , pGEMT-Easy con <i>aa3</i>	(Morales et al., 2006)
pGTEA3-Te	Ap <sup>R</sup> , pGEMT-Easy con <i>aa3::tet</i>	(Morales et al., 2006)
pGTECB1	Ap <sup>R</sup> , pGEMT-Easy con fragmento de <i>ccb3.1</i>	(Morales et al., 2006)
pGTECB1	Ap <sup>R</sup> , pGEMT-Easy con <i>ccb3.2</i>	(Morales et al., 2006)
pGTECB1-Te	Ap <sup>R</sup> , pGEMT-Easy con <i>ccb3.1::tet</i>	(Morales et al., 2006)
pGTECB2-Te	Ap <sup>R</sup> , pGEMT-Easy con <i>ccb3.2::tet</i>	(Morales et al., 2006)
pGTECi	Ap <sup>R</sup> , pGEMT-Easy con fragmento de <i>cioA</i>	(Morales et al., 2006)
pGTEI-Te	Ap <sup>R</sup> , pGEMT-Easy con fragmento de <i>cioA</i> interrumpido por <i>tet</i>	(Morales et al., 2006)
pKNG101	Sm <sup>R</sup> , <i>sacAB</i> , vector suicida para mutagénesis por intercambio alélico	(Kaniga et al., 1991)

pKNG101A	pKNG101 con <i>anr::tet</i>	Este trabajo
pKNG101-AA3	pKNG101 con <i>aa3::tet</i>	(Morales et al., 2006)
pKNG101-CB1	pKNG101 con <i>cbb3.1::tet</i>	(Morales et al., 2006)
pKNG101-CB2	pKNG101 con <i>cbb3.2::tet</i>	(Morales et al., 2006)
pKNG101-Ci	pKNG101 con <i>cioA::tet</i>	(Morales et al., 2006)
pRK2013	Plásmido <i>helper</i> en conjugaciones tripartitas	(Figurski and Helinski, 1979)
pUJ8	Ap <sup>R</sup> , vector para fusiones transcripcionales al gen <i>lacZ</i>	(de Lorenzo et al., 1990)
pUJ9	Ap <sup>R</sup> , vector para fusiones traduccionales al gen <i>lacZ</i>	(de Lorenzo et al., 1990)
pUJTC2	pUJ8 con promotor <i>PcyoA</i>	(Morales et al., 2006)
pUJTR1	pUJ9 con promotor <i>PcyoA</i> y primeros 13 codones de <i>CyoA</i>	(Morales et al., 2006)
pUT-miniTn5-Km	Km <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , donador suicida de miniTn5	(de Lorenzo & Timmis, 1994)
pYTC2	pUT-miniTn5-Km con <i>PcyoA::lacZ</i>	(Morales et al., 2006)
pYTR1	pUT-miniTn5-Km con <i>PcyoA::lacZ</i>	(Morales et al., 2006)

### Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

Oligonucleótido	Secuencia	Descripción
Aa3-lower	5'-tctcccacgcccctttctga	Amplificación <i>aa3</i> (inv.)
Aa3U-137	5'-gtgcattgctgctgctcta	Amplificación <i>aa3</i> (dir.)
Aa3 1	5'-gccaccccaccgaccaga	PCR de tiempo real
Aa3 2	5'-ggcagcagtgaccaggaagc	PCR de tiempo real
Anr*-D149A-dir	5'-aaatccgcgacgcccagcaaat	Amplificación <i>anr</i> . Mutagénesis dirigida: cambio de D149 por A.
Anr*-int-dir	5'-ggaattccatattgccgagccagtgcaactcg	Amplificación <i>anr</i> . Diana NdeI.
Anr*-int-inv	5'-ggcctcgattgcaccacctg	Amplificación <i>anr</i> . Sin codón de terminación.
Anr-U32	5'-caaccacgacgaccgcatca	Amplificación <i>anr</i> (directo)
Anr-L1392	5'-cgactggaataacgggtaa	Amplificación <i>anr</i> (inverso)
Bc1-U51	5'-gtggtggtgtcagcggctcag	Amplificación <i>petABC</i> (bc1) (dir)
Bc1-L3272	5'-accaggcgaacccgatgaga	Amplificación <i>petABC</i> (bc1) (inv)
Cbb3.1-U483	5'-gcactaccgctaccbcaaga	Amplificación promotor <i>cbb3.1</i> (dir)
Cbb3.2-upper	5'-ggttcggctgaggctgtgac	Amplificación <i>cbb3.2</i> (dir)
Cbb3.2-lower	5'-cttgctgcgagaaatgctg	Amplificación <i>cbb3.2</i> (inv)
CcoN1-dir	5'-gcgcaacaccaaacacatct	Amplificación <i>cbb3.1</i> (dir)
CcoN1S1-inv	5'-ggttccatccacggta	Amplificación promotor <i>cbb3.1</i> (inv)
CcoO1-1	5'-gagaaaacgctcggcctgatgg	PCR de tiempo real
CcoO1-2	5'-gttgacgagcgggttagggc	PCR de tiempo real
CcoO2-1	5'-agaacaagctcgacggcaagg	PCR de tiempo real
CcoO2-2	5'-ttgcaggtacgagc	PCR de tiempo real
CcoP1-inv	5'-gtcacagcctcagccgaacc	Amplificación <i>cbb3.1</i> (inv)
Cio-U139	5'-gtcagcggcaatccaccac	Amplificación promotor <i>cio</i> (inv)
Cio-U1486	5'-tgttggaattgtctgttcg	Amplificación promotor <i>cio</i> (dir)
Cio-U2092	5'-atcaggcggtaggggaagga	Amplificación <i>cio</i> (dir)
Cio-L3001	5'-cggaatcgacatcggaaac	Amplificación <i>cio</i> (inv)
CioA-RT 1	5'-tactgcccgttcgtgtcca	PCR de tiempo real
CioA-RT 2	5'-ggtgcttgagggtattgagg	PCR de tiempo real
Cio-Up2	5'-gccctaggaagggtcgcaagcagattc	Amplif. promotor <i>cio</i> (PAO)
CioAB-shift	5'-ggaattcatctctgatcctgttagggc	Amplif. promotor <i>cio</i> (PAO)
Cyo-1	5'-atccagatcaatcccagcgc	Amplificación promotor de <i>cyo</i> (dir)

Cyo-2	5'-cttttacagaatccgcaaca	Amplificación promotor de <i>cyo</i> (inv)
Cyo dir	5'-ggaattcgcgatgagaagagggaaaag	Amplificación promotor de <i>cyo</i> , diana EcoRI
CyoA inv	5'-ttgtcgcaccccgctga	Amplificación promotor de <i>cyo</i> .
CyoA-RT 1	5'-gctgctggtgtaaatccctg	PCR de tiempo real
CyoA-RT 2	5'-gtgggtggagtgtaggtga	PCR de tiempo real
CyoA-TRC1	5'-cgggatcctcaatcctgctgactcg	Amplificación P <sub>1</sub> de <i>cyo</i> , diana BamHI
CyoA-TRC2	5'-cgggatccagatcagctgcttcaatgc	Amplificación P <sub>1</sub> +P <sub>2</sub> de <i>cyo</i> , diana para BamHI
CyoA-TR1	5'-cgggatccaatatgccaacagctctg	Amplificación P <sub>1</sub> +P <sub>2</sub> de <i>cyo</i> y primeros 13 codones de <i>cyoA</i> . Diana BamHI
Intein Reverse	5'-accatgaccttattaccaacctc	Secuenciar inserto en pTYB2.
RoxR*-A96	5'-gggtactcgcgagcattccaccgcagtg	Amplificación <i>roxR</i> . Mutagénesis dirigida: cambio de A96 por S.
RoxU-1494	5'-caactgctggctgtggctac	Amplificación <i>RoxR</i> (dir)
Rox1-int	5'-ggaattccatagagcgaagaaaaccaggtcg	Amplif. <i>RoxR</i> (dir). Diana NdeI para clonar en pTYB2.
Rox2-int	5'-gcgccgaaccggccgctctg	Amplif. <i>RoxR</i> (inv)
RpoN-1	5'-caacgatgacgacgaatgg	PCR de tiempo real
RpoN-2	5'atcaggtcacggcaatc	PCR de tiempo real
S+R U49	5'-gcgccggtgctgcttcatca	Amplificación <i>RoxS</i> y <i>RoxR</i> (dir)
S+R L2853	5'-ccagcgcaaggatgaccaac	Amplificación <i>RoxS</i> y <i>RoxR</i> (inv)
T7Univ. Primer	5'-taatcgcactactatag	Secuenciar inserto en pTYB2.

## 2.-Medios y condiciones de cultivo

Como medio rico se utilizó Luria Bertani (LB), y como medio definido, medio mínimo de sales M9 (Sambrook y Russell 2001), este último suplementado con elementos traza (Bauchop y Elsdén 1960) y 30 mM de succinato sódico o de citrato sódico como fuente de carbono. Para el medio sólido se añadieron 16 g/l de agar. Para inducir la expresión del promotor *PalkB* se añadió 0,05% de dicitropilcetona (DCPK) como inductor no metabolizable. Para inducir la sobreproducción de ANR\*, RoxR y RoxR\* se añadió 0,3 mM de IPTG.

Las estirpes de *E. coli* se cultivaron a 37°C, excepto para sobreexpresar ANR\*, RoxR y RoxR\*, en cuyo caso la temperatura de incubación fue de 30°C. Las estirpes de *P. putida* se cultivaron a 30°C.

Las concentraciones utilizadas para los distintos antibióticos fueron: ampicilina 100 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, tetraciclina 8-12 µg/ml, estreptomina 50 µg/ml, piperacilina 30 µg/ml. Para detectar el fenotipo *lacZ*<sup>+</sup> en medio sólido se suplementaron las placas con X-gal 0,02%.

### **3.-Técnicas experimentales**

#### *3.1-Extracción de DNA, digestiones y ligaciones*

La extracción de DNA plasmídico se realizó mediante el sistema comercial de purificación “QIAprep Spin Miniprep Kit” (QIAGEN). Para la purificación de fragmentos de DNA se utilizaron: “QIAquick PCR Purification Kit” y “QIAquick Nucleotide Removal Kit” (QIAGEN) o “DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). Las digestiones y ligaciones se realizaron en las condiciones y con los tampones indicados para cada caso por la casa comercial correspondiente.

#### *3.2-Transformación*

Para la preparación de las células de *E. coli* o de *P. putida* competentes y electrocompetentes se siguió el protocolo descrito (Sambrook y Russell 2001). Para estas últimas, con ciertas modificaciones: 10 ml de medio LB se inocularon con la cepa correspondiente y se crecieron 10-14 horas. Se centrifugaron a 8000 g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 0,5 ml de agua destilada. Después de repetir este paso, se resuspendieron en 40 µl de agua destilada y se mantuvieron en hielo hasta electroporar (*Power Pac 300*, BioRad).

#### *3.3-Amplificación de DNA*

Para la amplificación de DNA por PCR se emplearon:

1.-Taq DNA polimerasa (BIOTOOLS) en las condiciones recomendadas por el fabricante con los siguientes ciclos: 5 minutos a 94°C y posteriormente 30 ciclos de: 30 segundos a 50-65°C (en función de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos), 30 segundos a 94°C y entre 30 segundos y 2 minutos a 72°C (en función del tamaño del fragmento a amplificar), más una extensión adicional de 7 minutos a 72°C.

2.-“Expand Long Template PCR system” (ROCHE) para amplificaciones de más de 2 kb en las condiciones recomendadas por el fabricante. Este sistema contiene una mezcla de 2 polimerasas: Taq DNA polimerasa y Tgo DNA polimerasa, esta última con actividad correctora de errores. Los ciclos empleados fueron: 2 minutos a 94°C y posteriormente 30 ciclos de: 30 segundos a 50-65°C (en función de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos), 15 segundos a 94°C y 2-3 minutos a 68°C (en función del tamaño del fragmento a amplificar), más una extensión adicional de 7 minutos a 68°C.

### 3.4-Fusiones transcripcional y traduccional a *lacZ*

Un fragmento de DNA con el promotor *PcyoA* (Dinamarca et al. 2003) se amplificó por PCR utilizando DNA genómico de *P. putida* KT2442 como molde, y los oligonucleótidos *Cyo dir* y *CyoA-TRC2*. El fragmento amplificado corresponde a la región -205 a +308 respecto al punto de inicio de la transcripción, y termina 13 nucleótidos antes del codón de inicio de *cyoA*. Se digirió con EcoRI y BamHI para clonar el fragmento entre los mismos sitios de restricción de pUJ8, diseñado para construir fusiones transcripcionales a *lacZ* (de Lorenzo et al. 1990). El plásmido obtenido se denominó pUJTC2. Para la fusión traduccional de *PcyoA* a *lacZ* se utilizaron *Cyo dir* y *CyoA-TR1*. El fragmento amplificado corresponde a la zona de -205 a +359 con respecto al punto de inicio de la transcripción, e incluye los primeros 13 codones de *cyoA*. Se clonó entre las dianas EcoRI y BamHI de pUJ9, diseñado para construir fusiones traducionales a *lacZ* (de Lorenzo et al. 1990). El plásmido obtenido se denominó pUJTR1. Todos los fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron, para comprobar que no se habían producido mutaciones durante los procesos de amplificación. Las fusiones transcripcional y traduccional se escindieron como un fragmento NotI de pUJTC2 y pUJTR1, respectivamente, y se clonaron en el sitio NotI del plásmido suicida pUT-mini-Tn5-Km (de Lorenzo et al. 1990), obteniendo los plásmidos pYTC2 y pYTR1 respectivamente. Estos plásmidos suicida se utilizaron posteriormente para llevar las fusiones transcripcional y traduccional al cromosoma de *P. putida* KT2442 en conjugaciones triparentales del modo ya descrito (de Lorenzo y Timmis 1994), utilizando el plásmido pRK2013 (Figurski y Helinski 1979) como donadora de las funciones de transferencia. En cada caso se aislaron cuatro cepas que habían movilizado la fusión mini-Tn5 al cromosoma, se seleccionaron y se comprobó la expresión del gen *lacZ*. Las cepas representativas se seleccionaron y

denominaron CYTC2 (fusión transcripcional *PcyoA::lacZ*) y CYTR1 (fusión traduccional *PcyoA'-lacZ*).

### 3.5-Obtención de estirpes mutantes en cepas de interés

La cepa de *P. putida* PBS4 (Yuste et al. 1998) deriva de la cepa KT2442. Lleva insertada en el cromosoma una fusión transcripcional de la ruta de degradación de alcanos del promotor de *PalkB* al gen *lacZ* y el gen *alkS*, que codifica el activador transcripcional del promotor *PalkB*. Las cepas de *P. putida*, PBS4CO, PBS4AA3, PBS4CB1, PBS4CB2 y PBS4Pe1 derivan de PBS4 por inactivación de los genes que codifican para las oxidasas terminales CIO, Aa3, Cbb3.1, Cbb3.2 y el complejo *bc1* respectivamente (Morales et al. 2006). La construcción de las distintas cepas fue en todos los casos por intercambio alélico (Kaniga et al. 1991).

#### 3.5.1.-Estirpes mutantes en citocromo oxidasas:

PBS4CO. Para inactivar el gen *cioA*, el extremo 5' del gen se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos *Cio-U2092* y *Cio-L3001*, y se clonó en el vector pGEMT-Easy (Promega), obteniendo pGTECi. El cassette de resistencia a tetraciclina se obtuvo como fragmento *SmaI* del vector pUT-mini-Tn5-tet (de Lorenzo et al. 1990) y se insertó en el punto de restricción *NarI* presente en la secuencia *cioA*. Los extremos se hicieron romos utilizando DNA polimerasa I (fragmento Klenow). Se obtuvo el plásmido pGTEi-Te. El fragmento *cioA* con el gen *tet* se escindió de pGTEi-Te utilizando *NotI* y se insertó en el sitio *NotI* de pKNG101, obteniendo pKNG101-Ci. Este plásmido se introdujo en *P. putida* PBS4 para inactivar el gen *cioA* por intercambio alélico del modo ya descrito (ver pag. 36). La cepa resultante se denominó PBS4CO.

PBS4CB1. Para inactivar los genes que codifican la oxidasa Cbb3.1, el fragmento de DNA que contiene la secuencia correspondiente a *ccoN1O1Q1P1* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos *CcoN1-dir* y *CcoP1-inv* y se clonó en el vector pGEMT-Easy dando pGTECB1. Este plásmido se digirió con *RsrII* y *BstBI* para eliminar un fragmento que incluyera el extremo 3' de *ccoN1*, la secuencia completa de los genes *ccoO1Q1* y el extremo 5' de *ccoP1*. Los extremos se hicieron romos utilizando T4 DNA polimerasa para insertar el cassette *tet* de la manera ya descrita. El plásmido resultante, pGTECB1-Te, se digirió con *NotI* y el fragmento con la secuencia *ccoN1':tet::ccoP1* se insertó en el sitio *NotI* de pKNG101 obteniendo el

plásmido pKNG101-CB1. Este plásmido se introdujo en *P. putida* PBS4 para inactivar los genes correspondientes a Cbb3.1 por intercambio alélico. La cepa resultante se denominó PBS4CB1.

PBS4CB2. Para inactivar los genes que codifican la oxidasa Cbb3.2, el fragmento de DNA que contiene la secuencia correspondiente a *ccoN2O2Q2P2* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos *Cbb3.2-upper* y *Cbb3.2-lower* y se clonó en el vector pGEMT-Easy obteniendo pGTECB2. Este plásmido se digirió con PshAI y SmaI para eliminar un fragmento que incluyera el fragmento *ccoN2O2Q2* y el extremo 5' de *ccoP2*, que fue sustituido por el mismo cassette *tet* mencionado anteriormente, obteniendo pGTECB2-Te. El fragmento que contenía el resto de la secuencia de *cbb3-2* y el gen *tet* se escindió de pGTECB2-Te y se clonó en el sitio NotI de pKNG101 para obtener el plásmido pKNG101-CB2. Este plásmido se introdujo en *P. putida* PBS4 para inactivar los genes correspondientes a Cbb3.2 por intercambio alélico. La cepa resultante se denominó PBS4CB2.

PBS4A3. Para inactivar los genes que codifican la oxidasa terminal Aa3, el fragmento de DNA que contiene los genes PP0103, PP0104, PP0105 y PP0106 se amplificó por PCR con los oligonucleótidos *Aa3U-137* y *Aa3-lower* y se clonó en pGEMT-Easy dando pGTEA3. Después de digerirlo con PshA1 el fragmento de DNA que contenía el extremo 3' de PP0103, la secuencia completa de los genes PP0104 y PP0105 y el extremo 5' de PP0106 se sustituyó por el mismo cassette *tet*, obteniendo pGTEA3-Te. El fragmento de DNA que contenía el resto de la secuencia de los genes PP0103 y PP0106 se escindió de pGTEA3-Te con NotI y se clonó en el sitio NotI de pKNG101, obteniendo pKNG101-AA3. El plásmido se introdujo en *P. putida* PBS4 para inactivar la oxidasa *aa3* por intercambio alélico de la manera ya descrita. La cepa resultante se denominó PBS4A3.

PBS4Pe1. Para inactivar los genes que codifican la ubiquinol citocromo c reductasa (complejo *bc<sub>1</sub>*) se amplificó el operón completo a partir de DNA genómico de KT2442 empleando los oligonucleótidos *Bc1-U51* y *Bc1-L3272*. Se clonó en pGEMT-Easy, obteniendo pGETBC1. Se digirió con BamHI y con HindIII (que permiten deletar 1,5 kb del operón). Se trató con DNA polimerasa I (fragmento Klenow) para hacer extremos romos, y se inactivó con el mismo cassette *tet* descrito anteriormente, obteniendo el plásmido pGETBC1-Te. El fragmento de DNA que contenía el resto del complejo *bc<sub>1</sub>* inactivado con el cassette *tet* se escindió de pGETBC1-Te con NotI y se clonó en el sitio NotI de pKNG101, obteniendo pKNG101-BC1. El plásmido se

introdujo en *P. putida* PBS4 para inactivar el complejo *bc<sub>1</sub>* por intercambio alélico de la manera ya descrita. La cepa resultante se denominó PBS4Pe1.

### 3.5.2.-Estirpes mutantes en reguladores:

Para inactivar el regulador ANR se amplificó el fragmento de DNA correspondiente a partir de DNA genómico de KT2442 utilizando los oligonucleótidos *Anr-U32* y *Anr-L1392*. Se clonó en pGEMT-Easy obteniendo pGETA. Para inactivar *anr* se digirió con RsrII, se hicieron extremos romos con T4 DNA polimerasa y se utilizó el mismo cassette *tet* descrito anteriormente, obtenido con SmaI. El gen *anr* inactivado por el cassette *tet* se escindió de pGETA-Te utilizando EcoRI, y se clonó en el sitio SmaI de pKNG101 después de hacer extremos romos con T4 DNA polimerasa. El plásmido resultante, pKNG101-A se introdujo en las cepas PBS4, CYTC2, CYTR1 y KT2440 obteniendo PBS4A, CYTC2A, CYTR1A y KT2440-A respectivamente por intercambio alélico de la manera ya descrita.

Para inactivar *roxS* y *roxR*, se amplificó el fragmento de DNA que contiene los dos genes a partir de DNA genómico de KT2442 utilizando los oligonucleótidos *S+R U49* y *S+R L2853*. Se clonó en pGEMT-Easy, obteniendo pGETRS. Para inactivar *roxR*, se amplificó este gen a partir de pGETRS utilizando *Rox-U1494*, y *S+R L2853*, y se clonó en pGEMT-Easy, obteniendo pGETR. Para inactivar *roxR*, se digirió con XhoI, se hicieron extremos romos con DNA polimerasa I (fragmento Klenow), y se interrumpió con el cassette *tet* ya descrito obtenido por SmaI, obteniendo pGETR-Te. El fragmento *roxR* inactivado con *tet* se digirió con NotI para clonarlo en el sitio NotI de pKNG101, obteniendo pKNG101-R. El plásmido resultante se introdujo en las cepas PBS4, CYTC2, CYTR1 y KT2440 de la manera ya descrita, obteniendo PBS4R, CYTC2-R, CYTR1-R y KT2440-R respectivamente. Para inactivar *roxS* se digirió pGETRS con PshAI y BstEII, se eliminó un fragmento de 700 pb, y se religó con T4 DNA ligasa, obteniendo pGETRES. Para confirmar que la delección había mantenido la fase de lectura y no había afectado a la transcripción de *roxR*, se secuenció. Posteriormente, se digirió con BsrGI, los extremos se hicieron romos con DNA polimerasa I (fragmento Klenow) y se ligó al cassette *tet* ya descrito anteriormente, obteniendo pGETRES-Te. Posteriormente el fragmento *tet-ΔroxS-roxR* se escindió utilizando NotI para clonarlo en el sitio NotI de pKNG101, obteniendo pKNG101-ES. El plásmido resultante se introdujo en la cepa PBS4 de la manera ya descrita, obteniendo PBS4S.

### 3.6-Ensayos de $\beta$ -galactosidasa

Un cultivo en fase estacionaria de la cepa de interés se diluyó hasta una densidad óptica ( $A_{600}$ ) de 0.04 en medio LB o en medio mínimo suplementado con succinato o citrato 30 mM como única fuente de carbono. En los casos indicados, se añadió DCPK 0,05% (v/v) para inducir la expresión del promotor *PalkB*. Las células se cultivaron a 30°C, en matraces de 50 ml con un volumen de 20 ml de medio y una agitación de 250 r.p.m. A distintos tiempos se tomaron alícuotas para medir la actividad  $\beta$ -galactosidasa del modo ya descrito (Miller 1972), utilizando ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosido) como sustrato. Se realizaron al menos 3 ensayos independientes. Para los ensayos en condiciones semiaeróbicas, se utilizaron matraces de 50 ml con 40 ml de LB y una agitación de 125 r.p.m.

### 3.7-Extracción de RNA

Para la purificación de RNA total de los cultivos bacterianos se emplearon dos métodos:

1.- Tri Reagent-LS (Molecular Research Centre). El DNA residual se eliminó por tratamiento con DNasa libre de RNasa (Ambion), y posteriormente se volvió a purificar pasándolo por las columnas de "RNeasy Mini Kit" (QIAGEN).

2.- "RNeasy Mini Kit" (QIAGEN). El DNA residual se eliminó por tratamiento con TURBO-DNA free (Ambion).

La pureza del RNA se determinó midiendo la relación  $A_{260nm}/A_{280nm}$  y su concentración a partir de  $A_{260nm}$  empleando un Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. Además, se analizó por electroforesis en gel de agarosa para determinar su integridad.

### 3.8-Condiciones de crecimiento para la purificación de RNA

Para obtener RNA de fase exponencial ( $A_{600} = 0,5$ ) o de fase estacionaria ( $A_{600} = 2,2$ ) las células se cultivaron a 30°C en matraces de 250 ml con 30 ml de LB y 220

r.p.m. de agitación. En medio mínimo con succinato como única fuente de carbono se utilizaron las mismas condiciones de crecimiento hasta fase exponencial más tardía ( $A_{600} = 0,8$ ). En el caso de fase exponencial se centrifugaron 25 ml de cultivo a 8000 g durante 10 minutos, en el de fase estacionaria, 2 ml. Se procesaron al menos 3 muestras de cada cepa según protocolo de RNeasy (Qiagen).

Para obtener RNA de células cultivadas con exceso o en condiciones limitantes de oxígeno se utilizó un reactor BIOSTAT<sup>®</sup> MD con una botella de reacción M2 de 2 l, manteniendo un volumen constante de 1 l de medio LB. Para el crecimiento en condiciones limitantes de oxígeno, a un 40% de saturación de aire, el medio de cultivo se burbujeó con una mezcla estéril de aire y nitrógeno al 99,8%. El flujo de entrada de la mezcla de gases al cultivo se controló automáticamente con el sistema de control del equipo. Para obtener un cultivo con condiciones saturantes de oxígeno, el equipo se ajustó para mantener un nivel constante de 100% de saturación de aire (21% O<sub>2</sub>). El porcentaje de oxígeno durante el crecimiento de las células se registró con un sensor de oxígeno INGOLD previamente calibrado con 99,8% de nitrógeno (0% O<sub>2</sub>) y a continuación con 100% de aire. Cuando las células alcanzaron una  $A_{600} = 0,5$ , se recogieron muestras de 25 ml de cultivo a las que se añadió un 5% de fenol-etanol (5%-95%) para estabilizar el RNA. Posteriormente, las muestras se procesaron de la manera ya descrita (se procesaron al menos 2 muestras recogidas de un mismo cultivo). Para cada cepa y condición de crecimiento el RNA se trató con TURBO DNA-asa (Ambion<sup>®</sup>) hasta eliminar el DNA genómico restante. La ausencia de DNA se comprobó utilizando los oligonucleótidos de *rpoN* en una PCR sobre la muestra de RNA. En todos los casos, se comprobó la integridad del RNA por medio de electroforesis en gel de agarosa.

### 3.9-PCR cuantitativa de tiempo real

La obtención de cDNA se hizo partiendo de 10 µg de RNA utilizando el “High Capacity cDNA Archive kit” (*Applied Biosystems*) con hexanucleótidos como cebadores. El cDNA sintetizado se empleó como molde para la PCR de tiempo real donde los oligonucleótidos empleados para cada citocromo oxidasa fueron: CyoA-RT 1 y 2 para *cyo*; CcoO1-RT 1 y 2 para *cbb3.1*; CcoO2-RT 1 y 2 para *cbb3.2*; CioA 1 y 2 para *cio* y aa3.2-RT 1 y 2 para *aa3* ya descritos (Morales et al. 2006). La PCR de tiempo real se llevó a cabo utilizando SYBR Green PCR master mix (*Applied Biosystems*) y 0,2 µM de cada oligonucleótido en un 7300 Real-time PCR System

(Applied Biosystems). De manera estándar, los ciclos de PCR empleados fueron: 10 minutos de desnaturalización a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C donde se midió una única señal fluorescente por ciclo, y un ciclo final donde se establece un gradiente de temperatura para obtener una curva de desnaturalización de DNA que permite conocer si ha habido un único producto de PCR. El tamaño de los productos de PCR fue de 100 a 245 pares de bases. Se hizo una curva patrón para cada amplicón a partir de una primera dilución que correspondía a un décimo del cDNA original y empleando sucesivas diluciones de un quinto cada una. Cada PCR de la curva patrón se realizó por duplicado. Simultáneamente, se hizo una PCR de diluciones adecuadas de cada una de las muestra consideradas, de manera que la expresión de cada gen correspondiera al rango de la curva patrón realizada. En este caso, cada PCR se realizó por triplicado. Los resultados se normalizaron a partir de la expresión de *rpoN*, que permanece constante a lo largo de la fase de crecimiento (Yuste et al. 2006).

### 3.10-Microarrays

Para el análisis del transcriptoma se utilizaron los *microchips* de *P. putida* *Genome Oligonucleotide Array* impresos por *Progenica*. Este *microchip* contiene oligonucleótidos de 50 pb que corresponden a las 5.557 fases de lectura abierta (ORFs) de *P. putida* (Yuste et al. 2006). La hibridación, procesamiento y análisis estadístico de los resultados se realizó en la unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología, siguiendo los protocolos descritos (Yuste et al. 2006).

### 3.11-Purificación de membranas y cuantificación de citocromo oxidasa

Para purificar membranas se inocularon 2,5 ml de cultivo saturado de cada cepa de interés en 500 ml de medio LB en un matraz de 2 l, y se incubaron a 220 r.p.m. y a 30°C. Se siguió el crecimiento hasta el inicio de la fase estacionaria ( $A_{600nm}=2$ ). Alcanzada esta absorbancia, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se conservó a -20°C hasta procesar las membranas, para lo cual se resuspendieron en un tampón con 100 mM fosfato potásico pH 7,0 y 5 mM  $MgCl_2$  enfriado a 4°C. Las células se rompieron pasándolas dos veces por una French Press. Se centrifugaron 15 minutos a 10.000 g (4°C) para eliminar los restos de células no rotas y el sobrenadante se centrifugó 60 minutos a 100.000 g (4°C) y se

resuspendió en el mismo tampón. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método Bradford (Bradford 1976) y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La concentración de proteína se igualó en todas las muestras. El análisis del espectro de las membranas se llevó a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu MP-2000 de doble haz. Los espectros se midieron a temperatura ambiente, donde una de las muestras se redujo añadiendo ditionito sódico y la otra se oxidó empleando persulfato amónico para dar lugar a un espectro de absorción de membranas reducidas menos oxidadas. El contenido de citocromo oxidasa se estimó según la ley de Lambert Beer a partir de los coeficientes de extinción molar descritos para *P. putida* (Sweet y Peterson 1978), donde citocromo *c*, 552-540 nm,  $\epsilon=19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y citocromo *b*, 560-575 nm,  $\epsilon=22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.12-Mutagénesis dirigida, sobreexpresión y purificación de las proteínas Anr\*, RoxR y RoxR\*

Para mutar los aminoácidos adecuados en Anr y RoxR que permiten trabajar con ambas proteínas en condiciones aeróbicas, se siguió el método descrito (Chen y Przybyla 1994). En ambos casos, se llevaron a cabo dos PCR a partir de DNA genómico de *P. putida* KT2442 donde el oligonucleótido directo lleva una diana NdeI. El producto final de las dos PCR (después de hacer romo el extremo 3' con T4 DNA polimerasa, y digerir con NdeI) se clonó en pTYB2 entre los sitios de restricción NdeI y SmaI, y se secuenció con T7 "Universal Primer" e "Intein Reverse" (*New England Biolabs*) para asegurarse de que cada clon llevaba únicamente la mutación deseada. Para Anr\* (proteína con un cambio de Asp 149 por Ala), en una primera PCR se utilizaron los oligonucleótidos Anr\*-D149A-dir y Anr\*-int-inv. En la segunda PCR, la décima parte del producto de la primera PCR (purificada con QIAquick PCR purification kit, *Qiagen*) se empleó para amplificar Anr\*, utilizando como oligonucleótido directo Anr\*-int-dir. Para RoxR, se emplearon los oligonucleótidos Rox1-int y Rox2-int (con iguales dianas). Y para RoxR\* (proteína con un cambio de Ala 96 por Ser) en una primera PCR se utilizaron los oligonucleótidos RoxR\*-A96 y Rox2-int. Al igual que con Anr\*, en la segunda PCR se empleó la décima parte del producto de la primera PCR con el oligonucleótido Rox2-int.

Las proteínas Anr\*, RoxR y RoxR\* clonadas en pYTYB2 en ER2566 se sobreexpresaron de la manera ya descrita (Comolli y Donohue 2002). Cuatrocientos ml de LB suplementados con ampicilina, en un matraz de 2 l, se inocularon con 5 ml de cultivo saturado de cada cepa de interés y se cultivaron a 37°C y 250 r.p.m. hasta alcanzar una  $A_{600nm}$  de 0,6-0,7. Alcanzada esta densidad, se añadió al medio 0,3 mM de IPTG para inducir la expresión de las proteínas y se modificaron las condiciones de cultivo: 220 r.p.m. a 30°C durante 4 horas y 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 6.000 g durante 10 minutos. Posteriormente, las células se resuspendieron en 500 mM NaCl, 20 mM HCl y 1 mM EDTA y se rompieron empleando un sonicador LabSonic High Power (B. Braun) a 4°C o usando una French Press, después de lo cual se añadió Tritón X-100. Posteriormente se dejaron 30 minutos en hielo hasta centrifugar 30 minutos a 10.000 g. El sobrenadante se pasó por una columna de afinidad de quitina, a 4°C. Se hizo un lavado rápido con el tampón descrito al que se añadió 100 mM DTT y se dejó un mínimo de 16 horas a 4°C en dicho tampón para permitir el corte de la proteína en el extremo C-terminal. Transcurrido este tiempo, las proteínas se eluyeron, se dializaron empleando PD-10 desalting column (GE Healthcare) frente a un tampón con 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 50 mM KCl, y se concentraron por medio de un Centricon Amicon Ultra (Millipore). Se cuantificaron en Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, y se añadió 1 mM DTT y 25% glicerol para conservar a -70°C hasta su uso.

### *3.13-Ensayos de retraso en gel, footprinting con DNasa I e interferencia por radical hidroxilo*

El fragmento de DNA conteniendo cada promotor estudiado se amplificó por PCR, donde únicamente uno de los dos oligonucleótidos utilizados estaba marcado radiactivamente. En todos los casos, el oligonucleótido correspondiente se marcó en el extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP por medio de T4 polinucleótido kinasa. El fragmento adecuado de DNA marcado se separó de los fragmentos inespecíficos en un gel desnaturizante de urea 7M-poliacrilamida 6%, se cortó y se eluyó durante la noche en un tampón que contenía 0,5 M NH<sub>4</sub>AcO, 0,1% SDS y 1 mM EDTA. Las condiciones de incubación de cada proteína con el fragmento de DNA correspondiente fueron: en 20  $\mu$ l, 0,1 nM DNA marcado en un extremo, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 2  $\mu$ g poli[d(I-C)] como competidor inespecífico. En el caso de ANR\* se añadió también DTT 25 mM. Para los ensayos de retraso en gel se incubó la proteína con el DNA durante 20 minutos, después de lo cual se añadieron 4  $\mu$ l de 30% glicerol. La muestra

se enfrió en hielo y los complejos DNA–proteína se resolvieron por electroforesis en un gel no desnaturizante de 6% poliacrilamida (37,5:1 acrilamida:bisacrilamida) a 120 mV. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C en tampón 0,5x TBE. Para los ensayos de *footprinting* con DNasa I, proteína y DNA se incubaron como se ha indicado para los ensayos de retraso en gel. Tras 20 minutos, se añadió DNasa I (0,05 U) y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró con EDTA 20 mM, se eliminó la proteína de cada muestra por extracción con fenol, y se precipitó el DNA con 0,3 M acetato sódico y 2,5 volúmenes de etanol. Las muestras se analizaron por electroforesis en un gel desnaturizante de urea 7M-poliacrilamida al 6% o al 8% a 35 W, se fijaron con ácido acético 10% y se secaron para exponer en *Phosphor Imager* o en película.

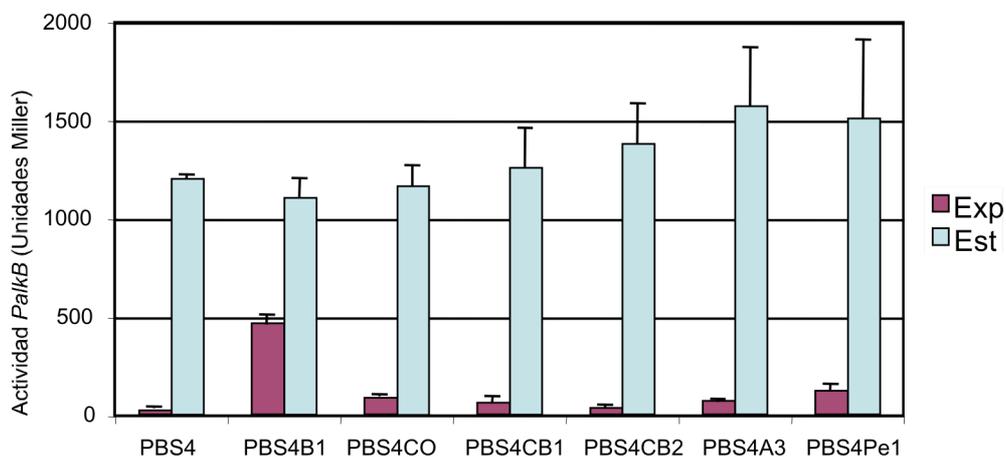
## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

### 1.- Efecto de la inactivación de las oxidasas terminales CIO, Aa3, Cbb3.1, Cbb3.2 y del complejo *bc1* en la inducción de la ruta de degradación de alcanos

La inducción de la ruta de degradación de alcanos codificada por el plásmido OCT de *P. putida* se inhibe fuertemente mientras las células crecen exponencialmente en un medio rico como el LB, aunque haya alcanos en el medio (Yuste et al. 1998). Esta represión se pierde parcialmente al inactivar la ubiquinol oxidasa Cyo (Dinamarca et al. 2002), lo cual sugiere que desde Cyo se envía una señal represora que, de una forma cuyos detalles moleculares aún no se entienden, termina en un efecto de regulación de la expresión génica. Como se ha descrito en la introducción, se sabe que la oxidasa terminal Cbb3 de *R. sphaeroides* es capaz de transmitir señales reguladoras que modifican el patrón de expresión de genes importantes en el metabolismo celular (Oh et al. 2004). Sin embargo, como la expresión de las diferentes oxidasas terminales está coordinada, es posible que alguna de las otras oxidasas terminales de la bacteria, además de Cyo, también pueda estar implicada. Puede que el efecto de Cyo sea indirecto y refleje el hecho de que su ausencia lleva a que se modifiquen los niveles de otras oxidasas terminales, que sean quienes realmente transmiten la señal reguladora. Con objeto de comprobar si Cyo es el componente de la cadena respiratoria del que parte la señal represora, se ha inactivado selectivamente cada una de las demás oxidasas terminales, y el complejo *bc1*, en la estirpe de *P. putida* PBS4 (Yuste et al. 1998), que contiene en el genoma una fusión transcripcional del promotor *PalkB* a *lacZ* y el gen *alkS* (regulador transcripcional que activa al promotor *PalkB* en presencia de alcanos). Se eligió esta bacteria porque permite analizar fácilmente la actividad del promotor *PalkB* y el efecto que la represión catabólica tiene sobre él. Para que este promotor se active se necesitan la proteína reguladora AlkS y la presencia de un alcano, o del análogo no metabolizable DCPK. Las oxidasas terminales CIO, Aa3, Cbb3.1, Cbb3.2 y el complejo *bc1* se inactivaron individualmente en *P. putida* PBS4 por intercambio alélico con un gen interrumpido por un cassette *tet*, obteniendo las cepas PBS4CO, PBS4A3, PBS4CB1, PBS4CB2 y PBS4Pe1, respectivamente. Estas estirpes se cultivaron en

medio rico LB en presencia y ausencia del inductor DCPK, y se midió la actividad del promotor *PalkB* mediante ensayos de  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 6. Como se ha mencionado, la actividad del promotor *PalkB* en la cepa PBS4 creciendo exponencialmente en medio LB con DCPK permanece reprimida durante la fase exponencial de crecimiento, debido a la inhibición ejercida por el control global. Esta inhibición se pierde cuando la célula entra en fase estacionaria, momento en el que la expresión de *PalkB* se incrementa rápidamente. Al inactivar Cyo (PBS4B1) se pierde parcialmente ese efecto inhibitorio, y los niveles de  $\beta$ -galactosidasa se incrementan unas 10 veces (Fig. 6) (Dinamarca et al. 2002).



**Figura 6.** Efecto de la inactivación de las distintas oxidasas terminales sobre la expresión de la ruta de degradación de alkanos. Las cepas de *P. putida* utilizadas derivan de PBS4, que contiene una fusión transcripcional de *PalkB* a *lacZ* y el gen *alkS* en el cromosoma. Las estirpes PBS4, PBS4B1 (Dinamarca et al. 2002), PBS4CO (carece de CIO), PBS4CB1 (sin Cbb3.1), PBS4CB2 (sin Cbb3.2), PBS4A3 (sin Aa3) y PBS4Pe1 (complejo *bc1* inactivado) se cultivaron en medio LB con DCPK para inducir la expresión de *PalkB*. Cuando alcanzaron una  $A_{600nm}$  de 0,6-0,8 (fase exponencial-Exp) o de 2 (entrada en fase estacionaria-Est), se midió la actividad  $\beta$ -Galactosidasa. Los valores mostrados corresponden a una media de, al menos, tres ensayos independientes.

La inactivación selectiva de las oxidasas CIO, Aa3, Cbb3.1, Cbb3.2 o del complejo *bc1* no modifica apreciablemente el patrón de expresión de *PalkB* en células creciendo exponencialmente en medio LB (ni en medio mínimo con succinato o con citrato como fuente de carbono, resultados no mostrados). En fase estacionaria, la represión por control global ejercida sobre *PalkB* se pierde, tanto en la cepa silvestre PBS4 como en las estirpes mutantes correspondientes. Esto parece indicar que ninguna de estas cuatro oxidasas terminales, ni el complejo *bc1*, ejercen un efecto apreciable sobre el mecanismo de control global que reprime a la ruta de degradación de alcanos. Por lo tanto, dentro de la cadena de transporte de electrones de *P. putida* únicamente la ubiquinol oxidasa Cyo parece ser importante en este control global.

## **2.- Regulación de la expresión de las oxidasas terminales de la cadena de transporte de electrones de *P. putida***

Trabajos anteriores han indicado que la expresión de los genes que codifican para la oxidasa terminal Cyo está regulada y varía dependiendo de los niveles de oxígeno en el medio y de la fuente de carbono que se esté utilizando (Dinamarca 2003; Dinamarca et al. 2003). Sin embargo, no se sabe qué factores son los responsables de esta regulación. Dada la importancia de esta oxidasa terminal en la regulación global de la expresión génica, se han buscado reguladores que pudiesen controlar los niveles de Cyo. Como los niveles de cada oxidasa terminal deben de estar coordinados con los de las demás oxidasas terminales para conseguir una composición óptima de la cadena de transporte de electrones, se ha analizado el efecto de estos reguladores no sólo sobre la expresión de Cyo sino de las demás oxidasas terminales de *P. putida*. Este análisis se ha realizado de dos formas. Por un lado, mediante PCR de tiempo real se ha analizado cómo varían los niveles de mRNA de cada oxidasa terminal al inactivar una serie de reguladores que podían controlar la expresión de Cyo. Posteriormente, se han construido fusiones transcripcionales y traduccionales del primer gen del operón *cyo* al gen indicador *lacZ*, y se han utilizado para realizar un análisis complementario, más amplio, del efecto de los reguladores seleccionados sobre la actividad de los genes *cyo*. Finalmente, para ver hasta qué punto los niveles de Cyo se traducen en un efecto de regulación global de la expresión

génica, se ha analizado el efecto de los reguladores de Cyo en el control global de la expresión génica, utilizando como sistema modelo el promotor *PalkB* de la ruta de degradación de alcanos de *P. putida*. Además de esto, se ha analizado el efecto de inactivar estos reguladores en el transcriptoma de la célula por medio de microarrays.

Para identificar reguladores que pudiesen modular los niveles de Cyo se buscaron proteínas capaces de controlar la expresión de componentes de la cadena de transporte de electrones en respuesta a los niveles de oxígeno en otros microorganismos, y que estuviesen presentes en el genoma de *P. putida*. En *E. coli*, el regulador FNR es un sensor de oxígeno que permanece en el citoplasma en estado oxidado cuando hay oxígeno en el medio (Lazizzera et al. 1996). Cuando las concentraciones de este disminuyen, FNR pasa a un estado reducido y dimeriza. Como consecuencia, es capaz de unirse a secuencias específicas del DNA, provocando fuertes cambios en el metabolismo celular (Kang et al. 2005). En el caso de *P. aeruginosa* existe un homólogo de FNR, llamado ANR, que parece estar implicado en la regulación de la oxidasa terminal CIO en esta bacteria (Comolli et al. 2002). En *P. putida* se desconoce qué factores regulan la expresión de Cyo y del resto de las oxidasas, pero se sabe que la expresión de todas ellas está coordinada (Morales et al. 2006). Con objeto de estudiar el efecto de ANR sobre todas las oxidasas terminales, para comprender su efecto sobre la expresión de Cyo y *PalkB*, y para averiguar si la proteína ANR de *P. putida* realmente funciona como un regulador global capaz de modificar el transcriptoma de la célula, se ha inactivado el gen *anr* en diferentes estirpes, lo que ha permitido determinar la función de esta proteína en la coordinación de la expresión de las diferentes oxidasas terminales de la bacteria.

Otro sistema regulador que podría coordinar la expresión de los componentes de la cadena de transporte de electrones es el par sensor/regulador RoxS/RoxR. En *P. aeruginosa* este par sensor/regulador es capaz de responder a una disminución en la concentración de oxígeno, causando la activación de la ubiquinol oxidasa CIO (Comolli y Donohue 2002). Las proteínas RoxS/RoxR también están presentes en *P. putida*, pero se desconoce si responden a oxígeno y si están implicadas en la regulación de Cyo o de otros componentes de la cadena de transporte de electrones. Además, se sabe que el par sensor/regulador PrrB/PrrA de *R. sphaeroides*, homólogo a RoxS/RoxR, es capaz de activar los genes implicados en fotosíntesis en respuesta a una fuerte disminución en la concentración de oxígeno. Según este modelo, la citocromo oxidasa Cbb3 es capaz de transmitir una señal represora a PrrB (histidina

kinasa del par regulador), que evita por tanto la fosforilación de PrrA y la expresión de los pigmentos fotosintéticos.

Conociendo la implicación de estos reguladores en procesos redox y como transmisores de una señal a partir de una citocromo oxidasa, se ha analizado con detalle el efecto de ANR y de RoxS/RoxR sobre represión catabólica, sobre la expresión de Cyo y sobre el resto de oxidasas terminales, y se ha analizado su capacidad para unirse a alguno de los promotores que parece regular.

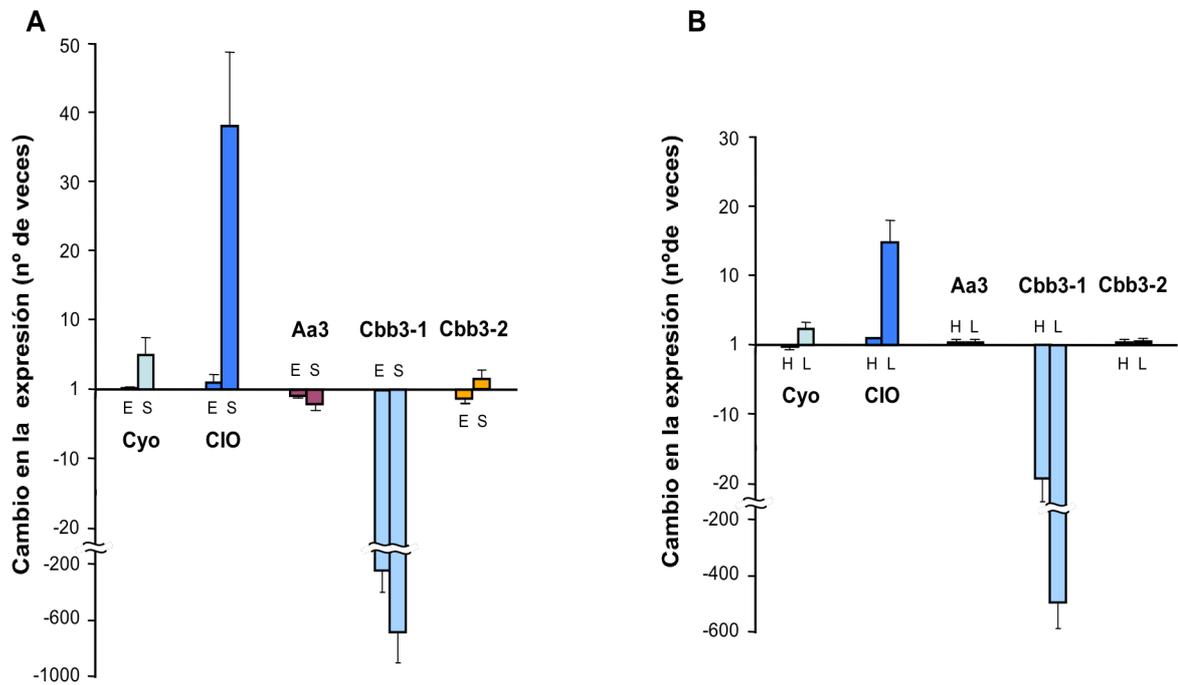
### 2.1.- Efecto de ANR sobre la expresión de las oxidasas terminales Cyo, CIO, Aa3, Cbb3.1 y Cbb3.2

#### 2.1.1.- Medida de los niveles de los mRNA de las oxidasas terminales por PCR de tiempo real

Para estudiar la función de la proteína ANR en la expresión de las diferentes oxidasas terminales de *P. putida*, se inactivó el gen *anr* en *P. putida* KT2440, obteniendo KT2440-A y se cuantificó la expresión de todas las oxidasas terminales en ambas estirpes en diferentes condiciones mediante PCR de tiempo real. Para ello se utilizaron oligonucleótidos correspondientes a los genes *cyoA* (oxidasa Cyo), *cioA* (oxidasa CIO), PP0103 (oxidasa Aa3), *ccoO1* (oxidasa Cbb3.1) y *ccoO2* (oxidasa Cbb3.2). Al cultivar las células en un medio rico con buena aireación (en matraz de 250 ml con 30 ml de volumen de medio y 220 r.p.m. de agitación), en fase exponencial ( $A_{600nm}=0,5$ ), la ausencia de ANR causó un descenso de más de 230 veces en los niveles de mRNA de la oxidasa Cbb3.1, mientras que apenas ejerció efecto alguno sobre el mRNA de las demás oxidasas terminales (Fig. 7A). Sin embargo, durante la entrada en fase estacionaria ( $A_{600nm}=2,2$ ), el efecto de ANR resultó bastante más acusado: su ausencia dio lugar a un aumento de casi 6 veces en los niveles de mRNA de Cyo, de más de 39 veces en los de CIO y un descenso de más de 700 veces en los de Cbb3.1 (Fig. 7A). Los niveles de las oxidasas Cbb3.2 y Aa3 no se vieron afectados.

En *E. coli* FNR funciona como un sensor de oxígeno que regula la expresión de un número considerable de genes en función de la disponibilidad de oxígeno en el medio (Kang et al. 2005). Según esto, el efecto ejercido por ANR sobre las oxidasas

terminales podría deberse a una disminución en la concentración de oxígeno cuando las células entran en fase estacionaria o a otras razones derivadas de los cambios causados por la entrada en dicha fase de crecimiento. Con objeto de clarificar si cambios en la tensión de oxígeno son capaces de modificar la expresión de *Cyo*, *Cio* o *Cbb3.1*, se cultivaron las células en un fermentador con aireación controlada para obtener un 100% o un 40% de saturación de oxígeno. Cuando el cultivo estaba en crecimiento exponencial ( $A_{600nm}=0,5$ ), se recogieron las células, se purificó el RNA total y se midió la expresión de todas las oxidasas terminales por medio de PCR de tiempo real. Se pudo comprobar que, en cultivos con un 100% de saturación de aire, la ausencia de ANR provocó una caída en la expresión de *ccoO1* (*Cbb3.1*) de 20 veces, lo que supone 10 veces menos que en células creciendo exponencialmente en matraz, y 70 veces menos que en células crecidas en matraz hasta fase la estacionaria (Fig. 7B). Cuando se realizaron los mismos experimentos con células creciendo exponencialmente pero limitando la saturación de aire hasta un 40%, los efectos fueron más drásticos, puesto que la ausencia de ANR dio lugar a que *ccoO1* (*Cbb3.1*) se expresara 500 veces menos (Fig. 7B), un descenso comparable al observado en fase estacionaria. Es posible que las diferencias observadas en la expresión de *Cbb3.1* en fase exponencial entre células creciendo en matraz y en fermentador se deban a que la aireación en matraz no llega a ser óptima, de manera que no se alcance una saturación del 100 % de oxígeno. Con respecto a las ubiquinol oxidasas, la ausencia de ANR en cultivos creciendo exponencialmente en condiciones limitantes de oxígeno causó un incremento de 2 veces en los niveles de mRNA de *cyoA*, y de 14 veces en el caso de *cioA*; estos valores son a su vez unas 2 veces menores que los observados cuando las células entran en fase estacionaria en matraz. Todos estos resultados sugieren que el papel principal de ANR es responder a la disponibilidad de oxígeno y reordenar la expresión de determinadas oxidasas en consecuencia; aunque puede haber otros factores propios de la fase estacionaria de crecimiento que puedan modificar sus niveles o actividad.



**Figura 7.** Efecto de ANR sobre la expresión de los genes que codifican las distintas oxidasas terminales. Los valores indican el número de veces que cambian los niveles de mRNA de los genes que codifican las oxidasas terminales indicadas al inactivar el gen *anr* con respecto a la cepa silvestre. A) Células cultivadas en matraces con buena aireación y recogidas en fase exponencial ( $A_{600} = 0,5$ ; referido como “E”) o al inicio de la fase estacionaria ( $A_{600} = 2,2$ , indicado como “S”). B) Células cultivadas en fermentador bajo oxigenación controlada (100% de saturación de oxígeno indicado como “H”; 40% de saturación de oxígeno indicado como “L”) y recogidas en fase exponencial ( $A_{600} = 0,5$ ). Los niveles de mRNA se determinaron por PCR de tiempo real (ver materiales y métodos). Los valores corresponden a la media de tres muestras de RNA procesadas independientemente, cada muestra analizada por triplicado. Para los cambios correspondientes a valores menores de 1, se muestra el inverso con signo negativo, para que sea más fácil la comparación.

### 2.1.2-Cuantificación de los niveles de citocromo oxidasa a partir de sus espectros de absorción

La inactivación de *anr* generó cambios considerables en los niveles de mRNA de algunas oxidasas terminales. Para confirmar estos resultados por medio de una técnica diferente se quiso estudiar el efecto sobre las proteínas. Para ello se analizó el contenido en citocromos de membranas celulares obtenidas a partir de *P. putida* KT2440 y KT2440-A cultivadas hasta fase estacionaria temprana ( $A_{600nm}=2$ ), en cultivos aireados en matraz. El espectro diferencial de membranas reducidas respecto a membranas oxidadas muestra picos de absorción a 558 nm y a 550 nm que permiten una cuantificación del contenido total de citocromos *b* y *c*, respectivamente. Estos valores permiten estimar el contenido en las oxidasas Cyo, Cbb3.1 y Cbb3.2, dado que Aa3 no posee ninguno de estos citocromos, y los niveles de CIO se mantienen muy bajos (Morales et al. 2006; Williams et al. 2007), por lo que apenas contribuyen a la cantidad total de citocromo *b*.

Al medir los espectros de absorción, se comprobó que la ausencia de *anr* causó una disminución del 39% en el contenido de citocromo *b* y del 57% en el de citocromo *c* (tabla 1). Al inactivar Cbb3.1 en una cepa con ANR (PBS4CB1), se observó una disminución del 46% en el contenido de citocromo *b* y del 57% en el citocromo *c* (tabla 1). Se sabe que inactivar una de las dos oxidasas terminales Cbb3 en *P. aeruginosa* no afecta a los niveles de la otra oxidasa Cbb3 (Comolli y Donohue 2004). Según esto, la disminución en el contenido de citocromos *b* y *c* al inactivar *anr* corrobora los resultados obtenidos al medir los niveles de mRNA correspondientes a Cbb3.1 al comienzo de la fase estacionaria cuando no hay ANR (Fig.7A).

Estirpe	Citocromo <i>b</i>	Citocromo <i>c</i>
KT2440 (wt)	0,37	0,38
KT2440-A ( <i>anr</i> )	0,226	0,164
PBS4CB1 ( <i>ccoN1O1Q1P1</i> )	0,198	0,164

**Tabla 1.** Contenido en citocromos *b* y *c* en preparaciones de membrana de distintas cepas de *P. putida*. El contenido en citocromos se cuantificó a partir de los espectros diferenciales de membranas reducidas con ditionito sódico respecto a membranas oxidadas con persulfato amónico. La señal correspondiente al citocromo *b* procede de la oxidasa terminal Cyo (citocromo *bo3*), del complejo *bc1* y de las oxidasas Cbb3.1 y Cbb3.2. La señal del citocromo *c* corresponde al complejo *bc1* y a las oxidasas Cbb3.1 y Cbb3.2. Los valores se expresan en nmol de citocromo *b* o citocromo *c* por mg de proteína.

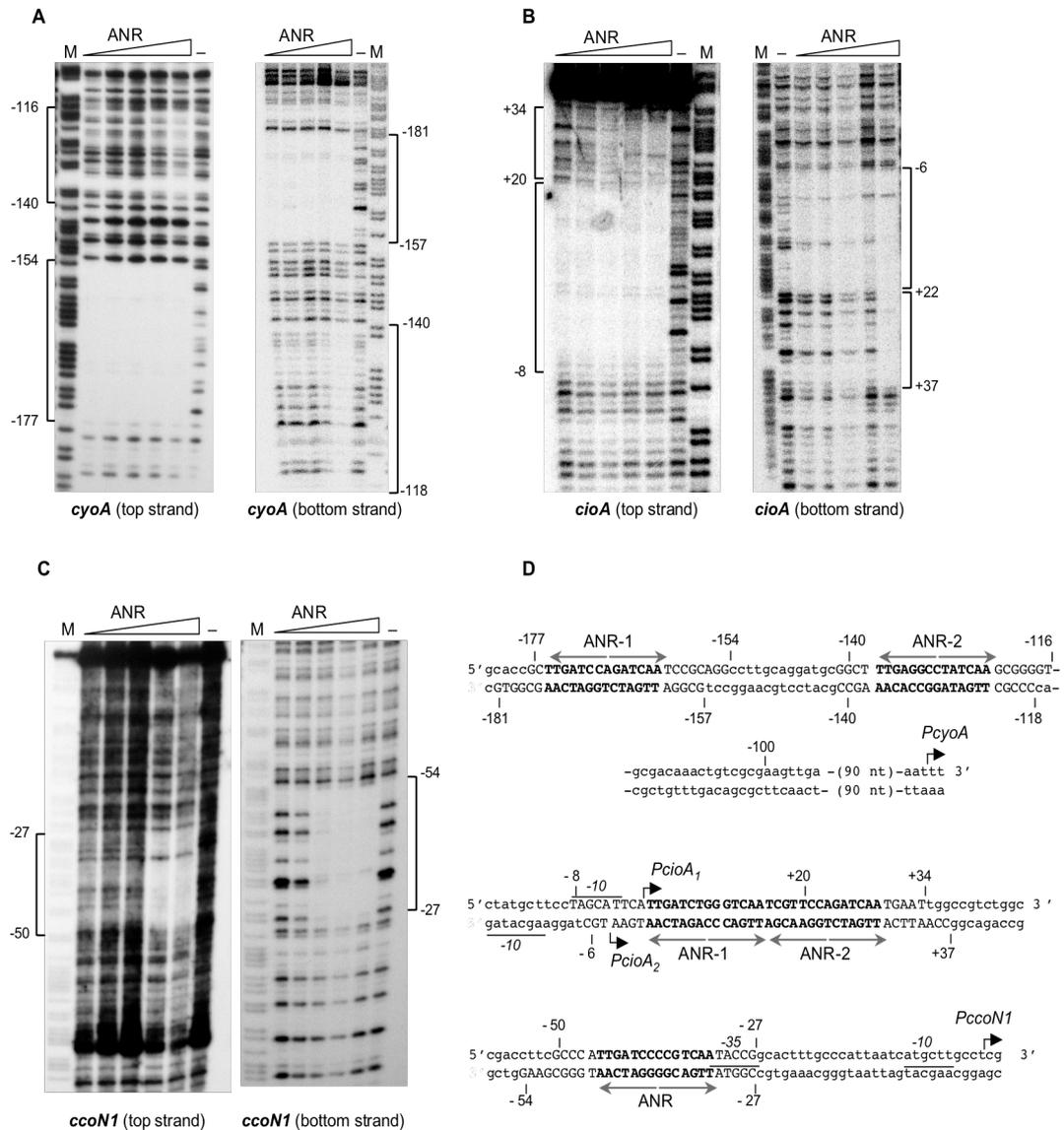
## 2.2.-Unión de ANR\* a DNA

### 2.2.1.-Identificación de los sitios de unión de ANR a los promotores de las oxidasas terminales Cyo, CIO y Cbb3.1

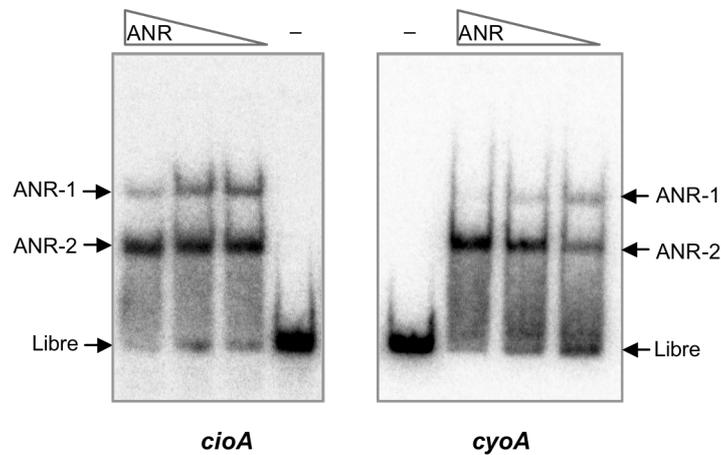
Los cambios en los niveles de mRNA de los genes correspondientes a las oxidasas Cyo, CIO y Cbb3.1 observados al inactivar el regulador ANR sugieren que esta proteína podría actuar como represor de los promotores *PcyoA* y *PcioA*, y como activador del promotor *PccoN1*. Con objeto de determinar si ANR es capaz de unirse a los promotores que parece regular, se buscaron secuencias de unión de ANR en los promotores de *cyoA* (Dinamarca et al. 2003), *ccoN1* y *cioA* (identificados en el laboratorio), y se llevaron a cabo ensayos de *footprinting* con DNasal para determinar con exactitud la unión de ANR a estos promotores. Se sabe que la proteína FNR de *E. coli* está presente como monómero cuando hay oxígeno en el medio, y que sólo dimeriza cuando la concentración de este disminuye, permitiendo su unión a DNA (Ziegelhoffer y Kiley 1995; Lazazzera et al. 1996; Jervis y Green 2007). Esto dificulta mucho trabajar con la proteína purificada. Sin embargo, si se sustituye el residuo Asp

154 por Ala, se obtiene FNR\*, una proteína funcional capaz de dimerizar en presencia de oxígeno y que es constitutivamente activa (Ziegelhoffer y Kiley 1995; Lazazzera et al. 1996). En el caso de ANR de *P. aeruginosa*, se sabe que el grupo  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  también se ve alterado en presencia de  $\text{O}_2$  o de NO, perdiendo su capacidad para unirse a alguno de los promotores que parece regular (Yoon et al. 2007). ANR de *P. putida* muestra una similitud del 71% (identidad, 49%) con FNR de *E. coli*, y la región cercana a la posición 154 está altamente conservada. Con objeto de poder trabajar con ANR en condiciones aeróbicas, se sustituyó el residuo Asp-149 de la proteína ANR de *P. putida* (equivalente a Asp-154 de FNR) por Ala y se purificó la proteína resultante, ANR\*, en condiciones aeróbicas.

Con respecto al promotor *PcyoA*, los ensayos de *footprinting* con DNasal indicaron que ANR\* se une a dos sitios, que incluyen secuencias invertidas muy similares a la secuencia consenso reconocida por FNR de *E. coli* y que también es muy similar a la que se piensa que reconoce la proteína ANR de *P. aeruginosa* en diversos promotores: TTGAT-(N4)-ATCAA (Winteler y Haas 1996). Las repeticiones invertidas observadas en *PcyoA* están centradas en las posiciones -129,5 y -168,5 respectivamente con respecto al punto de inicio de la transcripción (Fig. 8D). Además, ANR\* mostró mayor afinidad (unas 64 veces) por el sitio de unión más alejado, ANR-1, que por ANR-2 (Fig. 8A). En el caso del gen *cioA*, se localizaron dos promotores solapados, separados entre sí por cuatro pares de bases: *PcioA*<sub>1</sub> y *PcioA*<sub>2</sub>. ANR\* también es capaz de unirse a dos sitios diferentes con una localización totalmente distinta de la encontrada para *PcyoA*: +8,5 (ANR-1) y +22,5 (ANR-2) con respecto al punto de inicio de la transcripción de *PcioA*<sub>1</sub> (Fig. 8B, 8D). En este caso, la afinidad por el sitio de unión localizado en +22,5 es 16 veces menor que la que tiene por el sitio centrado en la posición +8,5. Se pudo confirmar, por medio de ensayos de retardo en gel, la presencia de dos sitios de unión diferentes para estos dos promotores. Al incubar ANR\* con un fragmento de DNA igual al utilizado en los ensayos de *footprinting*, ANR\* forma dos complejos proteína-DNA diferentes, tanto con el promotor de *cyoA* como con el de *cioA*, que pudieron separarse en un gel de poliacríamida no desnaturizante (Fig. 9). En ambos promotores se puede observar que una de las bandas del retardo disminuye al añadir una cantidad mayor de proteína. En el caso del promotor *PccoN1*, los ensayos de *footprinting* mostraron un único sitio de unión en la posición -38,5 con respecto al punto de inicio de la transcripción (Fig. 8C, 8D).



**Figura 8.** Unión de ANR\* a los promotores *PcyoA*, *PcioA* y *PccoN1*. Los complejos formados por ANR\* con fragmentos de DNA marcados en un extremo que incluyen los promotores *PcyoA* (panel A), *PcioA* (panel B) o *PccoN1* (panel C) se analizaron por footprinting con DNasaI. ANR\* (como mol de dímero de proteína) se añadió a una concentración de 0,25, 0,5, 1, 2 y 4  $\mu$ M en el ensayo correspondiente al promotor *PcyoA*, y de 34, 69, 137, 275 y 550 nM en el caso de los promotores *PcioA* y *PccoN1*. "M" corresponde a la escalera obtenida por secuenciación química de un fragmento de DNA marcado en un extremo. Las regiones protegidas se indican en el lateral; las posiciones de los nucleótidos se indican con respecto al punto de inicio de la transcripción. En el panel D se muestra un resumen de los resultados obtenidos para cada promotor. Las zonas protegidas por ANR\* de la digestión con DNasaI se indican en mayúsculas, junto a las secuencias correspondientes a la unión de ANR\* y al punto de inicio de la transcripción (TS: cadena codificante, BS: cadena molde).

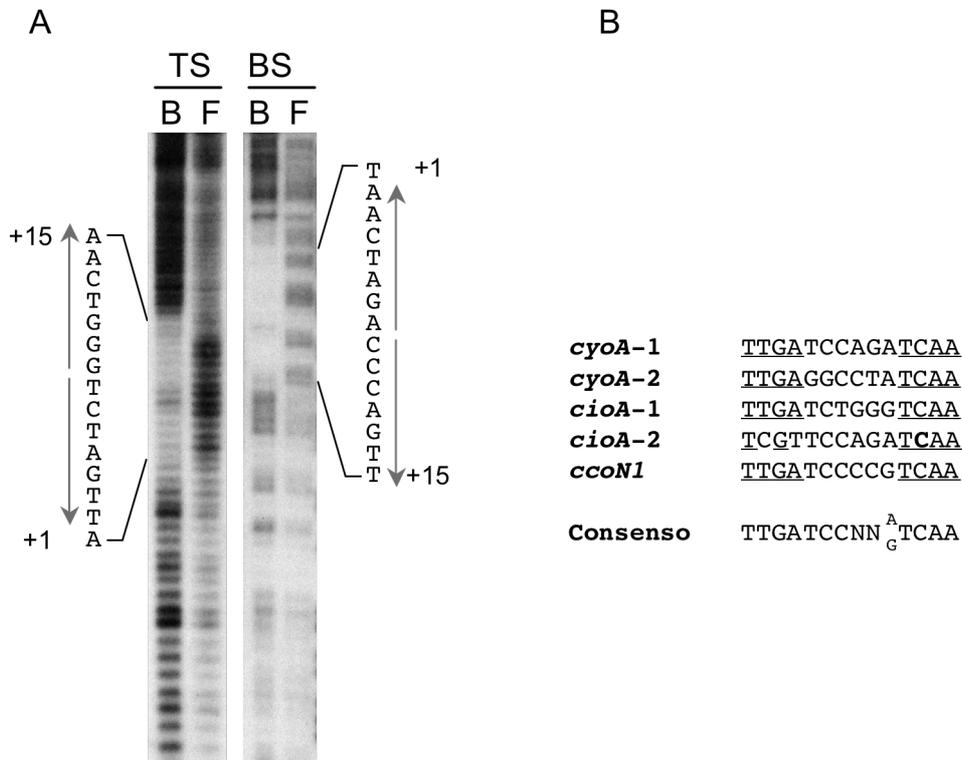


**Figura 9.** Complejos formados por la unión de ANR\* a los promotores de *cioA* y *cyoA*. Un fragmento de DNA de cada promotor se incubó con y sin ANR\* y los complejos se resolvieron en un gel no desnaturizante de acrilamida al 6%. El DNA libre y los dos complejos se indican por flechas. ANR\* (como mol de dímero de proteína) se añadió a una concentración de 2, 1 y 0,5  $\mu\text{M}$ .

### 2.2.2.-Identificación de los nucleósidos importantes para la unión de ANR\* a DNA

ANR\* puede unirse a los promotores de las oxidasas Cyo, Cio y Cbb3.1, lo que sugiere que tiene un efecto regulador directo sobre su expresión. Sin embargo, no se conoce con exactitud cuáles son los nucleósidos importantes para la unión de ANR a dichos promotores. Hasta ahora, las secuencias de unión de ANR en *Pseudomonas* se han definido por su similitud con las de FNR de *E. coli*, pero no se ha determinado experimentalmente, por ensayos de *footprinting in vitro*, cuáles son los nucleósidos verdaderamente importantes en la unión al DNA. El ensayo del *nucleósido ausente* permite obtener esta información (Hayes y Tullius 1989). Al tratar DNA con radical hidroxilo, éste es capaz de atacar el esqueleto de azúcar fosfato del DNA, de manera que la reacción da lugar a una pérdida completa del nucleósido. Controlando las condiciones de reacción se puede obtener un conjunto de moléculas de DNA en las que, estadísticamente, cada molécula de DNA tenga un hueco en una de las bandas.

Al incubar el DNA con la proteína, ésta sólo se unirá a aquellas moléculas que no tengan afectado ningún nucleósido esencial. Después de incubar ANR\* con este DNA tratado con radical hidroxilo, se separa el DNA libre del unido a ANR\* mediante electroforesis en un gel no desnaturizante. Tras cortar la banda libre y la unida a DNA, se puede recuperar el DNA y analizarlo en un gel desnaturizante. En la banda libre se observa un enriquecimiento en moléculas de DNA que han perdido los nucleósidos necesarios para la unión; en la unida se observa el efecto contrario. Para analizar con detalle a qué nucleósidos se une ANR\* se utilizó un fragmento de DNA del promotor de *cioA* marcado en un extremo, y se trató con radical hidroxilo. El DNA se incubó con 0,6 µg de ANR\*, cantidad suficiente para obtener una unión aceptable de la proteína al sitio ANR-1, por el que tiene mayor afinidad. El DNA libre y el unido se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturizante, se extrajeron las bandas y se analizaron en un gel de urea-poliacrilamida desnaturizante. En la figura 10 se puede observar que las bandas originadas por el ataque del radical hidroxilo entre las posiciones +1 y +15 con respecto al punto de inicio de la transcripción de *PcioA<sub>1</sub>* no aparecen en el carril correspondiente al complejo ANR\*-DNA y, sin embargo, están en exceso en el del DNA libre. Se obtuvo el mismo resultado al realizar el experimento con la cadena codificante y con la no codificante (Fig.10A). Estas posiciones corresponden a una secuencia invertida completa que define la secuencia reconocida por ANR (Fig.10A). La comparación entre los sitios ANR encontrados en *PcyoA*, *PcioA* y *PccoN1* a partir de los ensayos de *footprinting* con DNasal ha permitido deducir la secuencia consenso para ANR en *P. putida*: TTGATCCNN<sup>A</sup><sub>G</sub>TCAA (Fig. 10B).



**Figura 10.** Nucleósidos necesarios para la unión de ANR al promotor *PcioA*. A) El fragmento de DNA correspondiente a la secuencia con los dos promotores de *cioA*, marcado en la cadena codificante (TS) o en la cadena molde (BS), se trató con radicales hidroxilo y se incubó con ANR\* (0,6 µg). El DNA libre (marcado como F), se separó del unido a ANR\* (marcado como B) por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturizante. Tras extraer el DNA del gel, se analizó en un gel de poliacrilamida desnaturizante. Se indican las zonas ausentes del complejo ANR\*-DNA. B) Las secuencias ANR\* determinadas en los promotores *cyoA*, *cioA* y *ccoN1* a partir de los ensayos de *footprinting* con DNasal se comparan a la derecha.

### 2.3.-Efecto del par sensor/regulador RoxS/RoxR sobre la expresión de las diferentes oxidasas terminales de *P. putida*

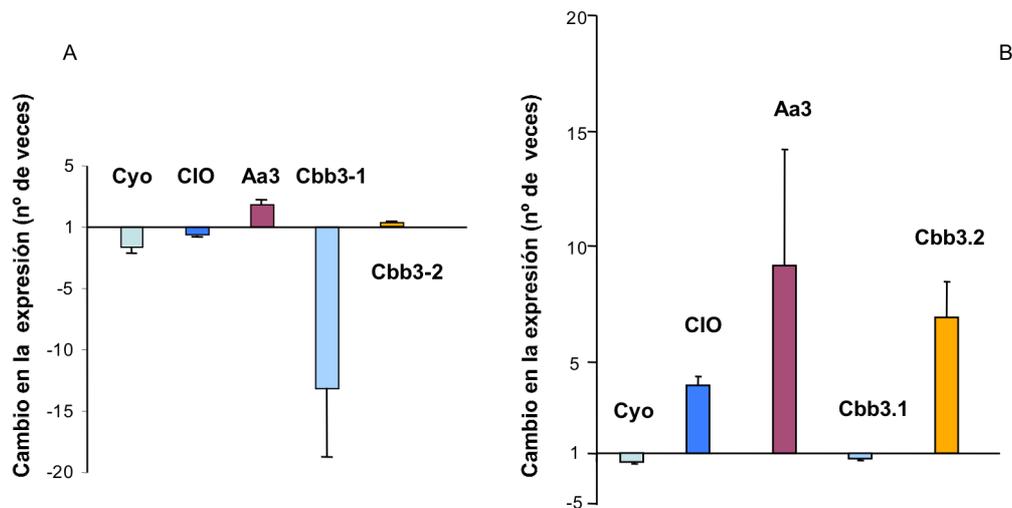
Los resultados obtenidos a partir de la PCR de tiempo real muestran que ANR ejerce un efecto importante sobre las oxidasas terminales CIO y Cbb3.1, pero únicamente un efecto parcial sobre Cyo, actuando como represor al disminuir la concentración de oxígeno sin ejercer un efecto muy fuerte. Además, el sitio de unión de ANR se encuentra bastante alejado del punto de inicio de la transcripción de Cyo, lo cual sugiere que debe haber más reguladores implicados. Por otra parte, la expresión de Cyo depende de la fuente de carbono con que crece la bacteria, lo que también sugiere la participación de otros reguladores que actúan en respuesta a este tipo de señales y que, además, podrían estar implicados en la coordinación de la expresión de otras oxidasas terminales.

#### 2.3.1.- Efecto de RoxR sobre las oxidasas terminales Cyo, CIO, Aa3, Cbb3.1 y Cbb3.2

Para averiguar el grado de implicación de RoxR en la regulación de la cadena de transporte de electrones, se inactivó el gen *roxR* en *P. putida* KT2440, obteniendo la estirpe KT2440-R. Se compararon los niveles de expresión de los mRNA de todas las oxidasas terminales en estas cepas por PCR de tiempo real en diferentes condiciones de cultivo: en matraz con alta aireación y medio rico LB (tanto en fase exponencial como en fase estacionaria), en matraz con alta aireación y medio mínimo con succinato como única fuente de carbono y en fermentador con LB como medio de cultivo, con un 100% y un 40% de saturación de oxígeno.

En células creciendo exponencialmente en medio LB con la saturación de oxígeno limitada a un 40%, la inactivación de RoxR causó un descenso de la expresión de Cbb3.1 de unas 12 veces, pero apenas tuvo efecto en los niveles de mRNA de las demás oxidasas terminales (Fig. 11A). En células cultivadas con un 100% de saturación de oxígeno no se observó ningún efecto. Estos datos sugieren que RoxR, si bien parece tener un cierto papel en la regulación de la cadena de transporte de electrones en condiciones semiaeróbicas, necesita una mayor limitación en la concentración de oxígeno para ejercer un efecto más significativo. Por otro lado,

cuando las células se cultivaron en medio LB en matraz con alta aireación, únicamente cuando alcanzaron el principio de la fase estacionaria ( $A_{600nm}=2,2$ ) el efecto de RoxR fue similar al observado en fermentador con un 40% de saturación de oxígeno (resultados no mostrados). En fase exponencial no se observaron diferencias.



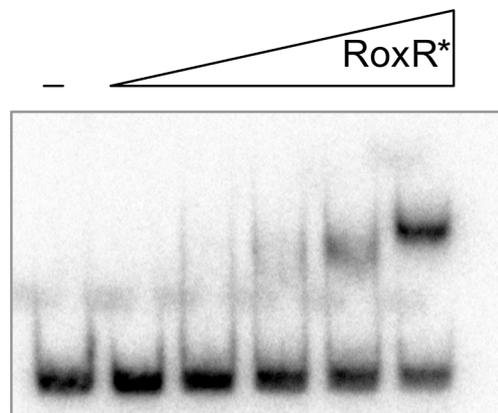
**Figura 11.** Efecto de RoxR sobre la expresión de los genes que codifican las distintas oxidasas terminales. Los valores indican el número de veces que cambian los niveles de mRNA de los genes que codifican todas las oxidasas terminales al inactivar el gen *roxR*. A) Células crecidas en fermentador en medio LB con la saturación de oxígeno limitada a un 40% y recogidas en fase exponencial,  $A_{600}=0,5$ . B) Células crecidas en matraz con alta aireación en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono y recogidas en fase exponencial ( $A_{600}=0,8$ ). Los niveles de mRNA se determinaron por PCR de tiempo real (ver materiales y métodos). Los valores corresponden a la media de 3 muestras de RNA procesadas independientemente, cada muestra analizada por triplicado. Para los cambios correspondientes a valores menores de 1, se muestra el inverso con signo negativo, para que sea más fácil la comparación.

RoxR ejercería, por tanto, un papel distinto al de ANR en cuanto a la respuesta en función de la concentración de oxígeno, puesto que los cambios observados en la expresión de las distintas oxidasas terminales no son tan acusados como al inactivar el gen *anr*. Por otra parte, RoxR podría actuar sobre la cadena de transporte de electrones en respuesta a un estímulo diferente a un cambio en la concentración de oxígeno. Con objeto de averiguar si el par sensor/regulador RoxS/RoxR tiene algún efecto en la reorganización de la cadena de transporte de electrones en medio mínimo suplementado con succinato como única fuente de carbono, se analizó la expresión de todas las oxidasas terminales en este medio en fase exponencial ( $A_{600nm}=0,8$ ). En estas condiciones RoxR ejerce un papel relevante, y se observó que, en este caso, la inactivación del gen *roxR* generó variaciones en la expresión de tres oxidasas terminales (Fig. 11B). Esta inactivación produjo un incremento en la expresión de Aa3 y de Cbb3.2 de más de 5 veces y un ligero incremento en la expresión de CIO. La expresión de Cbb3.1 (fuertemente sujeta a la regulación por Anr) y de Cyo apenas experimentaron cambios.

### 2.3.2.-Unión de RoxR al promotor de *cyoA*

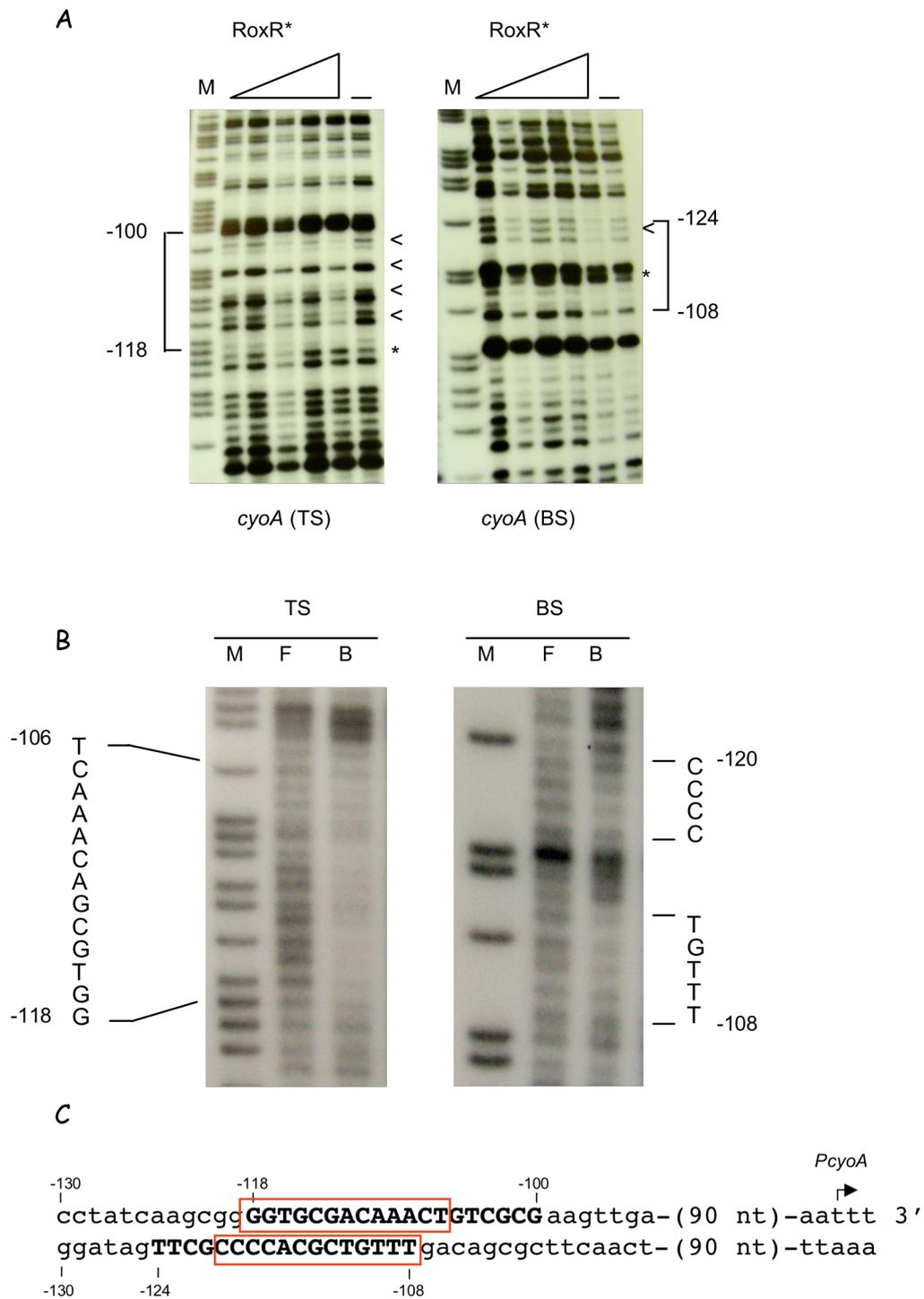
Mediante los ensayos de retardo en gel se ha observado que RoxR de *P. aeruginosa* es capaz de unirse al promotor de *cyoA* (Comolli y Donohue 2002), pero se desconoce la secuencia que reconoce en *Pseudomonas*. La secuencia consenso de unión a DNA determinada para las proteínas homólogas de otros microorganismos posee un alto contenido en GC, pero no es una secuencia que en *P. putida* pueda identificarse claramente (Du et al. 1998; Laguri et al. 2003; Elsen et al. 2004). Para tratar de averiguar si RoxR es capaz de unirse al promotor de *cyoA*, se purificó la proteína para hacer ensayos de retardo en gel y de *footprinting* a diferentes concentraciones de proteína y sales, pero todos ellos resultaron infructuosos. Se sabe que el acetil fosfato es capaz de fosforilar este tipo de proteínas (McCleary y Stock 1994; Comolli et al. 2002) y, en consecuencia, estabilizar su unión al DNA (Bird et al. 1999), pero con RoxR tampoco funcionó, no se observó unión alguna de RoxR a *PcyoA*. Una comparación de RoxR con proteínas homólogas en diferentes microorganismos (tanto de  $\alpha$ - como de  $\gamma$ -proteobacterias) permite establecer dos grupos de proteínas en función de la similitud entre ellas (Elsen et al. 2004). En el

primer grupo se incluyen aquellas que poseen un 100% de similitud en el dominio HTH de unión a DNA, entre las que se encuentran los reguladores de *R. sphaeroides*, *R. capsulatus* y *Bradyrhizobium japonicum*. En un segundo grupo, en el que se incluyen *P. syringae* y *P. aeruginosa*, el dominio HTH no es idéntico (Elsen et al. 2004). En ambos grupos se mantiene la presencia de una Ala responsable del fenotipo RegA<sup>+</sup> y cuya mutación a Ser en RegA supone un incremento considerable de la afinidad de la proteína por el DNA o, probablemente, de la estabilidad de la propia proteína (Du et al. 1998). Se identificó este aminoácido en RoxR (Ala 96), se sustituyó por Ser y se purificó la proteína resultante, RoxR\*. Al hacer los ensayos de retardo en gel, primero se incubó la proteína con el DNA a temperatura ambiente, se enfrió la muestra en hielo y se analizó en un gel no desnaturizante previamente enfriado a 4°C. De esta forma se observó unión de RoxR\* a *PcyoA* (Fig.12), aunque utilizando una concentración elevada de proteína.



**Figura 12.** Unión de RoxR\* al promotor *PcyoA*. RoxR\* se incubó con un fragmento de *PcyoA* marcado radiactivamente en uno de los extremos. Se enfrió a 4°C para estabilizar la unión y se analizó en un gel de acrilamida no desnaturizante a 4°C. Las cantidades de proteína utilizadas fueron: 1,5, 3, 6, 12 y 24 μM. En todos los casos se utilizaron 2 μg de poli [d(I-C)] como competidor inespecífico.

Sin embargo, al intentar definir con mayor detalle la zona reconocida por RoxR\* por medio de ensayos de *footprinting*, sólo pudo apreciarse una protección bastante débil a concentraciones altas de proteína. Esta zona protegida está centrada en la zona de -100 a -124 respecto al sitio de inicio de la transcripción de *cyoA* (Fig.13A). La adición de acetil fosfato a RoxR\* durante la incubación no mejoró la unión de la proteína al DNA. La unión de RoxR\* a *PcyoA* debe ser tan inestable que a temperatura ambiente la DNasaI es capaz de digerir las zonas que deberían aparecer como protegidas por RoxR\*. Para intentar definir la zona de unión de RoxR\* mediante la técnica del *nucleósido ausente*, se trató DNA de *PcyoA*, marcado radiactivamente, con radical hidroxilo del modo ya descrito (ver unión de ANR a *PcioA* por radical hidroxilo). En este caso, la unión DNA-RoxR\* se estabilizó bajando la temperatura de incubación de los compuestos proteína-DNA a 4°C y resolviéndolos después en un gel previamente enfriado a 4°C. Posteriormente se cortaron las bandas de DNA libre y unido y se extrajo el DNA para analizarlo en un gel desnaturizante de urea-poliacrilamida. Se obtuvo una ligera diferencia entre el DNA de la banda libre y el de la unida, que en ambos casos corresponde a la misma zona del promotor y que además coincide con la zona que aparece levemente protegida en los ensayos de *footprinting* (Fig. 13B). A pesar de que la unión debe ser extremadamente inestable, el resultado fue similar al marcar las dos cadenas e incubarlas con RoxR\* en iguales condiciones, tanto al analizar la unión por *footprinting* con DNasaI como por interferencia con radical hidroxilo. Esto sugiere que ambos ensayos están definiendo el sitio real de unión de RoxR.



**Figura 13.** Unión de RoxR\* a *PcyoA*. A) Análisis por *footprinting* con DNasaI de la unión de RoxR\* a *PcyoA*. Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. RoxR\* se añadió a una concentración de 1,5, 3, 6, 12 y 24  $\mu$ M de RoxR\*. "M" corresponde a la escalera obtenida por secuenciación química de un fragmento de DNA marcado en un extremo. Las regiones

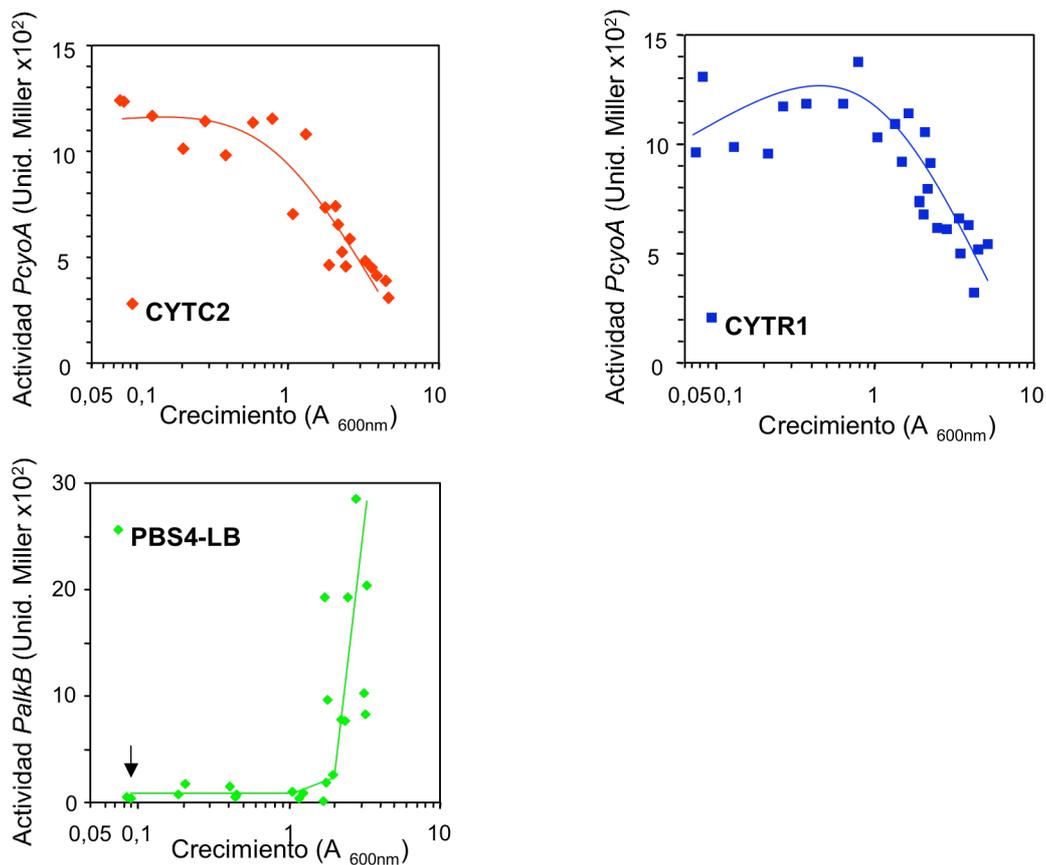
protegidas se indican en el lateral; las posiciones de los nucleótidos se indican con respecto al punto de inicio de la transcripción (TS: cadena codificante, BS: cadena molde). < indica zonas protegidas, \* marca zonas de hipersensibilidad a la digestión con DNase I. B) Análisis por interferencia con radical hidroxilo de la unión de RoxR\* a *PcyoA*. Un fragmento de DNA conteniendo el promotor *PcyoA* marcado en una u otra cadena, se trató con radicales hidroxilo, se incubó con RoxR\* (24  $\mu$ M) y se separó el DNA libre (F) del unido a RoxR\* (B) por electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante. Tras extraer el DNA del gel, se analizó en un gel de poliacrilamida desnaturizante. Se indican las bandas ausentes en el carril correspondiente al complejo RoxR\*-DNA. C) Secuencia reconocida por RoxR\* en el promotor de *cyoA*. En rojo se marcan los nucleótidos imprescindibles para la unión obtenidos por el análisis por interferencia con radical hidroxilo. En mayúsculas, las zonas protegidas en los *footprints*.

#### 2.4.-Análisis de la expresión de los genes *cyo* en distintas condiciones y fondos genéticos mediante fusiones transcripcionales y traduccionales al gen *lacZ*

La expresión de *Cyo*, y por tanto la represión catabólica ejercida sobre *PalkB*, varían en función de la fuente de carbono y de la aireación con que crece la bacteria (Dinamarca et al. 2003). Para determinar con más detalle los cambios de expresión de *Cyo* a lo largo del crecimiento y poder correlacionarlos con los datos sobre represión catabólica, se ha construido una fusión transcripcional y otra traduccional del promotor *PcyoA* al gen *lacZ* y se han insertado en el cromosoma de *P. putida* KT2442, obteniendo las cepas CYTC2 (*PcyoA::lacZ*) y CYTR1 (*PcyoA'-lacZ*). La actividad del promotor *PcyoA* se analizó mediante ensayos de  $\beta$ -galactosidasa que han permitido seguir la expresión de *Cyo* a lo largo del crecimiento en diferentes medios de cultivo. Los resultados corroboran la importancia de los niveles de *Cyo* en el proceso de represión catabólica.

### 2.4.1-Expresión de Cyo en LB

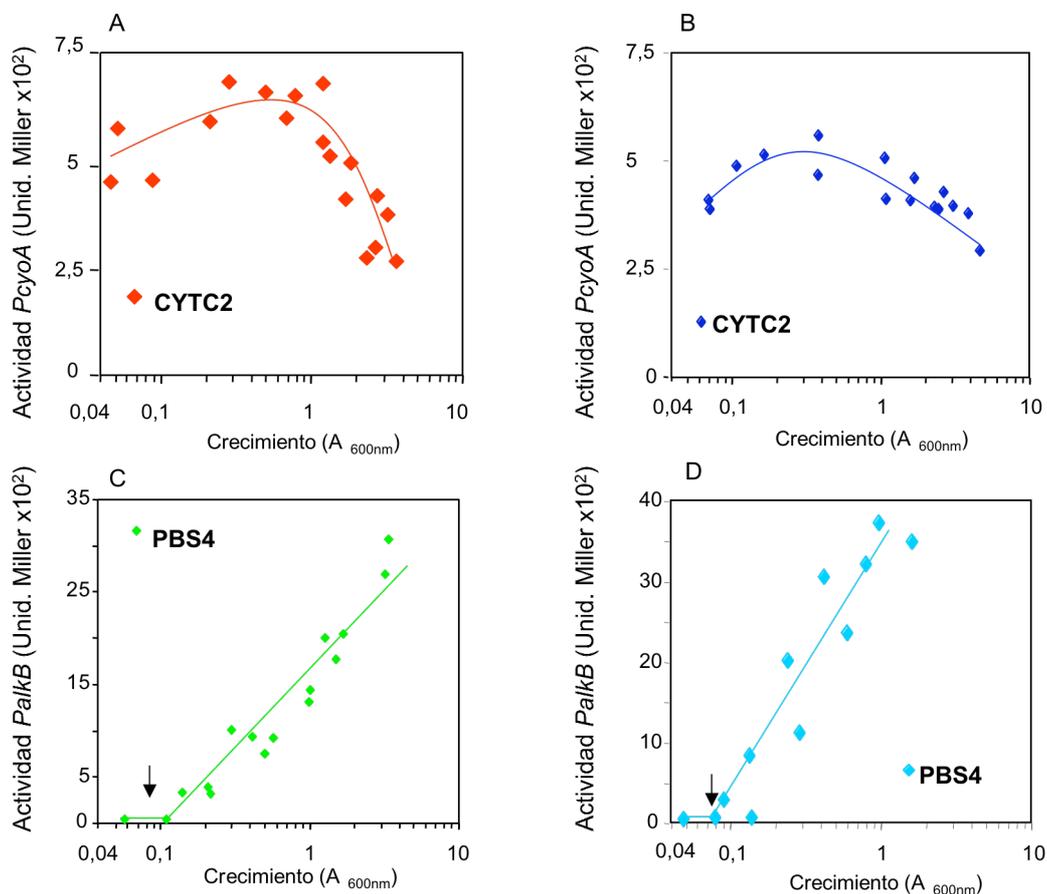
Al cultivar las células en medio rico LB bien aireadas se comprobó que, tanto con la fusión transcripcional como con la traduccional, la expresión de Cyo fue alta mientras las células crecieron exponencialmente hasta que alcanzaron una turbidez ( $A_{600nm}$ ) de entre 1 y 1,5 (Fig. 14). A partir de este momento la actividad del promotor *PcyoA* disminuyó fuertemente. Esta caída coincide con la pérdida de represión catabólica sobre el promotor *PalkB*, que comienza cuando las células entran en fase estacionaria, a una turbidez de 1,5 (Fig. 14). Dado que las fusiones transcripcional y traduccional se comportan de forma similar, parece que la regulación de Cyo es transcripcional.



**Figura 14.** Comparación entre la expresión de la oxidasa terminal Cyo y la represión catabólica ejercida sobre el promotor *PalkB* en medio LB con buena aireación. Las estirpes CYTC2 y CYTR1 contienen respectivamente las fusiones transcripcional (*PcyoA::lacZ*) y traduccional (*PcyoA-lacZ*) del promotor de *cyoA* a *lacZ*. La cepa PBS4 contiene en el genoma una fusión de *PalkB* a *lacZ* y el regulador *alkS*. Para inducir la expresión de *PalkB* se añadió DCPK (indicado con una flecha).

## 2.4.2-Expresión de Cyo en medio mínimo

Una vez confirmada la correlación entre los niveles de Cyo y la represión catabólica en medio LB, se decidió analizar la expresión de Cyo a lo largo del crecimiento en medio mínimo con succinato, o con citrato, como única fuente de carbono (el succinato reprime parcialmente la expresión de *PalkB* y el citrato no causa represión catabólica). Esto permitió correlacionar los niveles de Cyo con la represión ejercida sobre *PalkB*. Los resultados indican que la expresión de Cyo es un 50% menor en un medio mínimo con succinato que en medio LB, y algo menor en medio mínimo con citrato (Fig. 15).



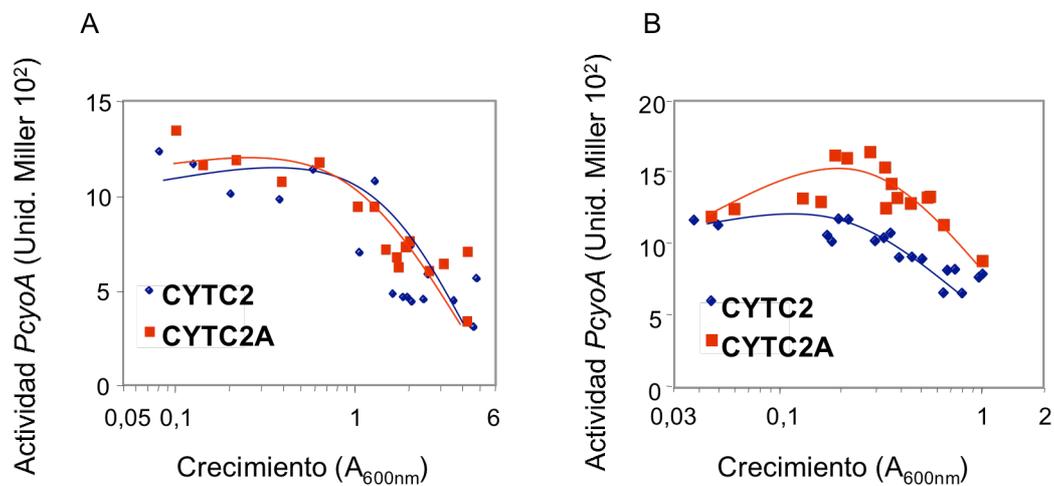
**Figura 15.** Correlación entre la expresión de la oxidasa terminal Cyo y la represión catabólica ejercida sobre el promotor *PalkB* en medio mínimo con succinato (A y C) o con citrato (B y D) como única fuente de carbono, con alta aireación. CYTC2 corresponde a la cepa con la fusión transcripcional del promotor *PcyoA* a *lacZ*. La cepa PBS4 contiene en el genoma una fusión de *PalkB* a *lacZ* y el regulador *alkS*. Para inducir la expresión de *PalkB* se añadió DCPK al alcanzar  $A_{600} = 0,08$  (indicado con una flecha).

Ambos resultados ponen de manifiesto que las condiciones que generan menos represión catabólica sobre el promotor *PalkB* son precisamente aquellas en las que los niveles de Cyo son menores. Al comparar la expresión de *PcyoA* y *PalkB* en medio mínimo con succinato y con citrato como fuente de carbono se observó que cuando disminuye la expresión de *PcyoA* se pierde antes la represión catabólica.

#### *2.4.3-Efecto de la inactivación de ANR sobre la expresión de Cyo en distintas condiciones de crecimiento*

Se ha visto que ANR ejerce un efecto importante sobre buena parte de las oxidasas terminales de la cadena respiratoria (ver figura 7, pg. 53). Con objeto de analizar con detalle los cambios en la expresión de Cyo en ausencia de ANR se inactivó ANR en CYTC2 y CYTR1 (KT2442 con fusiones transcripcional y traduccional del gen *cyoA*, respectivamente). Todas estas cepas se utilizaron en ensayos de  $\beta$ -galactosidasa que han permitido seguir la expresión de Cyo a lo largo del crecimiento. Según estos resultados, ANR no pareció ejercer un efecto significativo sobre la expresión de Cyo en condiciones aeróbicas (Fig. 16A). Con objeto de analizar con mayor detalle el efecto regulador de ANR sobre Cyo se siguió su expresión en condiciones semiaeróbicas (células cultivadas en matraces de igual tamaño, el doble de volumen de medio y la mitad de agitación, ver materiales y métodos). En este caso sí que se observaron pequeños cambios en la expresión de Cyo, confirmándose que ANR funciona como un sensor de oxígeno (ver figura 7) y actúa como un represor, aunque su efecto no es muy marcado (Fig. 16B). Además, ANR parece funcionar como un regulador transcripcional.

Al repetir los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa con las mismas cepas, pero en medio mínimo con succinato o con citrato como única fuente de carbono y en condiciones aeróbicas, no se observaron diferencias entre las estirpes *wt* y las estirpes mutantes en *anr*. ANR no parece por tanto capaz de responder a cambios en la fuente de carbono.

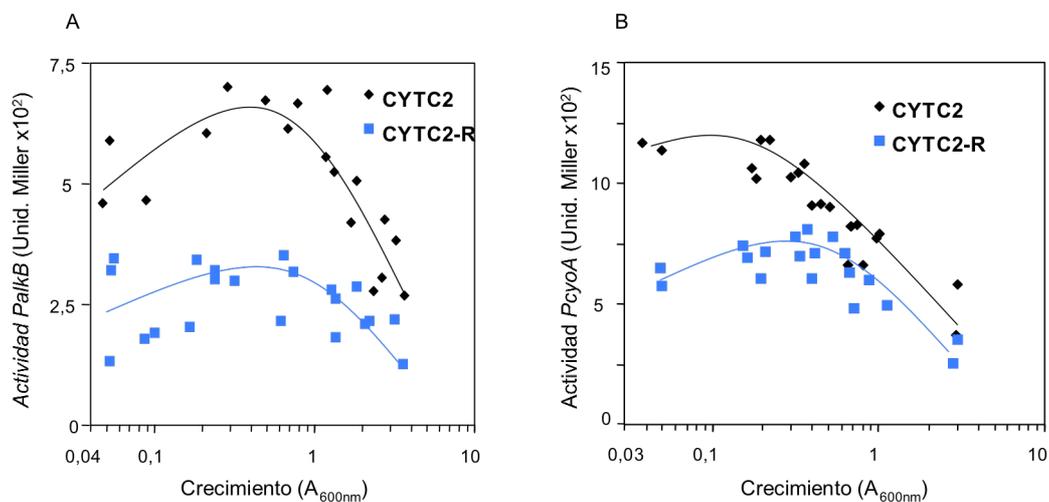


**Figura 16.** Expresión de Cyo en diferentes condiciones al inactivar *anr*. Las cepas de *P. putida* CYTC2 (fusión transcripcional de *PcyoA* a *lacZ*) y CYTC2A (derivada de la anterior, *anr* inactivado) se cultivaron en medio LB y, a distintos tiempos, se tomaron muestras y se midió la actividad β-galactosidasa. A) Condiciones aeróbicas, B) condiciones semiaeróbicas.

#### 2.4.4-Efecto de la inactivación de *RoxS* y *RoxR* sobre la expresión de Cyo en distintas condiciones de crecimiento

La ausencia de *RoxR* modifica los niveles de mRNA de diversas oxidasas terminales, aunque su efecto sobre Cyo parece ser pequeño (ver figura 11, pg. 62). Con objeto de analizar el efecto de *RoxR* sobre Cyo con más detalle se inactivó *RoxR* en las estirpes CYTC2 y CYTR1 (KT2442 con fusiones transcripcional y traduccional del gen *cyoA*, respectivamente). Estas construcciones permiten analizar el comportamiento de Cyo a lo largo de la fase de crecimiento. Al cultivar las células en medio rico LB con alta aireación no se observaron cambios en los niveles de expresión de *lacZ* entre las cepas control y los mutantes en *RoxR* (resultados no mostrados). Sin embargo la expresión de *lacZ*, y por lo tanto de *cyoA*, en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono disminuye al inactivar *RoxR*, lo que sugiere que *RoxR* puede ser un activador de los genes *cyo* (Fig. 17A). *RoxR* parece actuar como un regulador capaz de responder a la fuente de carbono con la que crece la bacteria, dado que no ejerce efecto alguno al crecer las células en medio LB o con citrato como

fuelle de carbono, pero sí cuando las células crecen en medio mínimo suplementado con succinato. Por otra parte, se sabe que la proteína sensora del par RegB/RegA de *R. capsulatus*, homólogo a RoxS/RoxR de *P. putida*, posee un dominio redox capaz de responder a cambios en las concentraciones de oxígeno (Elsen et al. 2004). Se ha comprobado que al limitar la saturación de oxígeno en el medio de crecimiento a un 40% en células cultivadas en fermentador, RoxR ejerce un cierto efecto sobre la cadena respiratoria. Con objeto de comprobar con más detalle el efecto de RoxR sobre Cyo en condiciones semiaeróbicas, se repitieron los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa en dichas condiciones (empleando un volumen de medio mayor en matraces del mismo tamaño y con una menor agitación, ver materiales y métodos). Al limitar la aireación en los cultivos RoxR también actúa como un activador de Cyo en medio rico LB, puesto que la actividad del promotor *PcyoA* disminuye unas 2 veces al inactivar RoxR (Fig. 17B). Este efecto sólo se aprecia durante la fase exponencial de crecimiento, confirmando la importancia de RoxR como regulador de Cyo.

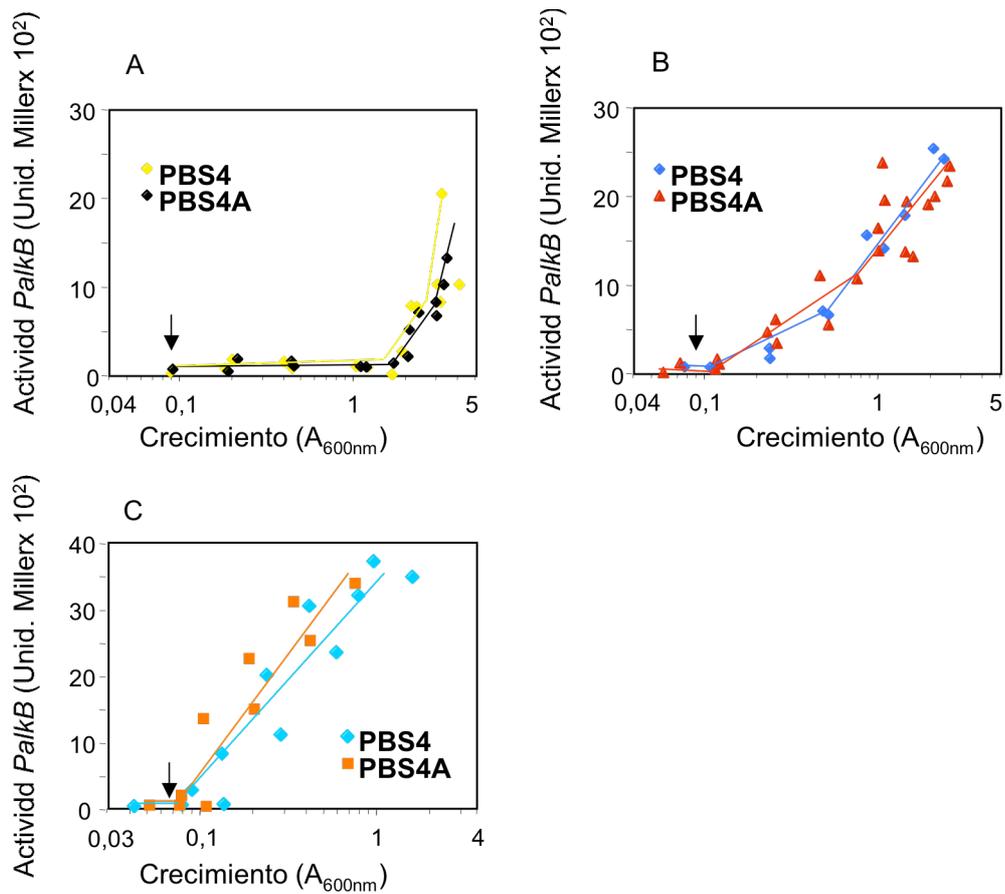


**Figura 17.** Expresión de Cyo al inactivar el regulador RoxR. Las estirpes CYTC2 (cepa con la fusión transcripcional de *PcyoA* a *lacZ*) y CYTC2-R (cepa derivada de la anterior, con RoxR inactivado) se cultivaron en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono en condiciones aeróbicas (A) o en medio LB en condiciones semiaeróbicas (B) y se midió la actividad del promotor *PcyoA* por ensayo de  $\beta$ -galactosidasa.

### 3.-Efecto de los reguladores globales ANR y RoxR en represión catabólica y en el transcriptoma de la célula

#### 3.1.-Efecto de la inactivación de ANR sobre la represión catabólica

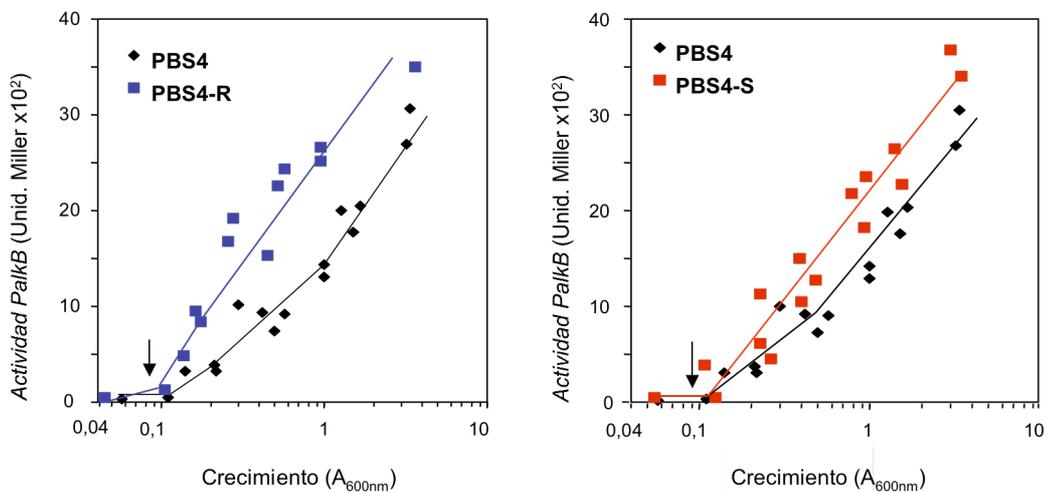
Una vez conocido el papel de ANR en la regulación de la cadena de transporte de electrones, y dado que una disminución en la oxigenación implica una pérdida de represión catabólica (Dinamarca et al. 2003), se decidió comprobar si además este regulador tiene un efecto destacable sobre el proceso de represión catabólica que afecta al promotor *PalkB* en células creciendo en diferentes medios de cultivo. Para ello, se inactivó el gen *anr* en la estirpe PBS4 (que contiene una fusión de *PalkB* a *lacZ* y el regulador *alkS* en el genoma), obteniendo PBS4A. Los resultados mostraron que ANR no parece tener un efecto observable en represión catabólica, ni en medio LB ni en medio mínimo con succinato como fuente de carbono (Fig. 18). Como control se utilizó medio mínimo con citrato como única fuente de carbono, en el que no hay represión catabólica ni en presencia ni en ausencia de ANR.



**Figura 18.** Efecto de ANR sobre la represión catabólica. Actividad del promotor *PalkB* en las estirpes de *P. putida* PBS4 y PBS4A (*anr::tet*) en medio LB (A), en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono (B) y en medio mínimo con citrato como única fuente de carbono (C). La flecha indica el momento en que se añade DCPK como inductor de la ruta. En todos los casos la expresión de *PalkB* al sin DCPK fue muy baja y no se muestra.

### 3.2.-Efecto de la inactivación de *RoxS/RoxR* sobre la represión catabólica

Tras comprobar que *RoxR* ejerce un cierto efecto en la coordinación de la cadena respiratoria se decidió determinar la implicación de *RoxS/RoxR* en represión catabólica. Para ello se inactivaron los genes *roxS* y *roxR* en la cepa PBS4 y se obtuvieron las cepas PBS4S y PBS4R. Cuando las células crecen en medio rico LB, bien aireadas, no hay cambios en la represión catabólica sobre el promotor *PalkB* al inactivar cualquiera de los dos genes (resultados no mostrados). Sin embargo, cuando crecen en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono (un medio que ejerce una represión catabólica menor que el medio LB), se aprecia una ligera pérdida de represión catabólica en PBS4S y PBS4R (Fig. 19).



**Figura 19.** Expresión de *PalkB* en las estirpes PBS4, PBS4S y PBS4R creciendo en medio mínimo suplementado con succinato como única fuente de carbono. La cepa PBS4S deriva de PBS4 por inactivación del gen *roxS*. La cepa PBS4R también deriva de PBS4, por inactivación del gen *roxR*. La flecha indica el momento en que se añade DCPK como inductor de la expresión de *PalkB*.

### 3.3.-Efecto de los reguladores ANR y RoxR sobre el transcriptoma celular

Los resultados mostrados, junto con los datos obtenidos por distintos autores en otros microorganismos (Lazazzera et al. 1996), indican que ANR actúa como un sensor de oxígeno capaz de coordinar la regulación de varias oxidasas terminales uniéndose a sus promotores. Sin embargo, se desconoce si en *P. putida* el efecto de ANR está limitado a los genes de la cadena de transporte de electrones o si, por el contrario, es más general y es capaz de alterar la expresión de un número mayor de genes. Para averiguar la trascendencia de este regulador en la fisiología de *P. putida* se ha estudiado cómo cambia el transcriptoma de la célula al inactivar el gen *anr* en la cepa KT2440 cultivada en medio LB, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria, utilizando un microarray genómico de *P. putida* KT2440. Este microarray permite comparar el patrón de expresión de los genes en KT2440A (*anr* inactivado por un cassette de tetraciclina) con respecto a KT2440. Por otro lado, se ha comprobado que el par sensor/regulador RoxS/RoxR ejerce también un efecto, aunque menor, sobre la cadena de transporte de electrones. También se ha analizado de igual modo el efecto de RoxR como regulador global.

Para determinar cuáles son los genes que responden a los reguladores ANR y RoxR se ha considerado como significativo un cambio en la expresión de un gen cuando su expresión aumenta o disminuye más de dos veces, con un valor de  $P(\text{ajustado}) < 0,05$ . Los resultados obtenidos confirman la importancia de ANR como regulador global del metabolismo de *P. putida* (ver tabla 2). En fase exponencial ( $A_{600\text{nm}}=0,5$ ) no se observan cambios significativos en la expresión de ningún gen, lo que corrobora que en estas condiciones ANR apenas es funcional. Sin embargo, en células que están entrando en fase estacionaria ( $A_{600\text{nm}}=2$ ) y en las condiciones probadas, el número de genes que cambia es de 41. Únicamente en el caso de *cyoABCDE* ANR funciona como represor, puesto que la expresión de estos genes aumenta unas 3 veces al inactivar *anr*. Del resto de genes relacionados con el transporte de electrones es importante destacar que la expresión de *petABC* (que codifica el complejo *bc1* necesario para la transferencia de electrones hacia las citocromo c oxidasas Cbb3.1, Cbb3.2 y Aa3) cae unas 4 veces y que la expresión de los genes de la oxidasa Cbb3.1 disminuye unas 20 veces, lo que confirma la importancia de esta rama respiratoria cuando disminuye la concentración de oxígeno en el medio. Entre los genes implicados en el metabolismo de aminoácidos y aminos

cabe destacar una caída importante en la expresión de los genes *arcD*, *arcA*, *argI* y *arcC* (necesarios para metabolizar arginina). Hasta el momento no se ha descrito que *P. putida* pueda respirar anaeróbicamente o fermentar, aunque se ha encontrado una cepa que expresa una nitrato reductasa periplásmica (Carter et al. 1995) y otra que respira trinitrotolueno en condiciones anóxicas (Esteve-Nunez et al. 2000). En *P. aeruginosa* el operón *arcDABC* (necesario para fermentar arginina) es activado por ANR en ausencia de oxígeno (Zimmermann et al. 1991; Lu et al. 1999), aunque parece que no son imprescindibles unas condiciones totalmente anaeróbicas (Abdelal et al. 1982).

En el caso de RoxR los arrays no muestran que la ausencia de este regulador genere cambios significativos en el transcriptoma de la célula, ni en fase exponencial ni en fase estacionaria, en células cultivadas en medio rico LB. Tampoco se han obtenido resultados concluyentes al cultivar las células en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono, a pesar de que se han observado cambios claros en la expresión de las distintas oxidadas terminales de la bacteria por medio de PCR de tiempo real.

**Tabla 2.** Cambios en el transcriptoma celular al comparar KT2440 y KT2440A (*anr* inactivado por un cassette de tetraciclina) entrando en fase estacionaria ( $A_{600nm}=2$ ) en medio rico LB.

Categoría	Locus (TIGR)	Nombre gen	Cambio expresión	P (ajustado)
<b>Transporte electrones</b>				
Proteína Rieske 2Fe-2S	PP0315		-2	0,0375
Citocromo o ubiquinol oxidasa, subunidad II	PP0812	<i>cyoA</i>	3,64	0,0140
Citocromo o ubiquinol oxidasa, subunidad I	PP0813	<i>cyoB</i>	2,89	0,0222
Citocromo o ubiquinol oxidasa, subunidad III	PP0814	<i>cyoC</i>	2,66	0,0063
Ubiquinol--citocromo c reductasa [Fe-S]	PP1317	<i>petA</i>	-4,58	0,0039
Ubiquinol--citocromo c reductasa, citocromo b	PP1318	<i>petB</i>	-4,98	0,0039
Ubiquinol-- citocromo c reductasa citocromo c1	PP1319	<i>petC</i>	-3,96	0,0039
Ferredoxin--NADP reductasa	PP1638	<i>fpr</i>	-2,51	0,0395
Citocromo <i>b561</i>	PP2010		-3,26	0,0039
Proteína tipo citocromo c	PP3822		-6,11	0,0017
Proteína tipo citocromo c	PP3823		-4,53	0,0022
Citocromo c oxidase Cbb3.1, subunidad III	PP4253	<i>ccoP1</i>	-20,81	0,0022
<b>Metabolismo energético</b>				
Proteína tipo aldehído deshidrogenasa	PP0545		-3,32	0,014
Alcohol deshidrogenasa	PP3839		-11,34	0,0017
<b>Metabolismo de aminoácidos y aminos</b>				
Carbamato quinasa	PP0999	<i>arcC</i>	-19,08	0,0039
Ornitina carbamoiltransferasa	PP1000	<i>argI</i>	-24,15	0,0051

---

Arginina deiminasa	PP1001	<i>arcA</i>	-29,81	0,0017
Arginina/ornitina, transportador	PP1002	<i>arcD</i>	-10,19	0,0039
Ornitina ciclodeaminasa	PP3190		-2,09	0,0232
Treonina deshidratasa	PP3191		-2,99	0,0039
<b>Procesos celulares</b>				
Posible proteína unión-DNA (estrés)	PP1210		-3,19	0,0040
Proteína de choque térmico CspA	PP1522	<i>cspA-1</i>	-3,21	0,0039
Arsenato reductasa	PP1645	<i>arsC-1</i>	-2,16	0,0118
Proteína de estrés	PP2648		-18,35	0,0063
<b>Envuelta celular</b>				
Proteína de membrana externa OprG	PP 0504	<i>oprG</i>	-35,58	0,0044
Posible lipoproteína	PP 2121		-3,84	0,0045
<b>Función desconocida</b>				
Proteína hipotética conservada	PP0181		-3,57	0,0038
Aminotransferasa clase I	PP0858		-2,18	0,0140
Hidrolasa carbono-nitrógeno	PP0859		-2,51	0,0236
Proteína hipotética conservada	PP0998		-7,11	0,0091
Proteína hipotética conservada	PP1514		-2,21	0,0140
Proteína hipotética conservada	PP1523		-2,19	0,0140
Proteína hipotética conservada	PP2161		-3,6	0,0039
Proteína hipotética	PP3840		-5,08	0,0164
Proteína hipotética	PP4228		-3,63	0,0143
Proteína hipotética conservada	PP4229		-3,55	0,0266
Proteína hipotética conservada	PP5260		-1,86	0,0254

---

---

<b>Otras</b>				
Proteasa Clp dependiente de ATP	PP0625	<i>clpB</i>	-2,32	0,0254
Proteína de choque térmico (HSP20)	PP3234		-5,54	0,0017
Posible acetolactato sintasa	PP1394		-1,87	0,0436
Riboflavina sintasa (subunidad alfa)	PP2916		-2,34	0,0143

---

## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

### **1.-Cyo es la única oxidasa terminal de *P. putida* implicada en represión catabólica**

La inducción de la ruta de degradación de alcanos codificada por el plásmido OCT de *P. putida* se inhibe fuertemente por la presencia de la ubiquinol oxidasa Cyo durante la fase exponencial de crecimiento (Dinamarca et al. 2002). En algunos microorganismos se han descrito oxidasas terminales que ejercen un efecto importante sobre la fisiología de la célula en determinadas condiciones. En *P. aeruginosa*, la ausencia o sobreexpresión de la oxidasa terminal CIO provoca defectos importantes en la división celular y un incremento considerable en la sensibilidad a diferentes antibióticos y al estrés oxidativo (Tavankar et al. 2003), y en *R. sphaeroides* la actividad de la oxidasa terminal Cbb3 impide la expresión de los de los pigmentos implicados en la fotosíntesis (Oh et al. 2004). Conociendo la importancia de la respiración en un microorganismo como *P. putida*, era posible que alguna de las otras oxidasas terminales de la bacteria estuvieran implicados en el fenómeno de represión catabólica que actúa sobre *PalkB*. Con objeto de saber si Cyo es la única oxidasa terminal de la cadena de transporte de electrones capaz de participar en la represión catabólica, se construyeron mutantes en el resto de oxidasas terminales y en el complejo *bc1* en la cepa PBS4 (que contiene una fusión de *PalkB* a *lacZ*), y se estudió su comportamiento a lo largo del crecimiento. Los resultados obtenidos indican que las oxidasas terminales CIO, Aa3, Cbb3.1, Cbb3.2 y el complejo *bc1*, no están implicados en la señal represora que parte de la cadena de transporte de electrones y termina inhibiendo la actividad del promotor *PalkB*. Por tanto Cyo es la única oxidasa terminal capaz de ejercer un claro efecto represor sobre la ruta de degradación de alcanos durante la fase exponencial de crecimiento. Esto sugiere que, probablemente, la señal parte de Cyo. La regulación ejercida por Cyo no sólo afecta a la inducción de la ruta de degradación del fenol (Petruschka et al. 2001) y de los alcanos (Dinamarca et al. 2002), sino que parece tener un papel más global sobre el metabolismo celular, ya que la inactivación del gen *cyoB* modifica la expresión de más de 100 genes en células que crecen exponencialmente en un medio rico LB (Morales et al. 2006). Dentro de los genes afectados por Cyo, una parte importante corresponde a transportadores de membrana, entre los cuales figuran los de ácidos dicarboxílicos y compuestos

aromáticos, lo que confirma la idea de que Cyo participa en el control global de rutas implicadas en la asimilación de fuentes de carbono en *P. putida* (Morales et al. 2006).

Tanto *P. putida* como *P. aeruginosa* poseen una cadena respiratoria compleja y ramificada. Se sabe que CIO en *P. aeruginosa* ejerce un papel importante en la fisiología celular (Tavankar et al. 2003). Además, la inactivación de Cbb3.1 en *P. aeruginosa* provoca un incremento en la expresión de CIO de 10 veces (Comolli y Donohue 2004). Estos datos y los resultados obtenidos sugieren que, en *Pseudomonas*, el papel de al menos parte de las oxidasas terminales trasciende su función como aceptores/donadores de electrones capaces de reducir al agua y de bombear protones al espacio periplásmico de manera simultánea. Cyo en *P. putida*, y CIO y Cbb3.1 en *P. aeruginosa*, tienen un papel que afecta de manera más global al metabolismo celular. Parece claro que la expresión de todas las oxidasas en ambas especies debe estar cuidadosamente regulada y coordinada.

## **2.-Los reguladores globales ANR y RoxR coordinan la expresión de las oxidasas terminales de *P. putida* en respuesta a oxígeno y carbono**

Los niveles de la oxidasa Cyo dependen de la fuente de carbono con que crece la bacteria, de la oxigenación del medio y de la fase de crecimiento (Dinamarca et al. 2003). Esta capacidad para responder a estímulos tan diferentes sugiere que los niveles de esta citocromo oxidasa deben estar cuidadosamente regulados con objeto de evitar problemas fisiológicos durante el crecimiento. Por otra parte, se sabe que la ausencia de Cyo causa una reorganización de la cadena de transporte de electrones (Morales et al. 2006), lo que apunta a que la expresión de los componentes de la cadena respiratoria deben estar regulados de manera coordinada.

Uno de los estímulos a los que Cyo responde es la disminución en los niveles de oxígeno. Entre las proteínas capaces de responder a la concentración de oxígeno se encuentra FNR de *E. coli*, homóloga de ANR en *P. aeruginosa* (Zimmermann et al. 1991; Winteler y Haas 1996). Ambas regulan la expresión de algunas oxidasas terminales de estas especies bacterianas. Con la finalidad de determinar si ANR es un regulador de la expresión coordinada de las oxidasas terminales de *P. putida* y si

responde, al igual que en otras especies, a cambios en la oxigenación del medio, se inactivó el gen *anr* en *P. putida* KT2440. También se interrumpió este gen en las estirpes de *P. putida* CYTC2 y CYTRL, dos cepas que contienen una fusión transcripcional y otra traduccional del promotor *PcyoA* a *lacZ*, para tratar de definir con más detalle el efecto de este regulador sobre la expresión de la oxidasa Cyo.

Por otra parte, en *P. aeruginosa* la expresión de la oxidasa terminal CIO depende del par sensor/regulador RoxS/RoxR, cuya función parece estar condicionada por la presencia de las oxidasas Cbb3.1 y Cbb3.2 (Comolli y Donohue 2002). Se desconoce si RoxS/RoxR tiene alguna función en la regulación de las oxidasas terminales de *P. putida*, y si responde a estímulos similares a los descritos en *P. aeruginosa* o en otros microorganismos, como es la oxigenación del medio. Con la finalidad de averiguar si este par sensor/regulador ejerce algún efecto sobre la cadena respiratoria de *P. putida*, se construyeron mutantes en el gen *roxR* en las mismas cepas descritas anteriormente.

### 2.1.-Efecto de ANR

La reorganización de la cadena de transporte de electrones en *P. putida* depende, por lo menos, de la fase de crecimiento en que se encuentra la bacteria (Morales et al. 2006). Para determinar si ANR tiene algún papel en esta reorganización, se midieron los niveles de expresión de todas las oxidasas terminales tanto en fase exponencial como en fase estacionaria por medio de PCR de tiempo real. Además, y para determinar si los cambios observados dependían únicamente de la fase de crecimiento o también de la oxigenación de los cultivos, se repitieron los mismos experimentos cultivando las células en fermentador. En este caso, sólo se analizaron muestras de fase exponencial. La oxigenación se mantuvo controlada a un 100% o a un 40% de saturación, lo que permitió determinar la respuesta de ANR a oxígeno.

Los resultados obtenidos muestran que, en células creciendo exponencialmente en matraces en un medio completo bien aireado, la proteína ANR es necesaria para la expresión de la oxidasa terminal Cbb3.1, pero no tiene un papel relevante en la expresión del resto de oxidasas terminales. Sin embargo, al entrar en

fase estacionaria, la ausencia de ANR provoca un incremento en la expresión de las oxididasas terminales Cyo y CIO, y un fuerte descenso en la expresión de Cbb3.1. A pesar de que ANR funciona como un sensor de oxígeno, Cbb3.1 responde a la ausencia de ANR incluso cuando las células se cultivan con una buena aireación. En *E. coli*, FNR se encuentra como monómero, y sólo cuando disminuye la concentración de oxígeno en el medio dimeriza para unirse a los promotores que regula (Lazazzera et al. 1996). Es posible que, aun en presencia de oxígeno, un pequeño porcentaje de las moléculas de ANR se encuentren como dímero y sean capaces de unirse a secuencias por las que tiene una alta afinidad. Por otra parte, puede haber variaciones en este modelo, puesto que FNR de *B. subtilis* está presente como dímero tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Reents et al. 2006). Se sabe que ANR de *P. aeruginosa* puede regular la expresión génica en condiciones de alta aireación (Zimmermann et al. 1991; Winteler y Haas 1996; Rompf et al. 1998; Comolli y Donohue 2004). De hecho, ANR es necesaria para la expresión de Cbb3.2 tanto en condiciones de alta como de baja oxigenación (Comolli y Donohue 2004). Sin embargo, cuando la oxigenación del medio es tan limitada como un 0,4% de saturación, la ausencia de ANR no altera el crecimiento de *P. aeruginosa* (Alvarez-Ortega y Harwood 2007), sugiriendo que en estas condiciones Cbb3.2 no es imprescindible para el crecimiento de la bacteria. Esta oxidasa terminal de *P. aeruginosa* responde de manera similar a la oxidasa terminal Cbb3.1 de *P. putida*, puesto que ambas requieren la presencia de ANR para expresarse adecuadamente, mientras que la expresión de Cbb3.1 de *P. aeruginosa* y Cbb3.2 de *P. putida* no dependen de ANR. Este hecho sugiere que podría haber un problema de anotación y nomenclatura entre ambas oxidadasas en las dos especies. En el genoma de *P. aeruginosa* los genes que codifican para Cbb3.2 (*ccoN2O2Q2P2*) se encuentran en posición 5' con respecto a los genes que codifican Cbb3.1 (*ccoN1O1Q1P1*), y ambas oxidadasas se transcriben en la misma dirección (Comolli y Donohue 2004). Sin embargo, en el genoma de *P. putida*, la orientación de estas dos oxidadasas terminales es la contraria, de manera que *ccoN1O1Q1P1* se encuentra en posición 5' con respecto a *ccoN2O2Q2P2*. En ambos casos, es el primero de los dos operones el que responde a ANR. Parece que la oxidasa Cbb3.1 de *P. putida* corresponde en realidad a Cbb3.2 de *P. aeruginosa*, mientras que Cbb3.2 de *P. putida* equivale a Cbb3.1 de *P. aeruginosa*.

Las citocromo oxidadasas tipo *cbb3* suelen tener una alta afinidad por el oxígeno, razón por la cual parecen importantes en condiciones en las que la concentración de

oxígeno se ve limitada (Preisig et al. 1996; Otten et al. 2001; Williams et al. 2007). Sin embargo la oxidasa Cbb3.1 de *P. aeruginosa* (independiente de ANR) es importante en condiciones de alta aireación, puesto que se expresa más que la oxidasa Cbb3.2 en dichas condiciones (Comolli y Donohue 2004). Por el contrario, la expresión de la oxidasa terminal Cbb3.2 (dependiente de ANR) se induce en condiciones de baja oxigenación. En *P. putida* la expresión de Cbb3.1 responde fuertemente a la caída en la concentración de oxígeno gracias a la proteína ANR, mientras que este regulador no tiene efecto alguno sobre Cbb3.2.

Una vez conocida la función de ANR en la reorganización de la cadena de transporte de electrones se valoró la posibilidad de que los efectos observados fueran directos, y derivados de la acción de ANR, o bien que fueran indirectos, mediados por otro tipo de cambios en el transcriptoma celular. Con objeto de definir el efecto de este regulador, se buscó una secuencia consenso similar a la descrita para *E. coli* y *P. aeruginosa* en el promotor de Cbb3.1. Se encontró una repetición invertida en la posición -38,5, que solapa parcialmente con la posición -35. Verificar que esta secuencia es una diana para ANR por técnicas bioquímicas planteaba el problema de que era poco probable que ANR purificada se uniese al DNA eficazmente en presencia de oxígeno. Para trabajar con ANR en condiciones aeróbicas se purificó una proteína mutante en la que el residuo Asp 154 se ha sustituido por Ala. Una mutación similar en la proteína FNR de *E. coli* genera un regulador constitutivamente activo, aun en presencia de oxígeno (Ziegelhoffer y Kiley 1995; Lazazzera et al. 1996). El efecto directo de ANR sobre Cbb3.1 se confirmó por ensayos de *footprinting* con DNasal, que mostraron un único sitio de unión de ANR en el lugar predicho. El efecto activador de ANR sobre la expresión de Cbb3.1 es compatible con la posición de la diana localizada. En *E. coli* la proteína homóloga FNR es capaz de activar la transcripción eficientemente cuando se une al DNA en la posición -41,5, interaccionando directamente con la RNA polimerasa (Wing et al. 1995; Rompf et al. 1998; Wing et al. 2000). ANR de *P. aeruginosa* es capaz de reemplazar FNR de *E. coli*, lo cual sugiere que ambas proteínas funcionan de manera similar (Winteler y Haas 1996). Dado que la ausencia de ANR provoca una fuerte caída en la expresión de *ccoN1* (primer gen del operón de Cbb3.1), parece claro que esta proteína funciona como un activador del promotor *PccoN1*. Su efecto es más fuerte cuanto menor es la concentración de oxígeno en el medio de crecimiento. En *P. aeruginosa* la caja ANR se encuentra en la posición -41,5 del promotor de Cbb3.2 (Comolli y Donohue 2004). Aunque la unión de ANR a este promotor no se ha demostrado experimentalmente, es probable que

ocurra lo mismo que en *P. putida*, y ANR active la expresión de Cbb3.2 desde esa posición.

Durante la entrada en fase estacionaria, o al limitar la oxigenación, el efecto de ANR es mayor que en fase exponencial o en cultivos óptimamente aireados, puesto que su ausencia provoca un incremento en la expresión de las ubiquinol oxidasas Cyo y CIO, sugiriendo por tanto que ANR es un represor de ambas. De hecho, la expresión de la oxidasa Cyo en *P. putida* es alta mientras las células crecen exponencialmente en un medio rico bien aireado, pero disminuye considerablemente al entrar en fase estacionaria o al limitar la concentración de oxígeno (Dinamarca et al. 2003; Morales et al. 2006). Los ensayos de *footprint* con DNasal han permitido identificar 2 sitios de unión para ANR, situados en las posiciones -129,5 y -168,5 con respecto al inicio del promotor *PcyoA*. La afinidad por el sitio 5' es mayor, y no se han encontrado otras zonas de unión más próximas al promotor. No está claro cómo ANR puede reprimir la expresión de Cyo desde una zona tan alejada del promotor, lo que sugiere que esta regulación no debe ser sencilla. Cuando la proteína FNR de *E. coli* funciona como represor, suele unirse a dos zonas adyacentes (Williams et al. 1998). Un caso especial es el del promotor del gen *yfiD* de *E. coli*, donde la unión de FNR a un sitio localizado en posición -93,5 previene el efecto activador de otro dímero de FNR que se une a -40,5, de manera que parece necesaria la interacción entre dos dímeros de FNR (Marshall et al. 2001). En el caso de la regulación de *PcyoA* por ANR, es posible que esta proteína interfiera con otros reguladores (entre los que podría encontrarse RoxR, ver más adelante), impidiendo una expresión excesiva de Cyo en condiciones en las que la aireación no es óptima. La regulación de los genes *cyoABCDE* en *P. aeruginosa* no se ha estudiado, aunque se sabe que una limitación de la oxigenación en el medio en que crecen las bacterias provoca un descenso en la expresión de esta oxidasa terminal (Alvarez-Ortega y Harwood 2007).

En *P. aeruginosa* la oxidasa terminal resistente a cianuro CIO parece especialmente importante, puesto que contribuye a la supervivencia de la célula en condiciones microaeróbicas (Alvarez-Ortega y Harwood 2007) y su sobreexpresión causa cambios graves en el metabolismo celular (Tavankar et al. 2003). No se conoce detalladamente la regulación de su expresión en este microorganismo, pero sí se sabe que ANR funciona como un represor de esta oxidasa terminal (Cunningham et al. 1997; Cooper et al. 2003), y que RoxR funciona como activador (Comolli y Donohue

2002). En *P. putida* la expresión de la oxidasa terminal CIO se induce cuando las células entran en fase estacionaria, o cuando se inactiva la oxidasa terminal Cyo por mutación (Morales et al. 2006). Sin embargo, se desconoce cuáles son los reguladores implicados. Los resultados descritos en este trabajo muestran que la inactivación de ANR produce un incremento considerable en la expresión de CIO en células cultivadas en dos condiciones diferentes: en medio rico LB durante la entrada en fase estacionaria, o en fermentador en fase exponencial y con la oxigenación limitada, lo cual sugiere que ANR funciona como un represor de CIO. De acuerdo con esto, los resultados obtenidos a partir de los *footprints* con DNasal muestran dos sitios adyacentes de unión de ANR, localizados justo después de los dos sitios de inicio de la transcripción de *cioA*, de manera que la unión de ANR a estas secuencias debe impedir la transcripción de *cioA*. La localización de la secuencia de unión es compatible con el efecto represor de ANR sobre CIO. La represión ejercida durante la entrada en fase estacionaria no es lo suficientemente fuerte como para evitar una inducción de la expresión de CIO de unas 50 veces al alcanzar dicha fase de crecimiento (Morales et al. 2006), sugiriendo por tanto que el efecto de ANR es limitado o que debe haber otros reguladores implicados. Según esto, ANR parece ejercer un efecto modulador sobre la expresión de CIO, de manera que se evite un exceso de esta oxidasa terminal en relación a las demás. Se desconoce cómo se induce la expresión de CIO al entrar en fase estacionaria, tanto en *P. aeruginosa* como en *P. putida*.

La oxidasa terminal CIO es resistente al cianuro, un compuesto producido por algunos microorganismos y que es capaz de inhibir todas las demás oxidasas terminales. En *P. putida* no existen los genes responsables de la síntesis de cianuro, pero en *P. aeruginosa* sí que están presentes. Este microorganismo es capaz de producir concentraciones elevadas de cianuro al entrar en fase estacionaria, lo cual incrementa su virulencia (Blumer y Haas 2000). La oxidasa CIO parece proteger a las células del cianuro exógeno (Zlosnik et al. 2006). En *P. aeruginosa*, los genes *cioAB* se transcriben a partir de un promotor que también está regulado por ANR (Cunningham et al. 1997), aunque la posición de las secuencias consenso es diferente de la de *P. putida*. En *P. aeruginosa* una se encuentra en posición 5' con respecto a la zona -35 y la otra en posición 3' con respecto al punto de inicio de la transcripción, mientras que en *P. putida* ambas cajas se encuentran inmediatamente después del punto de inicio de la transcripción.

Hasta ahora, las secuencias consenso de ANR en *Pseudomonas* se han deducido a partir de las similitudes con las cajas FNR de *E. coli* y por ensayos funcionales *in vivo* (Winteler y Haas 1996), pero no se han demostrado *in vitro*. Los resultados descritos en este trabajo muestran que la proteína ANR de *P. putida* se une a una secuencia conservada, TTGATCCNN<sup>A</sup><sub>G</sub>TCAA, en unas zonas compatibles con su efecto activador de la expresión de Cbb3.1 y con su efecto represor de la expresión de CIO, aunque con respecto a Cyo la regulación del promotor parece ser más compleja. Por otra parte, en los promotores de las dos ubiquinol oxidasas (Cyo y CIO) hay dos secuencias de unión de ANR, y en ambos casos esta proteína funciona como represor. La presencia de dos sitios de unión de ANR a los promotores *PcyoA* y *PcioA* se confirmó mediante ensayos de retardo en gel. Al observar estos ensayos la banda de menor movilidad, que debería corresponder a la unión de los dos dímeros de ANR al DNA, desaparece al añadir elevadas cantidades de proteína, cuando lo esperable debería ser lo contrario: un incremento en la intensidad de la banda de menor movilidad provocada por la unión de ANR al segundo sitio, por el que tiene menos afinidad. Es posible que la unión de ANR a estos dos promotores modifique la geometría o curvatura del DNA, y que los dos dímeros unidos a sus respectivas secuencias generen un complejo proteína-DNA con una geometría que favorezca su migración por el gel de poliacrilamida, mientras que el complejo con un sólo dímero tenga una geometría que dificulte la migración electroforética.

Por otra parte, ANR no parece tener efecto alguno sobre la expresión de las oxidasas Cbb3.2 ni de Aa3 en las condiciones analizadas. En *P. putida* la oxidasa Aa3 se induce fuertemente durante la entrada en fase estacionaria, mientras que la inducción de Cbb3.2 es más moderada (Morales et al. 2006). En *P. aeruginosa* la expresión de Aa3 también se induce con la entrada en fase estacionaria por efecto de RpoS (Schuster et al. 2004). Los resultados indican que ANR es una proteína importante en la coordinación de la expresión de parte de las oxidasas terminales de la bacteria en respuesta a oxígeno. Sin embargo, debe haber otros reguladores implicados en esa coordinación, capaces de responder a oxígeno o a otros estímulos como la fuente de carbono. Entre esos reguladores parece encontrarse RoxR, capaz de modificar la expresión de la cadena de transporte de electrones en determinadas circunstancias.

## 2.2.- Efecto de RoxR

El efecto del par sensor/regulador PrrB/A en *R. sphaeroides* depende del flujo de electrones a través de la oxidasa terminal Cbb3 y del estado redox de la bacteria (Elsen et al. 2004). Para averiguar si el par sensor/regulador RoxS/RoxR, homólogo de PrrB/PrrA en *R. sphaeroides*, era capaz de ejercer alguna influencia sobre la cadena respiratoria de *P. putida*, se inactivó el gen *roxR* en las cepas KT2440, CYTC2 y CYTRL. El efecto de esta mutación se analizó por medio de PCR de tiempo real, y por análisis de la expresión de  $\beta$ -galactosidasa de las dos últimas cepas. Los resultados obtenidos sugieren que esta proteína tiene una función complementaria a la de ANR en cuanto a la respuesta a cambios en la oxigenación, si bien su efecto es sensiblemente menor en las condiciones analizadas en este trabajo. RoxR parece funcionar como activador de Cyo y de Cbb3.1 en condiciones de baja aireación y como represor de Aa3, sin que se aprecien efectos sobre el resto de citocromo oxidasas en dichas condiciones. Se sabe que la proteína PrrA de *R. sphaeroides* responde a estímulos como una disminución en la concentración de oxígeno (Oh y Kaplan 2002; Oh et al. 2004), cambios en el estado redox de la célula (Swem et al. 2003) o alteraciones en el estado de óxido reducción de las ubiquinonas de la membrana (Swem et al. 2006). Los resultados obtenidos confirman que, en *P. putida*, RoxR también parece responder a cambios en la oxigenación del medio, puesto que en condiciones de aireación limitada la ausencia de esta proteína provoca una ligera modificación en la composición de la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, se sabe que el par sensor/regulador RegB/RegA de *R. capsulatus* es capaz de responder a otro tipo de estímulos, aún no identificados claramente, como alteraciones en la ruta biosintética de la bacterioclorofila (Abada et al. 2002). En el caso de RoxR de *P. putida*, además de alterar la composición de la cadena de transporte de electrones por efecto de la concentración de oxígeno, esta proteína es capaz de responder a cambios en la fuente de carbono. Al cultivar las células en un medio mínimo suplementado con succinato como única fuente de carbono, se aprecia un cierto cambio en la expresión de las diferentes citocromo oxidasas de la cadena de transporte de electrones cuando se inactiva el gen *roxR*. En estas condiciones, RoxR parece funcionar como represor de CIO, Aa3 y Cbb3.2, y como activador de Cyo. En *P. aeruginosa* RoxR funciona como un activador de CIO cuando hay cianuro en el medio de crecimiento (Comolli y Donohue 2002). Por otro lado, si bien el efecto de RoxR sobre Cyo no es muy grande, es lo suficientemente importante como para

provocar una pérdida de la represión catabólica ejercida sobre el promotor *PalkB* en medio mínimo suplementado con succinato (ver más adelante).

El par sensor regulador RegB/RegA de *R. capsulatus* es capaz de controlar la expresión de componentes importantes de la fotosíntesis y de la cadena de transporte de electrones. Concretamente RegA es capaz de unirse, y de regular directamente, la expresión del complejo *bc1*, de la ubiquinol oxidasa *cydAB* y de la citocromo *c* oxidasa *ccoNOQP* (Swem et al. 2001). A pesar de que se conoce un elevado número de promotores que están regulados directamente por esta familia de proteínas, no ha sido fácil determinar una secuencia consenso, e inicialmente se pensó que RegA reconocía una estructura del DNA en vez de una determinada secuencia (Du et al. 1998). La secuencia consenso propuesta, -YGCGRC--MMGNCGC-, donde R corresponde a una purina y M a A o T (Laguri et al. 2003), no ha permitido encontrar de manera fiable una zona de unión de RoxR a los promotores que podría regular, puesto que en el genoma de *P. putida* no es difícil encontrar secuencias como la descrita. Por otro lado, en *R. capsulatus* sólo se pudo determinar la unión de RegA a los promotores de los pigmentos fotosintéticos cuando se caracterizó una mutación que permite estabilizar la unión de la proteína al DNA (Du et al. 1998). Además, se sabe que la afinidad de RegA por el DNA se ve incrementada unas 16 veces por la fosforilación de esta proteína (Bird et al. 1999). En el caso de PrrA de *R. sphaeroides*, el acetil fosfato es capaz de fosforilar directamente a PrrA *in vitro*, favoreciendo que la proteína interaccione con la RNA polimerasa y se transcriba *cycA* desde el promotor P2 (Comolli et al. 2002).

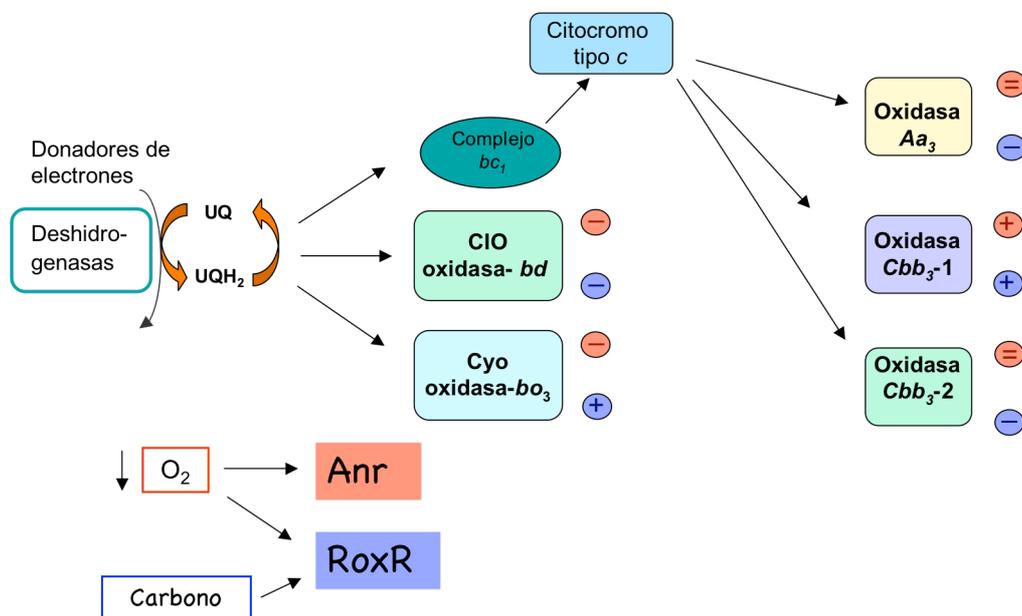
Se ha intentado determinar si existe un efecto directo de RoxR de *P. putida* sobre las diferentes oxididas terminales, pero no se ha visto unión de RoxR a *PcioA* (ni de *P. putida* ni de *P. aeruginosa*), ni por medio de ensayos de retardo en gel ni de *footprints*, a pesar de que RoxR es capaz de unirse al promotor de CIO en *P. aeruginosa*, y de que PrrA de *R. sphaeroides* es capaz de complementar un mutante en RoxR en *P. aeruginosa* (Comolli y Donohue 2002). En el caso de Cbb3.1 (cuya expresión desciende en fase estacionaria en medio LB al inactivar RoxR) tampoco se ha podido obtener una unión de RoxR a su promotor. En ninguno de los casos se ha podido observar cambio alguno al añadir acetil fosfato, capaz de fosforilar este tipo de proteínas para favorecer su unión al DNA *in vitro* (Bird et al. 1999).

Al intentar determinar si la proteína RoxR es capaz de regular directamente al promotor *PcyoA*, inicialmente no se observó unión alguna de esta proteína al DNA. Se

ha visto, por medio de ensayos de retardo en gel, que RoxR de *P. aeruginosa* es capaz de unirse al promotor de *cioA*, regulando su expresión directamente, tanto fosforilada como sin fosforilar (Comolli y Donohue 2002). Al intentar fosforilar RoxR *in vitro* utilizando acetil fosfato para localizar la unión de esta proteína a *PcyoA*, no se observó ningún incremento en la afinidad por el DNA, puesto que no se pudo determinar unión alguna. Es posible que el acetil fosfato no sea capaz de fosforilar RoxR o que, aun fosforilada, la afinidad de esta proteína por el DNA siga siendo extremadamente baja. Sin embargo, al utilizar RoxR\* -proteína mutante en la que se ha sustituido el residuo Ala 96 por Ser para estabilizar la unión de RoxR al DNA (Du et al. 1998)-, se observó que esta proteína es capaz de unirse a una zona concreta de *PcyoA*. Si bien la afinidad es muy baja y son necesarias elevadas cantidades de proteína para observar una unión, la zona protegida de la digestión con DNase I y la zona necesaria para la unión de RoxR\* determinada por interferencia con radical hidroxilo coinciden. Por tanto, parece que RoxR sí se une al promotor *PcyoA*, donde además funciona como activador. La unión de RoxR a *PcyoA* se localiza en la posición -110, y la secuencia protegida es GGGTGCACAACT, sin similitud aparente con la secuencia consenso anteriormente descrita. Esta posición se encuentra muy próxima a la zona de unión de ANR a la secuencia consenso situada en 3' (ANR-2). ANR funciona como un represor de Cyo cuando la concentración de oxígeno en el medio se ve limitada, mientras que RoxR funciona como un activador en condiciones similares. Dado que la zona de unión de cada una de estas dos proteínas está separada dos pares de bases, es posible que ambas proteínas interfieran una con otra en la regulación de Cyo, con objeto de garantizar que los niveles de esta oxidasa terminal se mantengan estrictamente regulados en dichas condiciones. Curiosamente, ambas proteínas ejercen un efecto opuesto sobre el promotor *PcyoA*. En la regulación de los pigmentos fotosintéticos de *R. capsulatus* la zona de unión del activador RegA se encuentra muy próxima a la del represor CrtJ, lo cual apunta a la posibilidad de que ambas proteínas compitan por la regulación de la expresión del promotor del gen *puc*, necesario para la expresión de los genes implicados en fotosíntesis (Du et al. 1998; Elsen et al. 1998). Al igual que sucede con la localización de los sitios de unión de ANR para la regulación de *PcyoA*, RoxR parece modular la expresión de este promotor desde una zona bastante alejada del punto de inicio de la transcripción de *cyoA*. RegA es capaz de unirse a zonas con una localización muy diferente y con una afinidad variable lo que sugiere que RegA –y quizá también RoxR- debe ser capaz de interactuar con la RNA polimerasa de diferentes maneras (Swem et al. 2001; Elsen et al. 2004), o de ejercer su función interfiriendo con la acción de otros reguladores.

Los resultados obtenidos muestran que la proteína RoxR\* purificada tiene una afinidad considerablemente baja por el promotor de la ubiquinol oxidasa Cyo en las condiciones ensayadas, e indetectable por los promotores de las oxidasas terminales Cbb3.1 y CIO. Quizá los cambios provocados en la cadena de transporte de electrones al inactivar RoxR y crecer las células en succinato se deban a un efecto secundario provocado por el descenso en la expresión de Cyo. Otra opción es que la práctica totalidad de RoxR purificada sea poco activa en condiciones aeróbicas y no sea posible observar una unión clara de esta proteína a los distintos promotores *in vitro*. Sin embargo, dado que RegA de *R. capsulatus* se une a los promotores que regula a una distancia muy variable (Swem et al. 2001), tampoco se puede descartar la posibilidad de que RoxR regule estos promotores desde una posición más alejada que aún no se ha podido localizar.

Como se ha visto, las oxidasas terminales de la cadena de transporte de electrones responden a cambios en la fuente de carbono y en la oxigenación. En estos cambios, ejercen un papel modulador las proteínas ANR y RoxR\*, respondiendo de manera diferente pero relacionada a ambos estímulos (Fig. 20).



**Figura 20.** Efecto de los reguladores ANR y RoxR en la expresión de las diversas oxidasas terminales en función de los niveles de oxígeno y de la fuente de carbono. (-), efecto represor; (+), efecto activador; (=), sin efecto. En rojo efecto de ANR, en azul el de RoxR.

### 2.3.-Regulación de Cyo

Se ha visto que la inactivación de la oxidasa terminal Cyo tiene un efecto significativo sobre la expresión de otras oxidasas terminales de la cadena de transporte de electrones (Morales et al. 2006). Se sabe que los niveles de las oxidasas terminales deben estar cuidadosamente regulados para garantizar unas condiciones óptimas de crecimiento (Tavankar et al. 2003; Morales et al. 2006), y Cyo es una oxidasa terminal cuyos niveles dependen tanto de la fuente de carbono con que crece la bacteria como de la oxigenación del medio (Dinamarca et al. 2003). Esto permite asumir que la regulación de Cyo, además de ser compleja, debe implicar la colaboración de un cierto número de reguladores capaces de responder a diferentes estímulos que garanticen una expresión óptima de esta oxidasa. El estudio de la expresión de *PcyoA* confirma que el efecto represor que esta oxidasa terminal ejerce sobre la inducción de la ruta de degradación de alcanos se correlaciona con los niveles de Cyo en los distintos medios, y varía además en función de la fase de crecimiento. En LB o en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono la expresión de Cyo es lo suficientemente elevada como para mantener la represión catabólica ejercida sobre *PalkB*.

Por otro lado, el estudio de la expresión de Cyo a lo largo del crecimiento ha permitido confirmar el efecto del par sensor/regulador RoxS/RoxR y de la proteína ANR sobre Cyo. Ambas proteínas parecen capaces de modular de manera complementaria la expresión de Cyo, ANR como activador y RoxR como represor. Además, estas dos proteínas permiten coordinar adecuadamente la expresión de Cyo con la del resto de citocromo oxidasas. De manera similar, en *R. capsulatus* la regulación de los genes implicados en la biosíntesis de los grupos hemo necesarios para la formación de la bacterioclorofila depende de varios reguladores redox (Smart et al. 2004). En *E. coli* se sabe que el regulador FNR ejerce un efecto represor sobre *cyoABCDE* (Cotter et al. 1990), que PdhR (*Pyruvate Dehydrogenase Complex Regulator*) es capaz de reprimir la expresión de *cyoA* desde una posición alejada del promotor (Ogasawara et al. 2007) y que ArcB/ArcA también reprime la expresión de *cyoA* (Shalel-Levanon et al. 2005). Los resultados obtenidos sobre la expresión de Cyo en *P. putida* muestran que en este microorganismo también hay una regulación

compleja y coordinada por más de un regulador, de manera que los niveles de esta oxidasa terminal parecen depender de pequeñas modificaciones ejercidas por cada uno de estos reguladores (y probablemente por otros aún no identificados) más que de una única proteína capaz de ejercer un efecto mucho mayor.

El número de reguladores implicados en procesos redox es muy variado, al igual que su capacidad para responder a diferentes estímulos, que no tienen por qué ser los mismos entre diferentes microorganismos. ANR y RoxR ejercen un efecto modulador y complementario sobre la cadena de transporte de electrones en *P. putida*, lo que sugiere que la cadena respiratoria no responde de manera abrupta a los cambios en la oxigenación, sino que más bien responde de manera gradual, al igual que sucede en *P. aeruginosa* (Alvarez-Ortega y Harwood 2007) o en *E. coli* (Partridge et al. 2007). Se conocen reguladores como Spx, capaz de responder a cambios en los grupos tiol (Nakano et al. 2005); Rex, cuyo efecto depende de la relación NADH/NAD<sup>+</sup> (Brekasis y Paget 2003) o ArcB/ArcA, que regula la expresión de determinados operones en función del estado de óxido-reducción de las ubiquinonas de la membrana (Georgellis et al. 2001). Esto apunta a que en *P. putida*, probablemente, haya los mismos u otros reguladores, capaces de responder a diferentes estímulos relacionados con el estado redox de la bacteria y de ejercer efectos complementarios a los de ANR y RoxR en cuanto a la regulación de la cadena respiratoria.

La respiración es en esencia un proceso de transferencia de electrones entre componentes con diferente potencial de óxido-reducción acoplada a la generación de energía. En este proceso la cadena respiratoria es esencial. Los datos mostrados apuntan a la importancia de la coordinación de la expresión de las diferentes oxidasas terminales en *P. putida*. Se sabe que microorganismos como *Shewanella oneidensis*, *Geobacter sulfurreducens* o *P. putida* poseen cadenas de transferencia de electrones complejas donde participan citocromos tipo c o quinonas. Estas son capaces de participar en procesos de respiración extracelular donde compuestos que no pueden entrar en el citoplasma son aprovechados para ceder o aceptar electrones a la vez que tiene lugar la fosforilación oxidativa (Gralnick y Newman 2007). Conocer los detalles de la respiración en *P. putida* podría ayudar a su aprovechamiento para diversos procesos, como desvelar los mecanismos que permiten conducir electrones en los *nanoalambres bacterianos* (Gorby et al. 2006) o en las pilas con bacterias (Rabaey y Verstraete 2005).

### 3.-Efecto de ANR y RoxR sobre el metabolismo celular

Se ha comprobado en este trabajo la importancia de los reguladores ANR y RoxR en la regulación de la cadena de transporte de electrones, analizando especialmente el caso de la ubiquinol oxidasa Cyo por su claro efecto regulador sobre el metabolismo de *P. putida*. Sin embargo, se desconoce si ambos reguladores tienen un efecto más global sobre el metabolismo bacteriano o si, por el contrario, actúan exclusivamente sobre la cadena respiratoria. Se ha abordado este problema de dos formas. Una ha sido comprobar si la inactivación de los genes *anr*, *roxS* o *roxR* afecta al proceso de represión catabólica que inhibe la inducción del promotor *PalkB* de la ruta de degradación de alcanos de *P. putida*. Para ello, se utilizó una cepa que contiene el promotor *PalkB* fusionado al gen testigo *lacZ*. La segunda manera ha sido utilizar un microarray genómico de *P. putida* KT2440 que ha permitido estudiar el efecto de estas proteínas sobre el transcriptoma celular.

#### 3.1.-Represión catabólica

Al inactivar *anr* no se observó ningún cambio en la expresión de *PalkB* en ninguno de los medios de crecimiento estudiados: LB o medio mínimo con succinato o con citrato como fuente de carbono. A pesar de que ANR tiene un claro efecto represor sobre Cyo, no parece que este efecto sobre la oxidasa terminal sea lo suficientemente importante como para observar una modificación apreciable en la represión catabólica ejercida sobre el promotor *PalkB*. Sin embargo, al inactivar *roxS* o *roxR*, se observó que en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono sí que hay una cierta pérdida de represión catabólica, efecto que aumenta al inactivar el gen *roxR*. En *R. capsulatus* la ausencia de RegA provoca una pérdida en la activación del gen *puf*, implicado en fotosíntesis, mayor que al inactivar RegB, lo que apunta a que RegA –y probablemente RoxR– pueden ser fosforilados por algún otro mecanismo aún no descrito (Mosley et al. 1994). Una vez conocidos los cambios que RoxR es capaz de ejercer sobre Cyo en dichas condiciones, parece claro que el efecto provocado por este par sensor/regulador sobre *PalkB* es secundario, y deriva de la alteración en la expresión de dicha oxidasa terminal.

### 3.2.- Efecto sobre el transcriptoma celular

Para complementar los resultados obtenidos sobre el efecto de ANR y RoxR en represión catabólica y poder evaluar la importancia de estas dos proteínas como reguladores globales, se realizó un estudio de los cambios que ocurren en el transcriptoma celular al inactivar ambos genes en la cepa KT2440, utilizando un microarray genómico de *P. putida*. Los resultados obtenidos sugieren que ANR es un regulador global capaz de modificar la expresión de, al menos, 41 genes, muchos de los cuales están implicados en la cadena de transporte de electrones. Concretamente, el efecto de ANR como activador de la rama de la cadena respiratoria que conduce los electrones hacia la oxidasa Cbb3.1 a través del complejo *bc1* es importante. También destaca la influencia de ANR sobre los genes implicados en el metabolismo de la arginina, lo que confirma la idea de que ANR es un regulador global de la expresión génica, importante para activar la expresión de vías alternativas de obtención de energía relacionadas con una disminución en la concentración de oxígeno. A pesar de que es en este grupo donde se encuentran los cambios más importantes, también hay genes implicados en estrés o en diferentes procesos celulares.

En el caso de RoxR los microarrays no muestran cambios significativos al cultivar las células en LB en matraz, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria, ni en medio mínimo suplementado con succinato. Es posible que el par sensor/regulador RoxS/RoxR, además de ejercer un efecto importante sobre Cyo, controle la expresión de algún gen imprescindible para el metabolismo celular en dichas condiciones, pero no haya sido posible obtener unos resultados suficientemente significativos como para detectarlos mediante microarrays. La tecnología de microarrays es muy útil, pero no demasiado sensible. Cuando los cambios no son muy pronunciados, la variabilidad experimental es elevada, y el tratamiento y filtrado de los datos elimina resultados positivos que sí pueden resultar detectables por otros métodos.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1.- Cyo es la única oxidasa terminal de la cadena de transporte de electrones capaz de enviar una señal que se traduce en un fenómeno de regulación global de la expresión génica.

2.- El regulador transcripcional ANR funciona como un sensor de oxígeno que coordina la expresión de las oxidasas terminales Cyo, CIO y Cbb3.1 en respuesta a una limitación de la oxigenación en el medio. Es capaz de unirse a los promotores de dichas oxidasas en unas posiciones compatibles con su efecto como activador o represor de la transcripción.

3.- La posición de los sitios de unión de ANR en el promotor *PcyoA* sugiere que en la regulación de la expresión de la citocromo oxidasa Cyo debe haber varias proteínas implicadas. ANR participa como un modulador de la expresión de esta citocromo oxidasa desde una posición bastante alejada del punto de inicio de la transcripción.

4.- El regulador RoxR es un sensor de oxígeno, capaz de complementar el efecto ejercido por ANR sobre la expresión de los componentes de la cadena respiratoria en condiciones de aireación limitante. Su efecto depende de la fuente de carbono con que crece la bacteria, regulando la expresión de los componentes de la cadena respiratoria cuando las células crecen en medio mínimo con succinato, pero no cuando crecen en medio rico LB con una aireación adecuada.

5.- RoxR ejerce un efecto directo sobre el promotor *PcyoA*. Aunque esta regulación es moderada, resulta suficiente como para ejercer un efecto secundario sobre represión catabólica.

6.- ANR funciona como un regulador global, capaz de adecuar la fisiología celular a una disminución en la concentración de oxígeno modificando la expresión de diversos genes no pertenecientes a la cadena respiratoria.

7.- La coordinación de la expresión de las distintas oxidasas terminales de *P. putida* parece depender de más de un regulador. Tanto ANR como RoxR ejercen un efecto modulador que permite optimizar el rendimiento de la cadena respiratoria al modificarse la concentración de oxígeno en el medio y la fuente de carbono con que crece la bacteria. Sin embargo, debe haber otros reguladores implicados en este proceso.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abada, E. M., Balzer, A., Jager, A. and Klug, G. (2002). "Bacteriochlorophyll-dependent expression of genes for pigment-binding proteins in *Rhodobacter capsulatus* involves the RegB/RegA two-component system." *Mol Genet Genomics* 267(2): 202-9.
- Abdelal, A. T., Bibb, W. F. and Nainan, O. (1982). "Carbamate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*: purification, characterization, physiological role, and regulation." *J Bacteriol* 151(3): 1411-9.
- Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E. and Iglewski, B. H. (1997). "Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* 179(12): 3928-35.
- Alvarez-Ortega, C. and Harwood, C. S. (2007). "Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration." *Mol Microbiol* 65(1): 153-65.
- Arai, H., Kodama, T. and Igarashi, Y. (1997). "Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*." *Mol Microbiol* 25(6): 1141-8.
- Aranda-Olmedo, I., Ramos, J. L. and Marques, S. (2005). "Integration of signals through Crc and PtsN in catabolite repression of *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0." *Appl Environ Microbiol* 71(8): 4191-8.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F. C., Bagdasarian, M. M., Frey, J. and Timmis, K. N. (1981). "Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*." *Gene* 16(1-3): 237-47.
- Bauchop, T. and Elsdon, S. R. (1960). "The growth of micro-organisms in relation to their energy supply." *J Gen Microbiol* 23: 457-69.
- Bertoni, G., Fujita, N., Ishihama, A. and de Lorenzo, V. (1998). "Active recruitment of sigma54-RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida*: role of IHF and alphaCTD." *Embo J* 17(17): 5120-8.

- Bird, T. H., Du, S. and Bauer, C. E. (1999). "Autophosphorylation, phosphotransfer, and DNA-binding properties of the RegB/RegA two-component regulatory system in *Rhodobacter capsulatus*." *J Biol Chem* 274(23): 16343-8.
- Blumer, C. and Haas, D. (2000). "Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis." *Arch Microbiol* 173(3): 170-7.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brekasis, D. and Paget, M. S. (2003). "A novel sensor of NADH/NAD<sup>+</sup> redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Embo J* 22(18): 4856-65.
- Busby, S. and Ebright, R. H. (1999). "Transcription activation by catabolite activator protein (CAP)." *J Mol Biol* 293(2): 199-213.
- Canosa, I., Sanchez-Romero, J. M., Yuste, L. and Rojo, F. (2000). "A positive feedback mechanism controls expression of AlkS, the transcriptional regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway." *Mol Microbiol* 35(4): 791-9.
- Carter, J. P., Richardson, D. J. and Spiro, S. (1995). "Isolation and characterisation of a strain of *Pseudomonas putida* that can express a periplasmic nitrate reductase." *Arch Microbiol* 163(3): 159-66.
- Cases, I. and de Lorenzo, V. (2005). "Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context." *Nat Rev Microbiol* 3(2): 105-18.
- Cases, I., Perez-Martin, J. and de Lorenzo, V. (1999). "The IANtr (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the sigma54-dependent Pu promoter of the TOL plasmid." *J Biol Chem* 274(22): 15562-8.
- Cases, I., Velazquez, F. and de Lorenzo, V. (2001). "Role of ptsO in carbon-mediated inhibition of the Pu promoter belonging to the pWW0 *Pseudomonas putida* plasmid." *J Bacteriol* 183(17): 5128-33.
- Castor, L. N. and Chance, B. (1959). "Photochemical Determinations of the Oxidases of Bacteria." *The Journal of Biological Chemistry* 234(6): 1587-1592.
- Castresana, J., Lubben, M., Saraste, M. and Higgins, D. G. (1994). "Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen." *Embo J* 13(11): 2516-25.
- Chakrabarty, A. M., Chou, G. and Gunsalus, I. C. (1973). "Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(4): 1137-40.
- Chen, B. and Przybyla, A. E. (1994). "An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR." *Biotechniques* 17(4): 657-9.

- Comolli, J. C., Carl, A. J., Hall, C. and Donohue, T. (2002). "Transcriptional activation of the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c(2) gene P2 promoter by the response regulator PrrA." *J Bacteriol* 184(2): 390-9.
- Comolli, J. C. and Donohue, T. J. (2002). "*Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase." *Mol Microbiol* 45(3): 755-68.
- Comolli, J. C. and Donohue, T. J. (2004). "Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* cbb<sub>3</sub> cytochrome oxidases." *Mol Microbiol* 51(4): 1193-203.
- Cooper, M., Tavankar, G. R. and Williams, H. D. (2003). "Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* 149(Pt 5): 1275-84.
- Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B. and Gunsalus, R. P. (1990). "Cytochrome o (cyoABCDE) and d (cydAB) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product." *J Bacteriol* 172(11): 6333-8.
- Crack, J., Green, J. and Thomson, A. J. (2004). "Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR)." *J Biol Chem* 279(10): 9278-86.
- Cunningham, L., Pitt, M. and Williams, H. D. (1997). "The *cioAB* genes from *Pseudomonas aeruginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome *bd* quinol oxidases." *Mol Microbiol* 24(3): 579-91.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K. N. (1990). "Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria." *J Bacteriol* 172(11): 6568-72.
- de Lorenzo, V. and Timmis, K. N. (1994). "Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons." *Methods Enzymol* 235: 386-405.
- Deckers-Hebestreit, G. and Altendorf, K. (1996). "The F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F<sub>0</sub> complex." *Annu Rev Microbiol* 50: 791-824.
- Dinamarca, A. (2003). Control fisiológico de la ruta de degradación de alcanos del plásmido OCT de *Pseudomonas putida* GPo1. Madrid. Universidad Autónoma.
- Dinamarca, M. A., Aranda-Olmedo, I., Puyet, A. and Rojo, F. (2003). "Expression of the *Pseudomonas putida* OCT plasmid alkane degradation pathway is modulated

- by two different global control signals: evidence from continuous cultures." *J Bacteriol* 185(16): 4772-8.
- Dinamarca, M. A., Ruiz-Manzano, A. and Rojo, F. (2002). "Inactivation of cytochrome o ubiquinol oxidase relieves catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway." *J Bacteriol* 184(14): 3785-93.
- Dos Santos, V. A., Heim, S., Moore, E. R., Stratz, M. and Timmis, K. N. (2004). "Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440." *Environ Microbiol* 6(12): 1264-86.
- Du, S., Bird, T. H. and Bauer, C. E. (1998). "DNA binding characteristics of RegA. A constitutively active anaerobic activator of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*." *J Biol Chem* 273(29): 18509-13.
- Elsen, S., Ponnampalam, S. N. and Bauer, C. E. (1998). "CrtJ bound to distant binding sites interacts cooperatively to aerobically repress photopigment biosynthesis and light harvesting II gene expression in *Rhodobacter capsulatus*." *J Biol Chem* 273(46): 30762-9.
- Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L. and Bauer, C. E. (2004). "RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 263-79.
- Esteve-Nunez, A., Lucchesi, G., Philipp, B., Schink, B. and Ramos, J. L. (2000). "Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11." *J Bacteriol* 182(5): 1352-5.
- Figurski, D. H. and Helinski, D. R. (1979). "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4): 1648-52.
- Georgellis, D., Kwon, O. and Lin, E. C. (2001). "Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria." *Science* 292(5525): 2314-6.
- Gibson, J. L., Dubbs, J. M. and Tabita, F. R. (2002). "Differential expression of the CO<sub>2</sub> fixation operons of *Rhodobacter sphaeroides* by the Prr/Reg two-component system during chemoautotrophic growth." *J Bacteriol* 184(23): 6654-64.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Hill, E. A., Shi, L., Elias, D. A., Kennedy, D. W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealson, K. H. and Fredrickson, J. K. (2006). "Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(30): 11358-63.

- Govantes, F., Albrecht, J. A. and Gunsalus, R. P. (2000). "Oxygen regulation of the *Escherichia coli* cytochrome d oxidase (cydAB) operon: roles of multiple promoters and the Fnr-1 and Fnr-2 binding sites." *Mol Microbiol* 37(6): 1456-69.
- Gralnick, J. A. and Newman, D. K. (2007). "Extracellular respiration." *Mol Microbiol* 65(1): 1-11.
- Green, J. and Paget, M. S. (2004). "Bacterial redox sensors." *Nat Rev Microbiol* 2(12): 954-66.
- Hayes, J. J. and Tullius, T. D. (1989). "The missing nucleoside experiment: a new technique to study recognition of DNA by protein." *Biochemistry* 28(24): 9521-7.
- Hirayama, H., Takami, H., Inoue, A. and Horikoshi, K. (1998). "Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from *Pseudomonas putida* IH-2000." *FEMS Microbiol Lett* 169(2): 219-25.
- Hosler, J. P., Ferguson-Miller, S. and Mills, D. A. (2006). "Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes." *Annu Rev Biochem* 75: 165-87.
- Jervis, A. J. and Green, J. (2007). "In vivo demonstration of FNR dimers in response to lower O<sub>2</sub> availability." *J Bacteriol* 189(7): 2930-2.
- Kang, Y., Weber, K. D., Qiu, Y., Kiley, P. J. and Blattner, F. R. (2005). "Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function." *J Bacteriol* 187(3): 1135-60.
- Kaniga, K., Delor, I. and Cornelis, G. R. (1991). "A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*." *Gene* 109(1): 137-41.
- Kim, Y. J., Ko, I. J., Lee, J. M., Kang, H. Y., Kim, Y. M., Kaplan, S. and Oh, J. I. (2007). "Dominant Role of the cbb3 Oxidase in Regulation of Photosynthesis Gene Expression through the PrrBA System in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1." *J Bacteriol* 189(15): 5617-25.
- Korner, H., Sofia, H. J. and Zumft, W. G. (2003). "Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs." *FEMS Microbiol Rev* 27(5): 559-92.
- Laguri, C., Phillips-Jones, M. K. and Williamson, M. P. (2003). "Solution structure and DNA binding of the effector domain from the global regulator PrrA (RegA) from *Rhodobacter sphaeroides*: insights into DNA binding specificity." *Nucleic Acids Res* 31(23): 6778-87.
- Lazazzera, B. A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M. C. and Kiley, P. J. (1996). "DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen." *J Biol Chem* 271(5): 2762-8.

- Lu, C. D., Winteler, H., Abdelal, A. and Haas, D. (1999). "The ArgR regulatory protein, a helper to the anaerobic regulator ANR during transcriptional activation of the *arcD* promoter in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* 181(8): 2459-64.
- MacGregor, C. H., Arora, S. K., Hager, P. W., Dail, M. B. and Phibbs, P. V., Jr. (1996). "The nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* pyrE-crc-rph region and the purification of the *crc* gene product." *J Bacteriol* 178(19): 5627-35.
- Marshall, F. A., Messenger, S. L., Wyborn, N. R., Guest, J. R., Wing, H., Busby, S. J. and Green, J. (2001). "A novel promoter architecture for microaerobic activation by the anaerobic transcription factor FNR." *Mol Microbiol* 39(3): 747-53.
- McCleary, W. R. and Stock, J. B. (1994). "Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators." *J Biol Chem* 269(50): 31567-72.
- Milanesio, P. A. (2007). El sistema cAMP-Crp de *Pseudomonas putida*. Madrid. Universidad Autónoma.
- Miller, J. H. (1972). "Experiments in Molecular Genetics."
- Morales, G., Linares, J. F., Beloso, A., Albar, J. P., Martinez, J. L. and Rojo, F. (2004). "The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds." *J Bacteriol* 186(5): 1337-44.
- Morales, G., Ugidos, A. and Rojo, F. (2006). "Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and *cbb3-1* terminal oxidases." *Environ Microbiol* 8(10): 1764-74.
- Moreno, R., Ruiz-Manzano, A., Yuste, L. and Rojo, F. (2007). "The *Pseudomonas putida* Crc global regulator is an RNA binding protein that inhibits translation of the AlkS transcriptional regulator." *Mol Microbiol* 64(3): 665-75.
- Mosley, C. S., Suzuki, J. Y. and Bauer, C. E. (1994). "Identification and molecular genetic characterization of a sensor kinase responsible for coordinately regulating light harvesting and reaction center gene expression in response to anaerobiosis." *J Bacteriol* 176(24): 7566-73.
- Musser, S. M. and Chan, S. I. (1998). "Evolution of the cytochrome c oxidase proton pump." *J Mol Evol* 46(5): 508-20.
- Nakano, S., Erwin, K. N., Ralle, M. and Zuber, P. (2005). "Redox-sensitive transcriptional control by a thiol/disulphide switch in the global regulator, Spx." *Mol Microbiol* 55(2): 498-510.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O.,

- Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J. A., Timmis, K. N., Dusterhoft, A., Tummeler, B. and Fraser, C. M. (2002). "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440." *Environ Microbiol* 4(12): 799-808.
- Ogasawara, H., Ishida, Y., Yamada, K., Yamamoto, K. and Ishihama, A. (2007). "PdhR (pyruvate dehydrogenase complex regulator) controls the respiratory electron transport system in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 189(15): 5534-41.
- Oh, J. I. and Kaplan, S. (1999). "The *cbb3* terminal oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: structural and functional implications for the regulation of spectral complex formation." *Biochemistry* 38(9): 2688-96.
- Oh, J. I. and Kaplan, S. (2000). "Redox signaling: globalization of gene expression." *Embo J* 19(16): 4237-47.
- Oh, J. I. and Kaplan, S. (2001). "Generalized approach to the regulation and integration of gene expression." *Mol Microbiol* 39(5): 1116-23.
- Oh, J. I. and Kaplan, S. (2002). "Oxygen adaptation. The role of the CcoQ subunit of the *cbb3* cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1." *J Biol Chem* 277(18): 16220-8.
- Oh, J. I., Ko, I. J. and Kaplan, S. (2004). "Reconstitution of the *Rhodobacter sphaeroides* *cbb3*-PrrBA signal transduction pathway in vitro." *Biochemistry* 43(24): 7915-23.
- Otten, M. F., Stork, D. M., Reijnders, W. N., Westerhoff, H. V. and Van Spanning, R. J. (2001). "Regulation of expression of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*." *Eur J Biochem* 268(8): 2486-97.
- Partridge, J. D., Sanguinetti, G., Dibden, D. P., Roberts, R. E., Poole, R. K. and Green, J. (2007). "Transition of *Escherichia coli* from aerobic to micro-aerobic conditions involves fast and slow reacting regulatory components." *J Biol Chem* 282(15): 11230-7.
- Pemberton, J. M., Horne, I. M. and McEwan, A. G. (1998). "Regulation of photosynthetic gene expression in purple bacteria." *Microbiology* 144 (Pt 2): 267-78.
- Perez-Martin, J. and De Lorenzo, V. (1995). "Integration host factor suppresses promiscuous activation of the sigma 54-dependent promoter Pu of *Pseudomonas putida*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16): 7277-81.

- Petruschka, L., Burchhardt, G., Muller, C., Weihe, C. and Herrmann, H. (2001). "The cyo operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation." *Mol Genet Genomics* 266(2): 199-206.
- Pieper, D. H., Martins dos Santos, V. A. and Golyshin, P. N. (2004). "Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants." *Curr Opin Biotechnol* 15(3): 215-24.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thony-Meyer, L., Appleby, C. A. and Hennecke, H. (1996). "A high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*." *J Bacteriol* 178(6): 1532-8.
- Rabaey, K. and Verstraete, W. (2005). "Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation." *Trends Biotechnol* 23(6): 291-8.
- Reents, H., Gruner, I., Harmening, U., Bottger, L. H., Layer, G., Heathcote, P., Trautwein, A. X., Jahn, D. and Hartig, E. (2006). "Bacillus subtilis Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state." *Mol Microbiol* 60(6): 1432-45.
- Richardson, D. J. (2000). "Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment." *Microbiology* 146 (Pt 3): 551-71.
- Rojo, F. and Dinamarca, M. A. (2004). Catabolite Repression and Physiological Control. Chapter 13. *The Pseudomonads Vol II. Virulence and Gene Regulation*. J. L. Ramos, Kluwer Academic/Plenum Publishers. Vol II.: 365-387.
- Rompf, A., Hungerer, C., Hoffmann, T., Lindenmeyer, M., Romling, U., Gross, U., Doss, M. O., Arai, H., Igarashi, Y. and Jahn, D. (1998). "Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* hemF and hemN by the dual action of the redox response regulators Anr and Dnr." *Mol Microbiol* 29(4): 985-97.
- Ruiz-Manzano, A., Yuste, L. and Rojo, F. (2005). "Levels and activity of the *Pseudomonas putida* global regulatory protein Crc vary according to growth conditions." *J Bacteriol* 187(11): 3678-86.
- Saier, M. H., Jr., Chauvaux, S., Deutscher, J., Reizer, J. and Ye, J. J. (1995). "Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in gram-negative versus gram-positive bacteria." *Trends Biochem Sci* 20(7): 267-71.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual." *Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert, M. and Jahn, D. (2007). "The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration." *J Bacteriol* 189(11): 4310-4.

- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S. and Greenberg, E. P. (2004). "The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing." *Mol Microbiol* 51(4): 973-85.
- Shalel-Levanon, S., San, K. Y. and Bennett, G. N. (2005). "Effect of oxygen, and ArcA and FNR regulators on the expression of genes related to the electron transfer chain and the TCA cycle in *Escherichia coli*." *Metab Eng* 7(5-6): 364-74.
- Smart, J. L., Willett, J. W. and Bauer, C. E. (2004). "Regulation of hem gene expression in *Rhodobacter capsulatus* by redox and photosystem regulators RegA, CrtJ, FnrL, and AerR." *J Mol Biol* 342(4): 1171-86.
- Stulke, J. and Hillen, W. (1999). "Carbon catabolite repression in bacteria." *Curr Opin Microbiol* 2(2): 195-201.
- Stulke, J. and Hillen, W. (2000). "Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species." *Annu Rev Microbiol* 54: 849-80.
- Sweet, W. J. and Peterson, J. A. (1978). "Changes in cytochrome content and electron transport patterns in *Pseudomonas putida* as a function of growth phase." *J Bacteriol* 133(1): 217-24.
- Swem, D. L. and Bauer, C. E. (2002). "Coordination of ubiquinol oxidase and cytochrome cbb(3) oxidase expression by multiple regulators in *Rhodobacter capsulatus*." *J Bacteriol* 184(10): 2815-20.
- Swem, L. R., Elsen, S., Bird, T. H., Swem, D. L., Koch, H. G., Myllykallio, H., Daldal, F. and Bauer, C. E. (2001). "The RegB/RegA two-component regulatory system controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in *Rhodobacter capsulatus*." *J Mol Biol* 309(1): 121-38.
- Swem, L. R., Gong, X., Yu, C. A. and Bauer, C. E. (2006). "Identification of a ubiquinone-binding site that affects autophosphorylation of the sensor kinase RegB." *J Biol Chem* 281(10): 6768-75.
- Swem, L. R., Kraft, B. J., Swem, D. L., Setterdahl, A. T., Masuda, S., Knaff, D. B., Zaleski, J. M. and Bauer, C. E. (2003). "Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine." *Embo J* 22(18): 4699-708.
- Sze, C. C., Laurie, A. D. and Shingler, V. (2001). "In vivo and in vitro effects of integration host factor at the DmpR-regulated sigma(54)-dependent Po promoter." *J Bacteriol* 183(9): 2842-51.
- Tavankar, G. R., Mossialos, D. and Williams, H. D. (2003). "Mutation or overexpression of a terminal oxidase leads to a cell division defect and multiple antibiotic sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biol Chem* 278(7): 4524-30.

- Timmis, K. N. (2002). "*Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence." *Environ Microbiol* 4(12): 779-81.
- van Beilen, J. B. and Witholt, B. (2004). Alkane degradation by Pseudomonads. *The Pseudomonads Vol III. Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*. J. L. Ramos, Kluwer Academic/Plenum Publishers. Vol III: 397-423.
- van Beilen, J. B. and Funhoff, E. G. (2007). "Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation." *Appl Microbiol Biotechnol* 74(1): 13-21.
- van Beilen, J. B., Marin, M. M., Smits, T. H., Rothlisberger, M., Franchini, A. G., Witholt, B. and Rojo, F. (2004). "Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis*." *Environ Microbiol* 6(3): 264-73.
- van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A. G., Rothlisberger, M. and Witholt, B. (2001). "Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes." *Microbiology* 147(Pt 6): 1621-30.
- van Beilen, J. B., Wubbolts, M. G. and Witholt, B. (1994). "Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*." *Biodegradation* 5(3-4): 161-74.
- Velazquez, F., Pfluger, K., Cases, I., De Eugenio, L. I. and de Lorenzo, V. (2007). "The phosphotransferase system formed by PtsP, PtsO, and PtsN proteins controls production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*." *J Bacteriol* 189(12): 4529-33.
- Wackett, L. P. (2003). "*Pseudomonas putida*--a versatile biocatalyst." *Nat Biotechnol* 21(2): 136-8.
- Weinel, C., Nelson, K. E. and Tumbler, B. (2002). "Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence." *Environ Microbiol* 4(12): 809-18.
- Williams, H. D., Zlosnik, J. E. and Ryall, B. (2007). "Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*." *Adv Microb Physiol* 52: 1-71.
- Williams, S. M., Wing, H. J. and Busby, S. J. (1998). "Repression of transcription initiation by *Escherichia coli* FNR protein: repression by FNR can be simple." *FEMS Microbiol Lett* 163(2): 203-8.
- Wing, H. J., Green, J., Guest, J. R. and Busby, S. J. (2000). "Role of activating region 1 of *Escherichia coli* FNR protein in transcription activation at class II promoters." *J Biol Chem* 275(37): 29061-5.

- Wing, H. J., Williams, S. M. and Busby, S. J. (1995). "Spacing requirements for transcription activation by *Escherichia coli* FNR protein." *J Bacteriol* 177(23): 6704-10.
- Winteler, H. V. and Haas, D. (1996). "The homologous regulators ANR of *Pseudomonas aeruginosa* and FNR of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters." *Microbiology* 142 (Pt 3): 685-93.
- Yoon, S. S., Karabulut, A. C., Lipscomb, J. D., Hennigan, R. F., Lyman, S. V., Groce, S. L., Herr, A. B., Howell, M. L., Kiley, P. J., Schurr, M. J., Gaston, B., Choi, K. H., Schweizer, H. P. and Hassett, D. J. (2007). "Two-pronged survival strategy for the major cystic fibrosis pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*, lacking the capacity to degrade nitric oxide during anaerobic respiration." *Embo J*.
- Yuste, L., Canosa, I. and Rojo, F. (1998). "Carbon-source-dependent expression of the PalkB promoter from the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway." *J Bacteriol* 180(19): 5218-26.
- Yuste, L., Hervas, A. B., Canosa, I., Tobes, R., Jimenez, J. I., Nogales, J., Perez-Perez, M. M., Santero, E., Diaz, E., Ramos, J. L., de Lorenzo, V. and Rojo, F. (2006). "Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray." *Environ Microbiol* 8(1): 165-77.
- Yuste, L. and Rojo, F. (2001). "Role of the *crc* gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway." *J Bacteriol* 183(21): 6197-206.
- Ziegelhoffer, E. C. and Kiley, P. J. (1995). "In vitro analysis of a constitutively active mutant form of the *Escherichia coli* global transcription factor FNR." *J Mol Biol* 245(4): 351-61.
- Zimmermann, A., Reimann, C., Galimand, M. and Haas, D. (1991). "Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 5(6): 1483-90.
- Zlosnik, J. E., Tavankar, G. R., Bundy, J. G., Mossialos, D., O'Toole, R. and Williams, H. D. (2006). "Investigation of the physiological relationship between the cyanide-insensitive oxidase and cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* 152(Pt 5): 1407-15.