



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE *Rhizobium*  
A ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO:  
PAPEL DE LAS ENZIMAS NiR Y NoR”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS PRESENTA:

**NICOLÁS GÓMEZ HERNÁNDEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Centro de Ciencias Genómicas, perteneciente a la Universidad Nacional autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Girard Cuesy.

## ÍNDICE

	Página
Resumen.....	1
Abstract.....	3
Introducción.....	4
Ciclo del nitrógeno.....	6
Desnitrificación.....	7
<i>Rhizobium etli</i> CFN42.....	8
Nitrato reductasas.....	10
Nitrato reductasas respiratorias.....	10
Nitrato reductasas asimilatorias.....	11
Nitrito reductasas.....	12
Óxido nítrico reductasas.....	14
Óxido nitroso reductasas.....	16
Óxido nítrico.....	17
Óxido nítrico en plantas.....	18
Transportadores de óxidos de nitrógeno.....	19
Regulación de los genes de desnitrificación.....	19
Regulación por oxígeno.....	20
Reguladores de la familia CRP/FNR.....	20
Regulación por óxido nítrico.....	23
Antecedentes.....	25
Artículo: “Function of the <i>Rhizobium etli</i> CFN42 <i>nirK</i> gene in nitrite metabolism”.....	26
Objetivo.....	30
Objetivo general.....	30
Objetivos particulares.....	30
Resultados.....	31
Artículo: “Regulation and Symbiotic Role of <i>nirK</i> and <i>norC</i> Expression in <i>Rhizobium etli</i> ”.....	32
Resultados adicionales.....	45
Conclusiones y discusión.....	52
Perspectivas.....	56
Bibliografía.....	58

## RESUMEN

Las bacterias utilizan una gran variedad de aceptores de electrones en la cadena respiratoria los cuales se reducen para obtener energía. Entre ellos tenemos al oxígeno, el azufre, los sulfonatos, el metano, el fierro, el manganeso y los óxidos de nitrógeno como el nitrato y el nitrito. En condiciones anaeróbicas, el nitrato es el aceptor de electrones preferido para respirar y el nitrito es la segunda molécula mas utilizada en la cadena respiratoria. La reducción del nitrato y del nitrito la llevan a cabo reductasas específicas que pertenecen a la vía de desnitrificación.

*Rhizobium etli* no tiene la capacidad de utilizar nitrato para respirar y carece actividad de nitrato reductasa. Las enzimas necesarias para llevar a cabo la reducción del nitrato no están codificadas en su genoma. Sin embargo, en el plásmido pCFN42f existe un grupo de genes relacionados con el proceso de desnitrificación que incluye genes que codifican para la nitrito reductasa de Cu (*nirK*), la óxido nítrico reductasa (*norCBQD*) y para el regulador NnrR (*nnrR*).

En este trabajo llevamos a cabo la caracterización genética y funcional de las reductasas codificadas en *R. etli* CFN42. Mediante fusiones transcripcionales y experimentos de RT-PCR, determinamos que en vida libre, *R. etli* regula la respuesta a óxidos de nitrógeno mediante la expresión coordinada de los genes *nirK* y *norC*. La expresión de estos genes en condiciones microaeróbicas se regula por el factor transcripcional FixKf mientras que, para su inducción en respuesta a óxidos de nitrógeno se requiere del regulador NnrR. La regulación de estos genes mediada por NnrR presenta un patrón diferencial; mientras que en una mutante en *nnrR* no detectamos expresión microaeróbica de *norCB*, la expresión de *nirK* se mantiene. Nuestros resultados muestran que *nirK* está sujeto tanto a regulación positiva como a regulación negativa, mediada de forma positiva por los reguladores FixKf y NnrR, y de forma negativa por NifA. El arreglo genómico en el mismo operón de los genes *nirK* y *nnrR* en *R. etli*, sugiere que NnrR controla su propia expresión en respuesta al NO. La actividad de la nitrito reductasa y la expresión de *norC* son dependientes de NnrR. Por lo tanto, la expresión génica en respuesta al NO está finamente regulada en *R. etli* para prevenir los efectos deletéreos de la expresión de *nirK*.

El análisis funcional de las cepas *nirK*- y *norC*- mostró que las enzimas codificadas por estos genes se necesitan para reducir el nitrito y el óxido nítrico en condiciones microaeróbicas. En simbiosis, encontramos que la mutación en *norC* afecta la actividad de nitrogenasa cuando las plantas inoculadas con esta cepa crecen en presencia de nitrato. Esta disminución en actividad específica de nitrogenasa no se observa en las plantas inoculadas con la cepa mutante en *nirK*. Interesantemente, en estas condiciones se observa un aumento en la formación de complejos nitrosil-leghemoglobina en las cepas silvestre y mutante en *norC*. Nuestros resultados claramente demuestran que en *R. etli* se requiere el producto de *norC* para la detoxificación de óxido nítrico y que el nivel de tolerancia a éste está determinado por el balance de las actividades de NirK y NorC.

## ABSTRACT

*Rhizobium etli* CFN42 is unable to use nitrate for respiration and lacks nitrate reductase activity as well as the *nap* or *nar* genes encoding respiratory nitrate reductase. However, genes encoding proteins closely related to denitrification enzymes, the *norCBQD* gene cluster and a novel *nirKnirVnnrRnnrU* operon are located on pCFN42f. In this study, we carried out a genetic and functional characterization of the reductases encoded by the *R. etli nirK* and *norCB* genes. By gene fusion expression analysis in free-living conditions, we determined that *R. etli* regulates its response to nitric oxide through NnrR via the microaerobic expression mediated by FixKf. Interestingly, expression of the *norC* and *nirK* genes displays a different level of dependence for NnrR. A null mutation in *nnrR* causes a drastic drop in the expression of *norC*, while *nirK* still exhibits significant expression. A thorough analysis of the *nirK* regulatory region revealed that this gene is under both positive and negative regulation. Functional analysis carried out in this work demonstrated that reduction of nitrite and nitric oxide in *R. etli* requires the reductase activities encoded by the *norCBQD* and *nirK* genes. Levels of nitrosylhemoglobin complexes in bean plants exposed to nitrate are increased in a *norC* mutant but decreased in a *nirK* mutant. The nitrate-induced decline in nitrogenase-specific activity observed in both the wild type and the *norC* mutant was not detected in the *nirK* mutant. This data indicate that bacterial nitrite reductase is an important contributor to the formation of NO in bean nodules in response to nitrate.

## INTRODUCCIÓN

El oxígeno es necesario como aceptor final de electrones durante el proceso de oxidación biológica, a través del cual las células obtienen la energía necesaria para sus funciones vitales. En la respiración aeróbica, el oxígeno se une a los electrones y a los protones producto de la cadena respiratoria formando agua. En este proceso de oxidación se utiliza la energía liberada para producir adenosina trifosfato (ATP). En ausencia de oxígeno, los óxidos de nitrógeno como el nitrato y el nitrito son los principales aceptores de electrones en la cadena respiratoria (Gennis y Stewart, 1996). La respiración de nitrato y/o nitrito se lleva a cabo por la acción de reductasas de óxidos de nitrógeno que participan en la ruta de desnitrificación. La desnitrificación, es una alternativa de respiración en condiciones anaeróbicas por medio de la cual, algunos hongos, proteobacterias y arqueas pueden utilizar el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y sus óxidos derivados, como aceptores de electrones en la cadena respiratoria para reducirlos a nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) y acoplar el proceso a la producción de ATP (Ferguson, 1994; Zumft, 1997; Shapleigh, 2006). La reducción del  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$  lleva consigo la formación de una serie de intermediarios que son: nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ); reacciones catalizadas por las enzimas nitrato reductasa (Nar o Nap), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos), respectivamente (O'Hara y Daniel, 1985; Delgado et. al., 1991, Philippot, 2002). Este proceso es además una estrategia importante en el proceso de destoxificación de óxidos de nitrógeno (Lucinsky, et. al., 2002; Kartal et. al., 2010).

La desnitrificación es un proceso de gran importancia en la rizosfera ya que es una forma alternativa de respiración en este ambiente donde las concentraciones de oxígeno son limitantes. Sin embargo, algunos intermediarios de dicho proceso, como el nitrito y el óxido nítrico, también son compuestos con un gran poder citotóxico ya que son moléculas altamente reactivas que pueden dañar macromoléculas importantes como las proteínas y el ADN. Durante la relación simbiótica que establecen los organismos fijadores de nitrógeno con las plantas leguminosas, puede generarse nitrito u óxido nítrico tanto por la planta como por el microsimbionte provocando que se dañen enzimas esenciales para el proceso de fijación de nitrógeno como son la nitrogenasa o la leghemoglobina (Zumft, 1997; Murphy, 1999; Sánchez et. al., 2010).



Las especies de la familia Rhizobiaceae son bacterias Gram negativas del suelo que poseen la capacidad de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con las raíces de las plantas leguminosas. Dentro de las Rhizobiaceas encontramos a los géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium* y *Agrobacterium*. En esta familia, solo se ha visto la capacidad de desnitrificar en *Bradyrhizobium japonicum* (Nellen - Anthamatten et. al., 1998).

Se ha reportado que los bacteroides con actividad de nitrito reductasa y óxido nítrico reductasa, son menos sensibles a la toxicidad por nitrito que aquellos sin la actividad de estas enzimas, ya que el nitrito y el óxido nítrico inhiben a la nitrogenasa (Casella et. al., 1986). Por lo tanto, la capacidad de remover nitrito y óxido nítrico vía desnitrificación pueden servir como mecanismo de destoxificación.

En el caso de *B. japonicum*, quien establece una simbiosis efectiva con la soya (*Glycine max*), la desnitrificación podría tener un papel dual. Por un lado, el proceso remueve los compuestos tóxicos como el nitrito y el óxido nítrico; y por el otro, abastece de ATP bajo condiciones de privación de oxígeno. Esto sugiere que la fijación de nitrógeno y la desnitrificación, dos procesos que son antagónicos en el ciclo del nitrógeno, pueden llevar a cabo funciones complementarias importantes en las células de los rhizobia simbióticos para sobrevivir dentro de los nódulos de las raíces (Luciński et. al., 2002).

En *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Paracoccus* y *Rhodobacter*, la regulación de los genes de desnitrificación es mediada por la concentración de oxígeno y nitrato y controlada por reguladores transcripcionales de la familia Crp/Fnr (Zumft, 2002; Shapleigh, 2006; Hartsock y Shapleigh, 2010). Estos reguladores reconocen secuencias promotoras consenso denominadas cajas de anaerobiosis (Kiley y Beinert, 1998; Green, et. al., 2001). En *B. japonicum* se ha descrito que la expresión de los genes *nirK*, *nosZ* y *norC* está controlada por microaerobiosis y nitrato, y que esta regulación está mediada por el sistema de regulación general de genes involucrados en el proceso de fijación de nitrógeno FixLJ/K<sub>2</sub>. (Mesa et. al., 2002). Recientemente, se ha reportado que en esta bacteria, se requiere la proteína NifA para obtener la máxima expresión de los genes de desnitrificación (Bueno et. al., 2010).

En las comunidades bacterianas del suelo, las bacterias están expuestas a los óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ) generados tanto de forma endógena como por los vecinos desnitrificantes. Así, muchas especies bacterianas han desarrollado no solo la capacidad de reconocer  $\text{NO}_x$  en su medio ambiente, sino que son capaces de responder a su presencia por medio de una serie de mecanismos de defensa diseñados para removerlos o para protegerse de sus efectos tóxicos, por lo que la presencia de genes de desnitrificación podría estar relacionada a estos procesos de destoxificación con una importante función de protección para las bacterias.

*R. etli* es una bacteria del suelo y como tal, está expuesta a diferentes concentraciones de óxidos de nitrógeno tanto en vida libre como en simbiosis. Por ejemplo, en etapas tempranas de la simbiosis donde pueden producirse  $\text{NO}_x$  como parte de la respuesta inmune de la planta o durante el inicio de la senescencia del nódulo donde se ha visto un aumento en la concentración de óxido nítrico (Watmough et. al., 1999).

## **CICLO DEL NITRÓGENO**

El nitrógeno es un elemento esencial para los seres vivos ya que forma parte de macromoléculas importantes para la vida como son los ácidos nucleicos y las proteínas. En la naturaleza, el nitrógeno puede encontrarse en varios estados de oxidación que van desde +5 en el compuesto más oxidado que es el nitrato hasta -3 en el compuesto más reducido que es el amonio; sin embargo, en los organismos vivos está presente principalmente como amonio, es decir, en su estado totalmente reducido (Cabello et. al., 2004). El ciclo del nitrógeno permite un intercambio constante entre el nitrógeno fijado y el nitrógeno atmosférico, este ciclo incluye reacciones tanto de reducción como de oxidación. El nitrógeno puede ser fijado o asimilado en forma de amonio en procesos de reducción, este amonio se oxida para producir energía y se reduce hasta nitrógeno molecular para ser devuelto a la atmósfera. Estas reacciones, llamadas de nitrificación y desnitrificación, las llevan a cabo tanto procariones como eucariotes. Por otro lado, algunas bacterias realizan de forma exclusiva una de las reacciones claves de este ciclo, la fijación del nitrógeno atmosférico.

La fijación de nitrógeno atmosférico y su asimilación produce amonio que posteriormente se convierte en aminoácidos y proteínas por medio de la vía metabólica de la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa. Durante el proceso conocido como nitrificación, el amonio se oxida para formar nitrato, este proceso tiene como intermediarios a la hidroxilamina y al nitrito. El nitrato formado en la nitrificación puede devolverse a la atmósfera por medio de la desnitrificación. La desnitrificación es un proceso que se lleva a cabo en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas, las reacciones intermedias de la vía de desnitrificación producen nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso (Berks et. al., 1995; Zumft, 1997; Shapleigh, 2006). Las reacciones del ciclo del nitrógeno se realizan por enzimas que catalizan procesos de óxido - reducción como son las nitrato, nitrito y óxido nítrico reductasas. En estos procesos, también están implicados acarreadores de compuestos nitrogenados que llevan hasta el sitio donde se requieren compuestos como el nitrato o el nitrito (Zumft, 1997; Watmough, 1999).

## DESNITRIFICACIÓN

La desnitrificación es un proceso de gran importancia en la naturaleza ya que es una forma alternativa de respiración en la que, en condiciones limitantes de oxígeno, los microorganismos reducen óxidos de nitrógeno como el nitrato o el nitrito hasta nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>). La reducción de estos óxidos de nitrógeno está acoplada a la producción de ATP lo que permite a la célula crecer en ausencia de oxígeno.

La capacidad de desnitrificar está muy extendida en los procariotes estando presente en bacterias que pertenecen taxonómicamente a varias subclases de Proteobacterias y Arqueo bacterias (Zumft 1997, Shapleigh, 2006). La reducción del nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a di nitrógeno (N<sub>2</sub>) lleva consigo la formación de una serie de intermediarios como son: nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O). Las enzimas que llevan a cabo estas reacciones son, en orden de reacción: La nitrato reductasa (Nar o Nap), la nitrito (Nir), la óxido nítrico reductasa (Nor) y la óxido nitroso reductasa (Nos).



Aunque la reducción del nitrato inicia la desnitrificación, se considera, que la reducción del  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}$  es la reacción clave que define la desnitrificación, ello se debe a que la reducción del nitrato también puede ocurrir en microorganismos no desnitrificantes; de hecho, *Escherichia coli*, una de las bacterias donde más se ha estudiado la respiración del nitrato, es incapaz de desnitrificar.

Se han descrito bacterias que contienen solo algunas de las enzimas de la vía de desnitrificación, es decir, no contienen, o no expresan, el equipo enzimático necesario para llevar a cabo la desnitrificación. El ejemplo más extendido es el de aquellas que carecen de óxido nítrico reductasa como *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aureofaciens* y diversas especies de la familia Rhizobiaceae. *Rhizobium hedysari* solo contiene a la nitrito reductasa (Toffanin et. al., 1996), *Wollinella succinogenes* posee óxido nítrico y óxido nítrico reductasas y *Campylobacter fetus* sólo contiene óxido nítrico reductasa (Zumft 1992; Becker et. al., 2004). A estos últimos microorganismos no se les considera verdaderos desnitrificantes, ya que son incapaces de crecer microaeróbicamente con nitrato o nitrito como única fuente de energía.

### ***Rhizobium etli* CFN42**

*R. etli* es un bacilo aeróbico Gram-negativo, capaz de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con las raíces del frijol (*Phaseolus vulgaris*). Esta bacteria mide de 0.5 a 1 micras de ancho y de 2 a 3 micras de largo; las colonias que forma en medio que contiene peptona y extracto de levadura (PY) son circulares, convexas y opacas; el tamaño de estas, es por lo general de 2 a 4 mm de diámetro cuando se cultivan de dos a tres días en este medio con agar. Las colonias formadas son translúcidas cuando la bacteria se cultiva en medio con manitol y extracto de levadura (YM), es incapaz de crecer en medio LB, en presencia de NaCl o en ausencia de calcio. Esta cepa es resistente al ácido nalidíxico a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La temperatura óptima de crecimiento es de 29 °C. Puede utilizar medio mínimo que contenga malato o succinato como fuente de carbono pero es incapaz de crecer en medio mínimo que contenga arginina, hipoxantina o sorbitol como única fuente de esqueletos carbonados (Segovia, et. al., 1993).

El genoma de *R. etli* está constituido por dos tipos de replicones: El cromosoma y plásmidos de alto peso molecular. El tamaño y el número de plásmidos en las especies de *Rhizobium* es muy variable, en el caso particular de *R. etli* CFN42, su genoma está constituido por 6,530,228 pares de bases distribuidos en un cromosoma y seis plásmidos de alto peso molecular (pRet42a a pRet42f). En los plásmidos de *R. etli* está contenida aproximadamente un tercio de la información genética de este organismo (Brom et. al., 1988, González et. al., 2006).

En las bacterias que fijan nitrógeno en simbiosis, los genes que participan en los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno (genes *nod*, *nif* y *fix*) están presentes en el cromosoma en islas simbióticas o en plásmidos. El plásmido que contiene la mayoría de estos genes se le denomina plásmido simbiótico o pSym. (Fischer, 1994; Lloret y Martínez-Romero, 2005).

En *R. etli* CFN42 como en otros *Rhizobium*, la mayoría de los genes *nod*, *nif* y *fix* están codificados en el pRet42d o pSym (Girard et. al., 1991, González et. al., 2006). En esta cepa, los plásmidos pRet42b y pRet42f son necesarios para realizar una simbiosis efectiva. Estudios fenotípicos de cepas derivadas de la CFN42 curadas de los diferentes plásmidos (Brom et. al., 1991; Brom et. al., 1992), muestran que el pRet42a es auto-transferible a alta frecuencia además de ser indispensable para la movilización del pRet42d. El pRet42b contiene secuencias requeridas para la biosíntesis de lipo polisacáridos y es esencial para el establecimiento de la simbiosis; mientras que el pRet42e contiene genes que se requieren para funciones celulares indispensables relacionadas con el metabolismo primario (Landeta, et. al., en prensa). El pRet42f es indispensable para el crecimiento de la cepa en medio mínimo conteniendo succinato y cloruro de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. Estudios realizados por el grupo del Dr. García de los Santos en el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, sugieren que en parte este fenotipo es debido a que los genes que codifican para las enzimas de la vía del pantotenato están codificados en este replicón. Adicionalmente, en este plásmido se encuentran genes importantes para la fijación de nitrógeno como *fixL* y *fixKf* (Girard et. al., 2000). Este plásmido contiene además genes importantes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo como es el caso de *katG* y *oxyR*, los cuales se expresan cuando la bacteria se encuentra en presencia de peróxidos u otros causantes de estrés oxidativo. Otras unidades transcripcionales codificadas en este

plásmido posiblemente involucradas en desnitrificación y/o destoxificación de especies reactivas de nitrógeno (ERN) como el óxido nítrico (NO) y el nitrito son: El gene *azuPf* que codifica para una pseudoazurina, y los genes *nirK* y *norCBQD* que codifican para las enzimas nitrito reductasa y óxido nítrico reductasa, respectivamente; así como el gen *nnrR* que codifica para un factor transcripcional tipo FNR encargado de regular genes de desnitrificación en otros organismos como *B. japonicum* (González et. al., 2006).

## **NITRATO REDUCTASAS**

En la naturaleza existen tres tipos de nitrato reductasas, dos de ellas están implicadas en procesos respiratorios y una se utiliza en la asimilación del nitrato. Las nitrato reductasas periplásmica (Nap) y membranal (Nar), se utilizan en respiración ya que pueden acoplar la reducción del nitrato en la cadena respiratoria durante la desnitrificación. Mientras que la nitrato reductasa citoplásmica (Nas) se utiliza en la asimilación del nitrato, la forma en que esta enzima contribuye con la asimilación del nitrato es reduciéndolo a nitrito para después reducir este último a amonio por medio de una nitrito reductasa, este amonio puede incorporarse a los aminoácidos por medio de la vía glutamina sintetasa/glutamato sintasa.

Las tres nitrato reductasas contienen molibdeno en su centro activo, pero difieren en el número y el tipo de cofactores que utilizan para transferir electrones a este sitio. *Paracoccus pantotropus* tiene los tres tipos de nitrato reductasas, la citoplásmica que es reprimible por amonio y que utiliza en la asimilación de nitrato; la periplásmica y la membranal que toman electrones de las quinonas y que utiliza en respiración (Sears, 1997). En los rizobiales, solo se ha caracterizado la nitrato reductasa respiratoria en *B. japonicum* (Mesa et. al., 2003; Robles et. al., 2006).

### ***Nitrato Reductasas Respiratorias***

Las nitrato reductasas respiratorias Nap y Nar están constituidas por dos y tres subunidades respectivamente. La enzima Nap se localiza en el periplasma mientras que la Nar está anclada a la membrana interna.

La nitrato reductasa membranal está constituida por tres subunidades codificadas por los genes *narG*, *narH* y *narI*, estos genes forman parte del operón *narGHJI*. En *E. coli* se ha visto que el gene *narJ* codifica para una chaperona necesaria para el ensamblado de la parte estructural de la nitrato reductasa (Philippot y Hojberg, 1999).

Los genes que codifican para la nitrato reductasa Nap, se encuentran arreglados en operón en todos los organismos que se han estudiado, aunque el orden de los genes puede variar, siempre están presentes los genes *napDABC*, la parte estructural de la enzima la constituyen las subunidades NapA y NapB. La subunidad catalítica es NapA y contiene el sitio de unión a molibdeno además de un grupo 4Fe4S. La subunidad NapB, transfiere electrones a la subunidad catalítica ya que contiene dos grupos hemo tipo *c*. El gen *napD* codifica para una chaperona requerida para ensamblar el complejo NapA-NapB. Para que la nitrato reductasa pueda reducir el nitrato a nitrito, existen dos proteínas accesorias que captan electrones de las quinonas y los transfieren a esta nitrato reductasa respiratoria. Estas proteínas son NapC, la cual está formada por cuatro grupos hemo tipo *c* y NapG que tiene cuatro grupos 4Fe4S. Cabe mencionar que la nitrato reductasa periplásmica prevalece entre especies de las  $\alpha$ -proteobacterias (Richardson et. al., 2007).

### ***Nitrato Reductasas Asimilatorias***

Las nitrato reductasas asimilatorias pueden dividirse en tres grupos, tipificados por las enzimas de *Synechococcus sp*, *Klebsiella oxytoca* y *Bacillus subtilis*

La nitrato reductasa asimilatoria de *Klebsiella oxytoca* está formada por dos subunidades, NasA y NaC: NasA contiene un grupo 4Fe4S en la región amino terminal, un grupo 2Fe2S en el carboxilo terminal y contiene molibdeno en su centro activo. NasC media la transferencia de electrones del NAD(P)H hacia la subunidad NasA (Wu y Stewart, 1998).

La nitrato reductasa de *Synechococcus sp*. es un monómero con un grupo 4Fe4S y un sitio de unión a molibdeno, esta proteína recibe electrones de las ferredoxinas para reducir el nitrato a nitrito (Rubio et. al., 1996).

La nitrato reductasa de *Bacillus subtilis* está constituida de dos subunidades, la parte catalítica de la nitrato reductasa que contiene molibdeno en su centro activo además de que puede ligar un grupo 4Fe4S y la subunidad de flavoproteína que cede electrones a la nitrato reductasa.

En *B. subtilis* se ha caracterizado la vía de asimilación de nitrato y se sabe de la participación de una nitrito reductasa que convierte el nitrito producido por la nitrato reductasa en amonio, esta nitrito reductasa está codificada por los genes *nasB* y *nasC* (Ogawa et. al., 1995; Moreno-Vivián y Flores, 2007).

Cuando los organismos se encuentran en un medio que contiene nitrato, este puede utilizarse de dos formas diferentes, como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria o puede asimilarse en forma de amonio. La respiración de nitrato se lleva a cabo en el periplasma o en la membrana celular y la asimilación se realiza en el citoplasma. Para que el proceso de asimilación y la respiración membranal se lleven a cabo, es necesario que el nitrato esté disponible en el sitio donde se va a metabolizar. Mientras que la nitrato reductasa periplásmica no necesita transportadores de  $\text{NO}_3^-$  por tener el reactivo disponible, la nitrato reductasa asimilatoria por estar en el citoplasma y la nitrato reductasa de membrana que tiene su sitio activo en el citoplasma, necesitan de acarreadores de  $\text{NO}_3^-$ . Esto se debe a que el nitrato al ser una molécula cargada, difunde muy lentamente a través de la membrana celular por lo que se requiere de transportadores de nitrato para atravesar dicha membrana.

## **NITRITO REDUCTASAS**

El nitrito que entra en contacto con las células, ya sea producto del medio ambiente o el producido por las nitrato reductasas; se reduce en amonio para su asimilación o en óxido nítrico para su respiración.

La reducción de nitrito mediante la transferencia de un electrón para formar óxido nítrico (NO) la cataliza la enzima nitrito reductasa. Existen dos tipos de nitrito reductasas respiratorias en la naturaleza. Las que contienen un tetrahemo  $cd_1$  en el centro activo de la enzima (tipo  $cd_1$ ), y aquellas en las que el cobre forma parte del centro activo (tipo Cu). Ambas enzimas parecen ser mutuamente excluyentes. Aunque



se ha demostrado su co-existencia a nivel de género, tal hecho no se ha encontrado a nivel de especie (Zumft, 1997, Shapleigh, 2006). Los dos tipos de enzimas no tienen entre sí ninguna relación estructural ni evolutiva. Casi las tres cuartas partes de las bacterias en las que se han estudiado estas proteínas, contienen nitrito reductasas tipo *cd*<sub>1</sub>. Sin embargo, se desconoce si la prevalencia de las bacterias con nitrito reductasas tipo *cd*<sub>1</sub> sobre las que contienen Cu es real, o se debe a un aislamiento preferencial de las que contienen enzimas tipo *cd*<sub>1</sub> (Zumft, 1997).

El gene *nirK* codifica para la nitrito reductasa tipo Cu. Esta enzima es un homotrímero que pesa 36 kDa. por subunidad. (Jetten et. al., 1997). La comparación de la secuencia del gene *nirK* de *A. cycloclastes* (Fenderson et. al., 1991), *A. faecalis* (Nishiyama et. al., 1993), *P. aureofaciens* (Glockner et. al., 1993), *R. hedysari* (Toffanin et. al., 1996) y *S. meliloti*, muestra una identidad que van del 61 al 81%. Generalmente, el locus *nirK* es monocistónico y en las proximidades no se han detectado otros genes relacionados con la desnitrificación (Zumft y Körner 1997; Zumft 1997, Shapleigh, 2006).

Las nitrito reductasas que contienen citocromos *cd*<sub>1</sub>, son monoméricas con un peso de 64 kDa, formadas por un hemo *c* y un hemo *d*<sub>1</sub> (Jetten et. al., 1997; Fulop et. al., 1995). En contraste con la sencilla organización de *nirK*, los genes que codifican las nitrito reductasas tipo *cd*<sub>1</sub> forman parte de operones en los que se encuentran genes que participan tanto en la síntesis como en el procesamiento de los grupos hemo que forman el centro activo de la enzima. En *P. stutzeri*, el operón *nir* incluye los genes *nirSTBMCFDLGH*, donde *nirS* es el gene estructural de la nitrito reductasa; *nirT* codifica para un citocromo tetrahemínico implicado en el transporte de electrones; *nirB* es responsable de la síntesis de un citocromo *b*<sub>552</sub> con actividad de peroxidasa; *nirM* codifica un citocromo *b*<sub>551</sub> que actúa como donador de electrones a la nitrito reductasa *cd*<sub>1</sub>. Los demás genes *nir* parecen estar involucrados en la síntesis del grupo hemo *d*<sub>1</sub>.

En *P. denitrificans* sólo se han descrito los genes *nirSECFD*, de los cuales *nirE* codifica una uroporfirinógeno III metiltransferasa, y el resto de los genes cumplen funciones similares a las descritas en *P. stutzeri*. En *P. aeruginosa* no se han localizado genes homólogos a *nirT* y *nirB*, aunque se identificaron otros dos genes, *nirJ* y *nirN*,

también necesarios para la síntesis de hemo  $D_1$ . En las tres bacterias mencionadas, otro gen, *nirQ*, se transcribe, en todos los casos, en dirección opuesta a los genes *nir*, y su producto es una proteína con secuencias homólogas a las de la familia NtrC de activadores de la transcripción. Aunque los miembros de la familia NtrC pertenecen en su mayoría a los sistemas reguladores de dos componentes, se desconoce el mecanismo por el que NirQ activa la transcripción del operón *nir* (Zumft, 1997; Schreiber et. al., 2007).

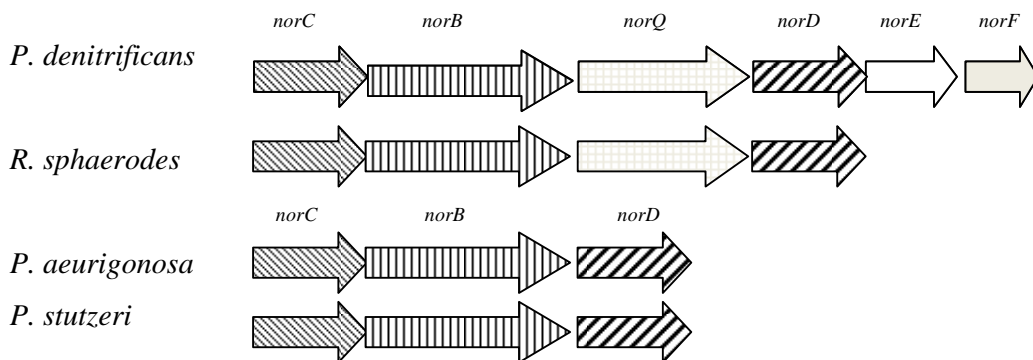
En algunos organismos como *E. coli* existen nitrito reductasas asimilatorias. Estas, tanto de bacterias como de arqueobacterias, contienen centros hierro azufre con los que llevan a cabo las reacciones de reducción de nitrito (Shapleigh, 2006). Entre las nitrito reductasas asimilatorias de hongos, de bacterias y de algas existen diferencias notables. Las nitrito reductasas de hongos y bacterias utilizan al NAD(P)H como donador de electrones mientras que las de algas utilizan a la ferredoxina como donador. En estos casos, se necesita importar nitrito hacia el citoplasma, esto se puede hacer por difusión o por transportadores de nitrato/nitrito como NarK. El gene *narK*, está bajo el control de reguladores tipo Crp/Fnr y por el sistema NarXL que regula la nitrato reductasa, aunque este transportador está ampliamente distribuido entre las bacterias, también está presente en algunas arqueobacterias (Goddard et. al., 2008).

## ÓXIDO NÍTRICO REDUCTASAS

Las óxido nítrico reductasas son proteínas de membrana de las cuales se conocen dos tipos: Las denominadas de tipo *c* y las de tipo *q*. Mientras que las primeras contienen un citocromo de tipo *c* como donador de electrones, las segundas carecen de dicho citocromo y reciben electrones de las quinonas. Ejemplos de óxido nítrico reductasas de tipo *c* son las de *P. stutzeri* (Zumft et. al., 1997), *P. denitrificans* (Carr y Ferguson, 1990) y *R. sphaeroides*. Estas enzimas están compuestas por dos subunidades hidrofóbicas de 17 y 53 kDa, denominadas NorC y NorB, respectivamente. Las óxido nítrico reductasas de tipo *q* se han estudiado en *Ralstonia eutropha*, que tiene dos copias de la enzima, NorB1 y NorB2, ambas activas y que se compensan fisiológicamente en su actividad enzimática (Cramm et. al., 1997). Estas proteínas son monoméricas y a diferencia del complejo NorCB, tiene una extensión en el extremo amino que incluye dos regiones transmembranales y un posible dominio periplásmico (Cramm et. al.,

1999). Se han identificado enzimas Nor de tipo *q* en firmicutes, cianobacterias y otras proteobacterias como *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (Hendriks et. al., 2000). El gen *norB* generalmente se encuentra formando parte de un operón con el gen *norA* y en la vecindad de este operón *norAB* se encuentra al gen *norR*. Se sabe que la proteína NorA puede unirse al óxido nítrico; sin embargo, hasta la fecha se desconoce la función de esta proteína (Cramm y Strube, 2008). El gen *norR* codifica para una proteína que pertenece a la familia NtrC de reguladores transcripcionales y está implicada en la regulación de los genes *norAB* (Pohlmann et. al., 2000).

La secuencia primaria de NorB es similar en un 18-25% a la subunidad I de la familia de oxidorreductasas terminales que contienen hemo y cobre en su centro activo (García-Horsman et. al., 1994; Van der Oost et. al., 1994). Los aminoácidos implicados en la unión al Cu en la oxidasa coinciden con los de NorB, por lo que se ha sugerido una posible relación filogenética entre los dos tipos de enzimas (Van der Oost et. al., 1994; Saraste y Castresana 1994; Zumft y Körner 1997; Hendriks et. al., 2000). La síntesis de las enzimas óxido nítrico reductasas de tipo *c* está codificada por los genes *nor* que se agrupan para formar operones (Figura 1). En *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*, el operón *nor* consiste en los genes *norCBD* (Arai et. al., 1995; Braun y Zumft, 1992), en *R. sphaeroides* por los *norCBQD* (Bartnikas et. al., 1997) y en *P. denitrificans* por los genes *norCBQDEF* (de Boer et. al., 1996).



**Figura 1.** Organización de genes *nor* que codifican la enzima óxido nítrico reductasa tipo *c*.

Las óxido nítrico reductasas bacterianas son proteínas integrales de membrana que catalizan la reducción de óxido nítrico a óxido nitroso (Flock, et. al., 2006):



Las bacterias pueden estar expuestas al NO producido endógenamente y al NO que se encuentran en el medio ambiente. Por ejemplo, los organismos que utilizan al nitrito como aceptor de electrones en condiciones anaeróbicas, requieren de una óxido nítrico reductasa para librarse de los efectos tóxicos del NO producido como resultado de la oxidación de nitrito; mientras que los organismos de vida libre están expuestos a NO en su hábitat. Ambos tipos de organismos, requieren de reductasas de óxidos de nitrógeno para responder a la presencia de estas moléculas en el medio ambiente (Spiro, 2006).

La primer óxido nítrico reductasa caracterizada fue la de *Pseudomonas Stutzeri*, (Hendriks et. al., 2000). Esta proteína utiliza citocromos para llevar a cabo la reducción del óxido nítrico. En la naturaleza se han caracterizado los dos tipos de óxido nítrico reductasas, las que tienen un citocromo *bc* y las que reciben electrones de las quinonas. Las primeras se han encontrado en bacterias desnitrificantes mientras que, las que reciben electrones de las quinonas se encuentran en patógenos no desnitrificantes (Hendriks et. al., 2000). En hongos desnitrificantes, la reducción de óxido nítrico a óxido nitroso la cataliza una proteína soluble que pertenece a la superfamilia de citocromos P-450 (llamada P450nor).

## **ÓXIDO NITROSO REDUCTASAS**

Las bacterias que poseen óxido nitroso reductasas, reducen el óxido nitroso a nitrógeno molecular regresándolo a la atmósfera y completando así las reacciones de la vía de desnitrificación. Esta enzima es un homodímero de 65 kDa por subunidad. Al igual que la óxido nítrico reductasa tiene una localización periplásmica, y de la misma forma que *nirK* contiene cobre en su sitio activo.

En *Paracoccus*, la óxido nitroso reductasa está codificada en el operón *nosRZDFYLX*. NosR es el regulador transcripcional del operón *nos* mientras que *nosZ* codifica para la subunidad catalítica de la enzima; el resto de los genes del operón *nos*, participan en el transporte y procesamiento de los átomos de cobre así como en el ensamblaje de la enzima Nos (Zumft y Korner., 1997).

## ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es un gas incoloro, soluble en lípidos, en solventes no polares y poco soluble en solventes polares, por lo que puede atravesar fácilmente las membranas celulares y difundir varios diámetros celulares desde el lugar de síntesis antes de que su tiempo de vida, de unos cuantos segundos, termine (Murphy, 1999).

En los últimos años, el estudio del óxido nítrico ha llamado la atención de los investigadores debido a su importancia en los sistemas biológicos. En algunos casos específicos, el NO es utilizado como molécula señal. Sin embargo, a concentraciones superiores a 1 mM puede resultar letal para las células ya que puede inhibir diferentes enzimas como la oxidasa respiratoria, la leghemoglobina en el caso de simbioses, o puede oxidar macromoléculas (Brunori, et. al., 2004; Sánchez et. al., 2010). Además, es una molécula muy reactiva que puede reaccionar con el ión superóxido y formar peroxinitrito que es mucho más tóxico que el propio óxido nítrico.

En las bacterias, el NO se produce por medio de reductasas u oxidasas como la nitrito reductasa mencionada anteriormente y en eucariontes se produce por medio de una óxido nítrico sintasa a partir del grupo guanidilo de la arginina y oxígeno. La concentración fisiológica del NO es del orden de nano molar, aunque puede llegar a ser micro molar en el sitio en el que se produce (Goretski et. al., 1990). Cuando se produce de forma regulada puede utilizarse como molécula señal para inhibir o activar enzimas como cinasas, caspasas, metaloproteínas, etc. (Nathan y Shiloh, 2000). Como mecanismo de defensa contra infecciones en plantas y animales (Cueto et. al., 1996; Zahrt y Deretic, 2002); y como intermediario metabólico en las vías de asimilación de amonio, nitrificación y desnitrificación; así como en procesos de respiración anaeróbica (Watmough et. al., 1999). Sin embargo, su producción no regulada puede causar muerte

celular por estrés oxidativo, ya que puede causar daños irreversibles a macromoléculas como las proteínas y el ADN (Murphy, 1999). Esta molécula puede interferir con la respiración ya que tiene una elevada afinidad por las proteínas que contienen metales de transición, en particular las que contienen grupos hemo, como es el caso de las citocromo *c* oxidasas (Brown y Croper, 1994). En presencia de oxígeno es capaz de formar especies moleculares muy reactivas como el peroxinitrito, molécula más oxidante que el NO, este y otros óxidos de nitrógeno, provocan daños irreversibles a las macromoléculas biológicas (Murphy, 1999).

En bacterias se han descubierto varios mecanismos para contener contra el NO, por ejemplo, en *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, su inactivación se lleva a cabo por flavo hemoglobinas y citocromos (Membrillo-Hernández et. al., 1996; Poole et. al., 1996; Frey et. al., 2002; Poock, et. al., 2002). En bacterias desnitrificantes, el óxido nítrico es reducido a óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) por la reductasa de óxido nítrico disminuyendo así su toxicidad. (Zumft 1997; Shapleigh, 2006).

## **ÓXIDO NÍTRICO EN PLANTAS**

En años recientes, la función del óxido nítrico en la interacción planta-bacteria ha llamado la atención de varios grupos de investigación debido a que ha resultado ser una molécula muy versátil en estos sistemas biológicos. Anteriormente sólo se veía al óxido nítrico como molécula oxidante; sin embargo, recientemente se ha visto que en los vegetales, participa en una gran variedad de procesos, como germinación, crecimiento de la raíz, cerrado de estomas y respuesta a estrés biótico y abiótico (Besson-Bard et. al., 2008; Cueto et. al., 1996; Sánchez et. al, 2010; Shimoda et. al., 2005).

El óxido nítrico en plantas, puede sintetizarse mediante una óxido nítrico sintasa (Baudouin et. al., 2006). También puede producirse NO a partir del nitrato mediante las nitrato reductasas (Meyer et. al., 2005). Se ha reportado la producción de óxido nítrico en los nódulos de las raíces de plantas leguminosas (Baudouin et. al., 2006; Cueto et. al., 1996; Sánchez et. al., 2010); pero aún no se ha demostrado con claridad el mecanismo por medio del cual se produce esta molécula en estas estructuras. Una teoría sugiere que el óxido nítrico en nódulos puede acumularse debido a la reducción

del nitrito mediante reductasas en condiciones desnitrificantes (Meakin et. al., 2007; Sánchez et. al., 2010). Si bien no sabemos que es lo que produce el aumento de NO en los nódulos, si sabemos los daños que puede causar esta molécula en estas estructuras especializadas; el NO libre puede unirse irreversiblemente a la leghemoglobina inactivándola y por ende reducir significativamente la fijación de nitrógeno, esto debido a que la unión del óxido nítrico no le permite a la proteína llevar a cabo su función principal que es la de proveer oxígeno a la nitrogenasa durante la fijación biológica del nitrógeno.

## **TRANSPORTADORES DE ÓXIDOS DE NITRÓGENO**

Existen dos tipos de transportadores de óxidos de nitrógeno en la naturaleza, transportadores tipo ABC que necesitan hidrolizar ATP para poder transportar estas moléculas y transportadores de la familia NarK que pertenecen a la superfamilia de facilitadores y que utilizan el flujo de protones en la membrana para acarrear nitrato y nitrito.

Las dos nitrato reductasas, la citoplásmica y la membranal producen nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) que puede quedarse en el citoplasma, difundir la membrana o pasar al espacio periplásmico en donde es reducido por la nitrito reductasa. En caso de que se quede en el citoplasma, puede ser acarreado hacia el periplasma por acarreadores de la familia NarK, de hecho, se ha visto que estos transportadores pueden actuar como anti portadores de nitrato/nitrito o como simportadores de nitrato acoplando el proceso al flujo de protones en la membrana. En *P. denitrificans* se sabe que estos acarreadores de nitrato se inhiben por la presencia de oxígeno (Kucera et. al., 1996). Además de NarK, existen otras proteínas que sirven como acarreadoras de nitrato, por ejemplo NarU de *E.coli* y NarT de *Staphylococcus carnosus* las cuales aumentan la capacidad de transportar nitrato al citoplasma (Clegg et. al., 2006; Fedtke et. al., 2002).

## **REGULACIÓN DE LOS GENES DE DESNITRIFICACIÓN**

En *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Paracoccus* y *Rhodobacter*, la regulación de los genes de desnitrificación está mediada por la concentración de oxígeno y la presencia de óxidos de nitrógeno como el nitrato, el nitrito o el óxido nítrico y es

controlada por reguladores transcripcionales de la familia Crp/Fnr (Zumft, 2002; Shapleigh, 2006). Estos reguladores reconocen secuencias promotoras consenso denominadas cajas de anaerobiosis. En *B. japonicum* se ha descrito que la expresión de los genes *nirK*, *nosZ* y *norC* depende de la concentración de oxígeno y la presencia de nitrato, bajo el control del sistema de regulación general de genes de la fijación de nitrógeno FixLJ/K<sub>2</sub>. (Mesa et. al., 2003; Robles et. al., 2006).

### ***Regulación por oxígeno***

El control primario de la expresión de los genes que participan en la desnitrificación lo ejerce la concentración de oxígeno. En condiciones aeróbicas la síntesis de las enzimas que participan en desnitrificación no se lleva a cabo. Un segundo control lo realizan los óxidos de nitrógeno; esta regulación asegura la expresión de los genes de desnitrificación cuando la bacteria está en contacto con óxidos de nitrógeno. De esta manera, las bacterias también logran mantener estos compuestos por debajo del umbral de citotoxicidad, ya que la acumulación de algunos intermediarios del proceso como el nitrito y el óxido nítrico puede causar muerte celular (De Boer et. al., 1994; Zumft, 1997). La regulación de los genes de desnitrificación, esta controlada por reguladores transcripcionales que pertenecen a la familia FNR. Como por ejemplo, los codificados por los genes: *nnr*, *dnr*, *fnrD*, *nosR*, *nirI* y *nirY*.

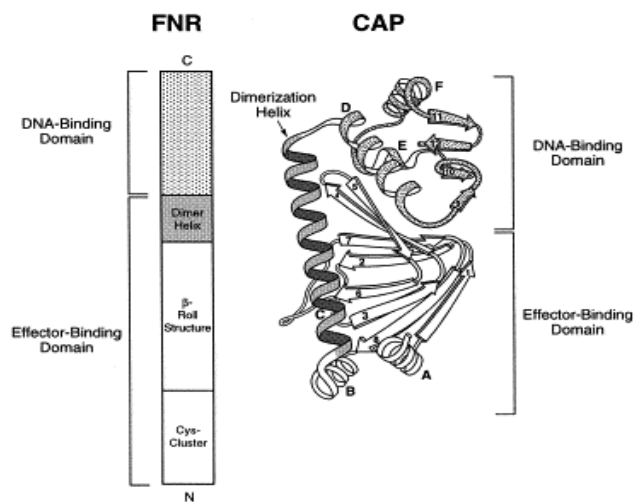
### ***Reguladores de la familia CRP/FNR***

La proteína FNR es un factor de transcripción global que controla la expresión de sus genes blanco en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno en *E. coli*. La existencia de FNR como regulador transcripcional se describió primero en este organismo en un intento por entender en una serie de cepas mutantes la incapacidad de usar nitrato, fumarato o nitrito para su crecimiento en condiciones anaeróbicas. El término “*fnr*” designa una deficiencia para la reducción anaeróbica del nitrato y del fumarato “*anaerobic fumarate and nitrate reduction*” (Spiro y Guest, 1990).

Estructuralmente FNR se relaciona con la proteína receptora de AMP-cíclico CRP (*cyclic-AMP receptor*), excepto por la presencia de una extensión en el extremo N-terminal que contiene tres de los cuatro residuos de cisteína (C20, C23, C29 y C122)



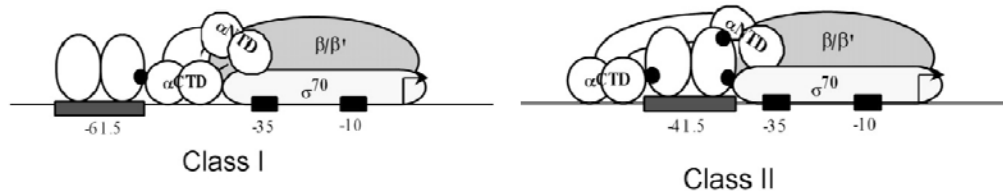
esenciales para su función (Figura 2). Estas cisteínas actúan como ligandos para un grupo [4Fe-4S] sensible al oxígeno. En condiciones anaeróbicas la adquisición del grupo hierro-azufre convierte al monómero de FNR en su forma dimérica que contiene dos grupos [4Fe-4S] (Kiley y Beinert, 1998). En el extremo C-terminal, FNR contiene un dominio regulatorio de unión a ADN de tipo hélice-vuelta-hélice (HTH) que reconoce la secuencia consenso 5'-TTGAT-N<sub>4</sub>-ATCAA-3' conocida como caja de anaerobiosis o caja FNR. La dimerización de la proteína es un factor clave en la regulación para la unión sitio-específica al ADN y la subsecuente activación de la transcripción (Spiro y Guest, 1990; Guest et. al. 1996).



**Figura 2.** Comparación de FNR con CRP. En el diagrama de CAP las letras y números representan las  $\alpha$  y  $\beta$  hélices respectivamente (Tomado de Kiley y Beinert, 1998).

El contacto entre FNR y la RNA polimerasa (RNAP) involucra dos regiones expuestas de la proteína designadas región activadora I (AR<sub>1</sub>), que contacta el dominio C-terminal de la subunidad  $\alpha$  de la RNAP ( $\alpha$  CTD) y la región activadora III (AR<sub>3</sub>), la cual contacta al factor  $\sigma^{70}$ . El contacto que se establece entre FNR y la RNAP depende de la arquitectura de cada promotor. Los promotores reconocidos por las proteínas FNR pueden ser de dos clases (Promotores clase I y promotores clase II). En los de clase I, la caja FNR se localiza cerca de la posición -61 con respecto al inicio de la transcripción, mientras que en los de clase II, la caja FNR se localiza aproximadamente a -41 nucleótidos con respecto al inicio de la transcripción. En los promotores clase I, el contacto se establece entre la región AR<sub>1</sub> de la subunidad río abajo del dímero de FNR

y  $\alpha$  CTD. Mientras que en los promotores clase II, es la subunidad  $\beta/\beta'$  arriba del dímero de FNR la que hace el contacto con  $\alpha$  CTD. En este caso FNR tiene una segunda interacción con la RNAP: AR<sub>3</sub> de la subunidad  $\beta$  abajo del dímero de FNR contacta una pequeña región de la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNAP como se muestra en la figura 3 (Wing et. al., 1995; Ralph et. al., 1998; Weber et al, 2005).



**Figura 3.** Modelo de promotores activados por FNR. (Tomado de Weber et. al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, en las bacterias fijadoras de nitrógeno, el oxígeno también puede activar la expresión de otros genes, por ejemplo en *B. japonicum*, la expresión de genes implicados en respiración por nitrato y desnitrificación se regulan por bajas tensiones de oxígeno. En general, los reguladores tipo FNR han sido reconocidos como elementos importantes en la vía de regulación de los genes de desnitrificación (Mesa et al., 2003; Zumft 2002). Los reguladores de la familia CRP/FNR regulan la expresión de los genes bacterianos en respuesta a un amplio rango de estímulos tanto intracelulares como exógenos: controlan factores de virulencia, enzimas de degradación de compuestos aromáticos, fijación de nitrógeno, fotosíntesis y varios tipos de respiración. Los miembros de la familia de activadores de la transcripción FNR/CRP pertenecen a distintas clases dependiendo de la homología entre sus secuencias de aminoácidos y sus diferencias funcionales. El análisis de los genomas secuenciados en la actualidad, ha traído como consecuencia un incremento considerable en el número de miembros de la familia Fnr; mientras que en 1994 Fischer propuso la existencia de tan solo 22 miembros de la familia. En la actualidad utilizando métodos bioinformáticos y criterios de selección conservativa se proponen alrededor de 300 candidatos. El análisis de los genomas bacterianos secuenciados revela que en el 80% de ellos se encuentran presentes miembros de la familia Crp/Fnr, frecuentemente se encuentran más de un miembro en un mismo huésped. Recientemente, estos

reguladores fueron agrupados de acuerdo a su afiliación filogenética en ArcR, CooA, CprK, Crp, Dnr, FixK, Flp, Fnr, FnrN, MalR, NnrR, NtcA, PrfA, YeiL y los grupos A,C y D de función reguladora desconocida (Körn et al., 2003).

En organismos de la familia de los *Rhizobiales* las proteínas tipo FNR identificadas se han agrupado en diferentes subfamilias: la subfamilia FixK, la subfamilia FnrN, la subfamilia NnrR y la subfamilia DNR (Körner et al., 2003). De estas, solamente FnrN conserva las cuatro cisteínas características de la familia FNR, indispensables para unir el grupo hierro-azufre lo que le permite responder al estado redox de la célula. Aunque no se sabe el mecanismo por medio del cual FixK, NnrR y Dnr responden a cambios medioambientales, si se sabe que son capaces de unirse a sus regiones diana y activar la transcripción de genes específicos (Körner et al., 2003; Mesa et al., 2003; Hartsock y Shapleigh, 2010).

Se ha demostrado que FnrN de *R. leguminosarum* bv. *viciae* es capaz de activar la transcripción de algunos blancos de FNR en el fondo genético heterólogo de *E. coli* en condiciones anaeróbicas (Schlüter et al., 1992). Esto sugiere que este tipo de proteínas son capaces de detectar los niveles de oxígeno, quizás mediante un mecanismo similar al de FNR. Por su parte, el análisis oligomérico de FixK<sub>2</sub> de *B. japonicum* analizado *in vitro*, muestra que esta proteína no posee centros de hierro-azufre y es capaz de activar la transcripción *in vitro* en presencia de oxígeno (Mesa et al., 2005). Las proteínas tipo NnrR, que controlan la transcripción de genes involucrados en la vía de desnitrificación, son capaces de detectar óxido nítrico, sin que se conozca el mecanismo de esta detección (Mesa et al., 2003; Hartsock y Shapleigh, 2010).

No obstante que la similitud a nivel de secuencia entre estas proteínas es baja, los miembros de las diferentes subfamilias son capaces de unir secuencias muy similares y conservan el motivo de unión a DNA de FNR.

### ***Regulación por óxido nítrico***

Los estudios realizados en cepas de *Paracoccus* y *Pseudomonas* sugieren que el NO es la molécula responsable de la inducción de la expresión de los genes de la desnitrificación (Palmedo et. al. 1995; de Boer et. al., 1996; Ye et. al., 1992). Dada la toxicidad del NO, las bacterias desnitrificantes deben mantener su concentración por

debajo de los niveles que pudieran ser letales para las células, para lo cual deben mantener un control estricto de la expresión de los genes *nir* y *nor*.

Genes homólogos a los *fnr*, tales como *nnr* de *P. denitrificans* (Van Spanning et al., 1995), *dnr* de *P. aeruginosa* (Arai et al., 1995), *nnrR* de *R. sphaeroides* (Tosques et al., 1996) y *dnrD* de *P. stutzeri* (Vollack y Zumft 2001), pertenecen a la familia de reguladores tipo FNR de la subclase denominada DNR (Vollack et al., 1999; Körner et al., 2003). Por este motivo, el gen *fnrD* de *P. stutzeri* se renombró como *dnrD*, y a los nuevos genes identificados en esta subclase se les ha llamado *dnrE* y *dnrS* (Vollack et al., 1999). Al igual que la subclase FixK, estas proteínas no están implicadas en el control por oxígeno, ya que carecen del motivo de cisteínas en el extremo amino terminal y de la cisteína del dominio central.

En *R. sphaeroides* 2.4.3., la proteína NnrR (*nitrite and nitric oxide reductase regulator*) regula la transcripción de los genes *nirK* y *norC* en respuesta a la presencia de óxido nítrico (Tosques et al., 1996; Tosques et al., 1997; Kwiatkowski y Shapleigh, 1996). En *P. denitrificans* la transcripción de los genes *nirI*, *nirS* y *norC* requiere, además de la ausencia de oxígeno, la presencia de óxido nítrico la expresión de estos genes está mediada por Nnr. (Van Spanning et al., 1999). En *P. Aeruginosa* y *P. stutzeri* la proteína Dnr regula la expresión conjunta de los genes *nir* y *nor* en respuesta a las concentraciones endógenas de NO (Arai et al., 1999; Vollack et al., 1999). Lo anterior indica que el NO es la molécula señal que induce la expresión de los genes *nirI*, *nirS* y *norC* (Van Spanning et al., 1999).

En *B. japonicum*, el gen *nnrR* codifica para una proteína con alta identidad a los reguladores transcripcionales de la familia CRP/FNR. La presencia de NnrR es indispensable para mantener la capacidad de la bacteria de crecer anaeróticamente con nitrato o nitrito y mantener las actividades de nitrato y nitrito reductasa, la inducción de la expresión de estos genes es mediada por el óxido nítrico. La activación anaeróbica de una fusión *nnrR* - *lacZ* en *B. japonicum* requiere del activador transcripcional FixK<sub>2</sub> (Mesa et al., 2003).

El mecanismo de regulación de estas proteínas aún no está bien estudiado. La ausencia de cisteínas en el extremo N-terminal de estas proteínas, sugiere que no

participan directamente en el control redox de la célula. Sin embargo, conservan en su región promotora una secuencia consenso de unión a ADN similar a la de las secuencias que reconocen las cajas de anaerobiosis de tipo Fnr, por lo que, podrían controlar a aquellos genes que presenten secuencias similares a las de las cajas de anaerobiosis en su región promotora.

El análisis de la secuencia de nucleótidos de las regiones regulatorias de los genes que participan en la desnitrificación ha mostrado la presencia de secuencias similares a las cajas Fnr que por lo general, se localizan entre las posiciones -40 a -60 en relación con los posibles sitios de inicio de la transcripción (Zumft, 1997). Así mismo, se ha establecido con claridad que el primer factor necesario para que se expresen los genes de la desnitrificación es la ausencia de oxígeno (Zumft 1997; Baker et. al. 1998; Watmough et. al. 1999; Hendriks et. al. 2000).

## **ANTECEDENTES**

En nuestro modelo de estudio, *R. etli* CFN42, bacteria fijadora de nitrógeno que establece simbiosis con las raíces de las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), río abajo de la región del plásmido pRet42f, donde se encuentran los genes *fixL* y *fixKf* (Girard et. al., 2000), se encuentra un grupo de ORF's homólogos a proteínas involucradas en procesos de desnitrificación que incluye a las enzimas nitrito reductasa y óxido nítrico reductasa, (Nir y Nor, respectivamente); así como el regulador transcripcional NnrR. El análisis de la secuencia completa indica que en esta bacteria no tiene los genes que codifican para la nitrato reductasa (*nar* o *nap*) ni para la óxido nitroso reductasa (*nos*).

En un trabajo en colaboración realizado en el laboratorio de la Dra. Delgado en la Estación Experimental del Zaidín en Granada, España, determinamos que *R. etli* CFN42 no tiene actividad de nitrato reductasa ni es capaz de utilizar el nitrato como donador de electrones en condiciones anaeróbicas, los resultados de dicho trabajo de investigación fueron reportados en el artículo "Function of the *Rhizobium etli* CFN42 *nirK* gene in nitrite metabolism", publicado en el 2005 en la revista *Biochemical Society Transactions*, del cual soy coautor.

# Function of the *Rhizobium etli* CFN42 *nirK* gene in nitrite metabolism

E. Bueno\*, N. Gómez-Hernández†, L. Girard†, E.J. Bedmar\* and M.J. Delgado\*<sup>1</sup>

\*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, P.O. Box 419, 18080 Granada, Spain, and †Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, P.O. Box 565-A, Cuernavaca, Morelos 62271, México

## Abstract

*Rhizobium etli* CFN42 is not capable of growing anaerobically with nitrate but it grows with nitrite as a terminal electron acceptor. This bacterium contains the *nirK* gene encoding the copper-containing Nir (nitrite reductase), which is located on the cryptic plasmid pCFN42f. Mutational analysis has demonstrated that a *nirK* deficient mutant was not capable of growing under nitrite-respiring conditions. Moreover, microaerobic growth of this mutant was inhibited by the presence of nitrite. Nir activity and nitrite uptake were highly diminished in a *nirK* mutant, compared with the wild-type levels after incubation under anaerobic conditions. Our results suggest that the copper-containing Nir may have both a respiratory and a nitrite-detoxifying role in *R. etli*.

## Introduction

Denitrification is an alternative form of respiration in which bacteria reduce sequentially nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) or nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) to nitric oxide (NO), nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ) and finally nitrogen gas ( $\text{N}_2$ ), when oxygen concentrations are limiting. Reduction of nitrogen oxides is coupled with energy conservation and permits cell growth under anaerobic conditions. Although nitrate reduction is the first step in denitrification, the reduction of  $\text{NO}_2^-$  to NO is the defining step of denitrification, as nitrate reduction also occurs in other processes such as ammonification and assimilatory nitrate reduction. Nir (nitrite reductase) is the enzyme responsible for this step, resulting in the production of NO. There are two types of respiratory Nirs, the Cu-containing Nir (NirK) and the cytochrome *cd<sub>1</sub>* Nir (NirS) [1]. *Rhizobium etli* forms  $\text{N}_2$ -fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. Studies of genome structure and sequence analysis in the strain *R. etli* CFN42 permitted the identification of the *nif* and *fix* genes on the symbiotic plasmid pCFN42d [2,3]. Reiterated copies of *fix* genes are also located on the previously considered cryptic plasmid pCFN42f [4]. Genes encoding proteins closely related to denitrification enzymes such as NirK and the respiratory nitric oxide reductase were identified in this replicon (N. Gómez-Hernández, M.J. Delgado, E.J. Bedmar and L. Girard, unpublished work). In the present study, we report on the role of the *R. etli nirK* gene in nitrite metabolism.

## Materials and methods

### Bacterial strains and growth conditions

*R. etli* CFN42 [5] and the *nirK* mutant derivative CFNX699 (N. Gómez-Hernández, M.J. Delgado, E.J. Bedmar and

L. Girard, unpublished work) have been used in this study. PY medium [6] was used for routine aerobic cultures of *R. etli*. Anaerobic cultures were kept at 28°C in YEM medium [7] supplemented with or without either 10 mM  $\text{KNO}_3$  or 1.5 mM  $\text{NaNO}_2$  in completely filled, rubber-stoppered serum bottles as described previously [8].

### Determination of Nar (nitrate reductase) and Nir activities

Cells of *R. etli* grown aerobically in 50 ml of PY medium were harvested by centrifugation (at 8000 *g* for 10 min at 4°C), washed twice with YEM medium, and resuspended in 125 ml of the same medium supplemented with or without 10 mM  $\text{KNO}_3$  or 1.5 mM  $\text{NaNO}_2$ . Cultures were incubated under anaerobic conditions for 96 h. After incubation, cells were washed with 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) until no nitrite was detected, and then resuspended in 1.3 ml of the same buffer. Nar activity was determined as described previously [8]. For determination of Nir activity, the reaction mixture contained 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5), 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$ , 800  $\mu\text{M}$  Methyl Viologen and 200  $\mu\text{l}$  of cell suspension (1–3 mg of protein). The reaction was started by the addition of 50  $\mu\text{l}$  of freshly prepared 30  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  sodium dithionite solution in 300 mM  $\text{NaHCO}_3$ . After incubation for 20 min at 30°C, the reaction was stopped by vigorous shaking until the samples had lost their blue colour. Nitrite was estimated after diazotation by adding the sulphanilamide-naphthylethylenediamine dihydrochloride reagent [9].

## Results and discussion

Growth of *R. etli* CFN42 was determined by measurement of the time-dependent increase in turbidity of anaerobic cultures (Figure 1a). Values of absorbance  $A_{600}$  for cells incubated in YEM medium supplemented or not with 10 mM  $\text{KNO}_3$  were similar (Figure 1a). Moreover, Nar activity was not detected in cells after 96 h incubation under anaerobic conditions with

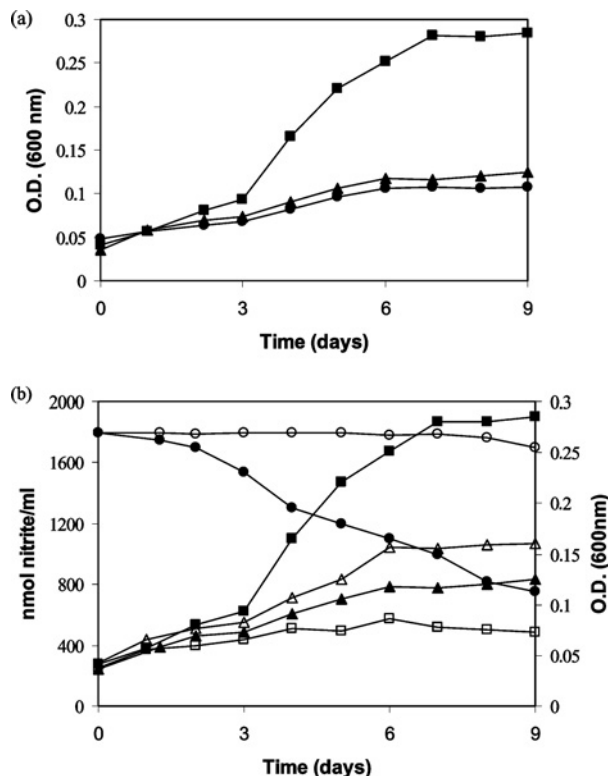
**Key words:** anaerobiosis, denitrification, detoxification, nitrite reduction, respiratory nitrite reductase, *Rhizobium etli*.

**Abbreviations used:** Nar, nitrate reductase; Nir, nitrite reductase.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed (email mdelgado@eez.csic.es).

**Figure 1 | Nitrate- and nitrite-dependent anaerobic growth of *R. etli* CFN42 (a), and growth and nitrite uptake by *R. etli* CFN42 and CFNX699 under anaerobic conditions (b)**

(a) Growth of *R. etli* CFN42 under anaerobic conditions in YEM (▲), YEM + 10 mM KNO<sub>3</sub> (●) and YEM + 1.5 mM NaNO<sub>2</sub> (■). (b) Growth of *R. etli* CFN42 (▲, ■) and *nirK* mutant strain CFNX699 (△, □) under anaerobic conditions in YEM (▲, △) and YEM + 1.5 mM NaNO<sub>2</sub> (■, □). The nitrite concentration in the growth medium of the wild-type (●) and *nirK* mutant (○) is shown.



nitrate (results not shown). However, when the cells were incubated in YEM medium with 1.5 mM NaNO<sub>2</sub>, an increase in absorbance was observed after incubation for 7 days (Figure 1a). These results suggest that *R. etli* is not able to grow under anaerobic conditions with nitrate as electron acceptor and that it lacks Nar activity. However, this bacterium is capable of growing anaerobically at the expense of nitrite. The poor growth observed, however, indicates the low efficiency of energy coupling using nitrite reduction (Figure 1a). Other rhizobia species such as *Bradyrhizobium japonicum* are capable of coupling energy conservation with either nitrate or nitrite reduction [8,10]. In contrast, *R. sultae* (formerly *R. bedysari*) is not capable of growing either with nitrate or nitrite as the final electron acceptor [11,12]. As far as we know, this is the first case described of a rhizobia species capable of growing with nitrite but not with nitrate as electron acceptor.

To determine the role of NirK in nitrite respiration, the *R. etli nirK* mutant CFNX699 was constructed by marker-exchange mutagenesis. In contrast with the wild-type strain, the mutant was not capable of growing anaerobically with nitrite as the final electron acceptor (Figure 1b). Under those

conditions, nitrite in the medium was consumed by the wild-type cells, but not by the mutant strain (Figure 1b). It is possible that the slight growth observed in each of the wild-type and the mutant strains when cultured in YEM medium without nitrite was due to microaerobic growth because of oxygen still present in the tube (Figure 1b). Under those conditions, the presence of nitrite in the medium inhibited the growth of the *nirK* mutant (Figure 1b). Taken together, these results indicate that, in addition to a respiratory function, the ability of NirK to remove nitrite is used as a detoxifying mechanism. Similarly, it has been reported that NirK from *Nitrosomonas europaea* confers tolerance to nitrite [13].

After 96 h incubation under anaerobic conditions, in a medium amended with or without nitrite, Nir activity of the *nirK* mutant [4.69 and 3 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> consumed · (mg of protein)<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> respectively] was significantly lowered compared with the wild-type levels [73.68 and 30.48 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> consumed · (mg of protein)<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> respectively]. Values of Nir activity in wild-type cells incubated in the presence of nitrite were 2.42-fold greater than in cells grown in the absence of nitrite. No activity was detected in aerobic cultures (results not shown). These results agree with those found in other denitrifiers [10,14] and suggest that both low-oxygen conditions and the presence of a nitrogen oxide are required for full expression of the *R. etli* NirK enzyme.

This work was supported by grants BMC2002-04126-C03-02 and FIT-050000-2001-30 from Dirección General de Investigación to E.J.B. The support of the Junta de Andalucía (PAI/CVI-275) is also acknowledged. We also thank PAPITT-UNAM (grant IN224002) for partial financial support and CSIC-UNAM for co-operation agreement.

## References

- Zumft, H.G. (1997) *Micobiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 533-616
- Girard, L., Flores, M., Brown, S., Romero, D., Palacios, R. and Dávila, G. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 2411-2419
- González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M.A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernández-González, I., Hernández-Celis, J.C., Quintero, V., Moreno-Hagelsieb, G., Girard, L. et al. (2003) *Genome Biol.* **4**, R36
- Girard, L., Brown, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M. and Romero, D. (2000) *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 1283-1292
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G. and Palacios, R. (1982) *Nature (London)* **299**, 724-726
- Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J. and Cevallos, M.A. (1984) *J. Bacteriol.* **158**, 148-155
- Vicent, J.M. (1970) in *The Biology of Nitrogen Fixation* (Quispel, A., ed.), pp. 265-341, Elsevier, New York
- Delgado, M.J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E.J. and Müller, P. (2003) *Microbiology* **149**, 3395-3403
- Nicholas, D.J.D. and Nason, A. (1957) *Methods Enzymol.* **3**, 981-984
- Velasco, L., Mesa, S., Delgado, M.J. and Bedmar, E.J. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1521**, 130-134
- Casella, S., Shapleigh, J.P. and Payne, W.J. (1986) *Arch. Microbiol.* **146**, 233-238
- Toffanin, A., Wu, Q., Maskus, M., Casella, S., Abruña, H.D. and Shapleigh, J.P. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4019-4025
- Beaumont, H.J.E., Hommes, N.G., Sayavedra-Soto, L.A., Arp, D.J., Arciero, D.M., Hooper, A.B., Westerhoff, H.V. and van Spanning, R.J.M. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 2557-2560
- Tosques, I.E., Kwiatkowski, A.V., Shi, J. and Shapleigh, J.P. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 1090-1095

Received 24 September 2004

En condiciones anaeróbicas la presencia de nitrito inhibe el crecimiento de una mutante *nirK* de *R. etli*. Por lo tanto, en estas condiciones, NirK le confiere a esta bacteria tolerancia al nitrito utilizando la capacidad que tiene NirK para remover esta molécula como un mecanismo de detoxificación.

La desnitrificación no es una vía común entre los organismos de la familia Rhizobiaceae y solo se ha demostrado la capacidad de desnitrificar en unos pocos organismos como en *B. japonicum*, el simbiote de la soya, en este organismo se ha demostrado que es capaz de reducir el nitrato a amonio o a nitrógeno molecular (Mesa et. al., 2003; Bedmar et. al., 2005); aún cuando existen Rhizobios que contienen los genes que codifican para cada una de las enzimas responsables de llevar a cabo dicho proceso, son incapaces de desnitrificar. Por ejemplo, en *S. melliloti* están codificados todos los genes necesarios para llevar a cabo una desnitrificación completa a partir del nitrato. Sin embargo, a este organismo no se le considera un verdadero desnitrificante ya que produce óxido nitroso y no nitrógeno como producto final de la reducción del nitrato o del nitrito (Becker et. al., 2004; Holloway et. al., 1996). Un caso extremo lo encontramos en *R. sultae* (formalmente *Rhizobium hedysari*) en cuyo genoma solo está codificada la nitrito reductasa tipo cobre (Toffanin et. al., 1996).

En *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Paracoccus* y *Rhodobacter*, la regulación de genes de desnitrificación es mediada por la concentración de oxígeno y nitrato y se controla por reguladores de tipo Crp/Fnr (Zumft, 2002). Estos reguladores, como ya se dijo anteriormente, reconocen secuencias promotoras consenso denominadas cajas de anaerobiosis localizadas entre 40 y 60 nucleótidos río arriba del inicio de la transcripción. En *B. japonicum* se ha descrito que la expresión de *nirK*, *nosZ* y *norC* se controla por microaerobiosis y nitrato, y que esta regulación responde al sistema de regulación general de genes involucrados en el proceso de fijación de nitrógeno FixLJ/K<sub>2</sub> (Mesa et. al., 2003). En *R. etli* CFN42, están codificados seis reguladores tipo FNR, cinco de ellos se encuentran en plásmidos y solo uno está localizado en el cromosoma (González et. al., 2006). De los cuales solamente dos contienen las cuatro cisteínas conservadas típicas de FNR, aunque con una disposición un tanto diferente. Uno de ellos está codificado en el plásmido simbiótico (FnrNd) y el otro en el cromosoma (FnrNChr) (López et. al., 2001).



En el pSym y en el plásmido pRet42f de la cepa se encuentran dos reguladores de la subclase DNR, llamados StoRd y StoRf respectivamente (Granados-Baeza et. al., 2007). En plásmido pRet42f junto a *fixL* y al operón *fixNOQP*, se encuentra un regulador de la clase FixK denominado *fixKf* (Girard et. al., 2000). En este mismo plásmido se encuentra el gen *nnrR* que codifica para el regulador de genes de desnitrificación NnrR.

Dado que los factores transcripcionales tipo FNR tienen un alto porcentaje de similitud estructural, es factible pensar que cada uno de ellos sea capaz de unirse a una secuencia blanco como lo es la reportada para *E. coli* (TTG-N<sub>8</sub>-CAA). Sin embargo, se ha visto que factores transcripcionales homólogos son capaces de regular diferencialmente a un gen blanco. Ejemplo de ello lo tenemos en la regulación de *fixKf* de *R. etli* por los factores transcripcionales StoRd y StoRf (Granados-Baeza et. al., 2007). El análisis de la secuencia de la región promotora de los genes de desnitrificación codificados en *R. etli*, mostró la presencia de al menos una caja de anaerobiosis, lo que sugiere la participación de un factor transcripcional tipo FNR el control de su expresión. Dado el alto número de factores transcripcionales del tipo FNR presentes en *R. etli*, es interesante conocer si todos ellos participan en la regulación de los genes de desnitrificación identificados en esta bacteria.

Durante la desnitrificación, se producen intermediarios como el nitrito y el óxido nítrico, en años recientes ha aumentado el interés por conocer cual es papel que juegan estos óxidos de nitrógeno en vida libre y en la interacción planta-bacteria. Al óxido nítrico se le ha considerado tradicionalmente como una molécula tóxica; sin embargo, resultados recientes muestran que esta molécula es utilizada por la planta en la regulación de procesos celulares. Por ejemplo, se ha detectado la producción de NO durante la nodulación mediada por auxinas en *Medicago truncata* (Pii et. al. 2007), de igual forma, se ha observado una clara contribución del óxido nítrico en el metabolismo del nódulo (Ferrarini et. al., 2008). En soya, se ha visto la acumulación de NO en el nódulo y un aumento en la formación de complejos NO-Leghemoglobina en respuesta al encharcamiento (Meakin et. al., 2007; Sánchez et. al., 2010) En la simbiosis *Medicago-Sinorhizobium*, se ha demostrado que tanto la planta como la bacteria contribuyen a la formación y acumulación del óxido nítrico en el nódulo (Horchani et.

al., 2010). La síntesis regulada de óxido nítrico en simbiosis puede regular una gran variedad de procesos celulares, sin embargo, su producción des-regulada ocasiona daños a enzimas esenciales para la fijación de nitrógeno como la nitrogenasa o la leghemoglobina.

## **OBJETIVO**

En este proyecto centramos nuestro interés en conocer como responde *R. etli* a la presencia de ERN como el óxido nítrico. Analizamos la participación de varias proteínas reguladoras en el control de la expresión de los *nirK* y *norC* de *R. etli*; así como la participación de las reductasas codificadas por estos genes como un posible sistema de detoxificación de niveles tóxicos de NO tanto en condiciones de vida libre como en simbiosis con plantas de frijol. Para ello, nos planteamos el siguiente objetivo general:

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar genética y funcionalmente los genes *nirK* y *norC* de *R. etli*, en respuesta a la presencia de ERN; así como identificar a las proteínas reguladoras que controlan su expresión.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

A) Determinar la participación de la nitrito reductasa y la óxido nítrico reductasa de *R. etli* en la remoción de nitrato, nitrito y óxido nítrico tanto en condiciones de vida libre como durante la simbiosis con plantas de frijol.

B) Análisis de la regulación de la expresión genética de los genes *nirK* y *norC* en respuesta a diferentes condiciones ambientales.

C) Evaluar la participación de distintos reguladores transcripcionales en la regulación de la expresión de los genes *nirK* y *norC* de *R. etli*.

## **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis se reportan en el artículo titulado “Regulation and Symbiotic Role of *nirK* and *norC* Expression in *Rhizobium etli*”, publicado recientemente en la revista *Molecular Plant-Microbe Interactions*, del cual soy el primer autor.

# Regulation and Symbiotic Role of *nirK* and *norC* Expression in *Rhizobium etli*

Nicolás Gómez-Hernández,<sup>1</sup> Alma Reyes-González,<sup>1</sup> Cristina Sánchez,<sup>2</sup> Yolanda Mora,<sup>1</sup> María J. Delgado,<sup>2</sup> and Lourdes Girard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Genómica Funcional de Procariotes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, 62271, México; <sup>2</sup>Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Ap. Postal 419, 18080 Granada, Spain

Submitted 29 July 2010. Accepted 20 October 2010.

***Rhizobium etli* CFN42 is unable to use nitrate for respiration and lacks nitrate reductase activity as well as the *nap* or *nar* genes encoding respiratory nitrate reductase. However, genes encoding proteins closely related to denitrification enzymes, the *norCBQD* gene cluster and a novel *nirKnirVnnrRnnrU* operon are located on pCFN42f. In this study, we carried out a genetic and functional characterization of the reductases encoded by the *R. etli nirK* and *norCB* genes. By gene fusion expression analysis in free-living conditions, we determined that *R. etli* regulates its response to nitric oxide through NnrR via the microaerobic expression mediated by FixKf. Interestingly, expression of the *norC* and *nirK* genes displays a different level of dependence for NnrR. A null mutation in *nnrR* causes a drastic drop in the expression of *norC*, while *nirK* still exhibits significant expression. A thorough analysis of the *nirK* regulatory region revealed that this gene is under both positive and negative regulation. Functional analysis carried out in this work demonstrated that reduction of nitrite and nitric oxide in *R. etli* requires the reductase activities encoded by the *norCBQD* and *nirK* genes. Levels of nitrosylhemoglobin complexes in bean plants exposed to nitrate are increased in a *norC* mutant but decreased in a *nirK* mutant. The nitrate-induced decline in nitrogenase-specific activity observed in both the wild type and the *norC* mutant was not detected in the *nirK* mutant. This data indicate that bacterial nitrite reductase is an important contributor to the formation of NO in bean nodules in response to nitrate.**

The nitrogen cycle includes a series of both reductive and oxidative reactions in which prokaryotes have an important role. Dinitrogen (N<sub>2</sub>) is incorporated into the biosphere by biological or chemical fixation to generate ammonium and returns to the atmosphere by denitrification. The biological denitrification process consists of a sequential reduction of nitrate or nitrite to nitrogen gas when oxygen concentrations are limited. Reduction of nitrogen oxides is coupled with energy conservation and permits cell growth under anaerobic conditions. The denitrification process depends on four nitrogen oxide reductases: respiratory or periplasmic nitrate reductase, nitrite reductase, nitric oxide reductase, and nitrous oxide reductase, encoded by *narGHJ* (or *napEDABC*), *nirK* (or *nirS*), *norCBQD*, and *nosRZDYFLX* genes, respectively (van Spanning et al. 2005, 2007; Zumft and Körner 1997).

In general, expression of denitrification genes requires a low oxygen concentration, the presence of a nitrogen oxide, and control by transcriptional regulators belonging to the CRP/FNR family (Baek and Shapleigh 2005; Bedmar et al. 2005; Hendriks et al. 2000; Mesa et al. 2003; Tosques et al. 1997; Wang et al. 1999; Zumft and Körner 1997; Zumft 2002). FNR is a protein that contains an O<sub>2</sub>-sensitive [4Fe-4S]<sup>2+</sup> cluster that directly senses oxygen. In *Escherichia coli*, it functions as a global regulator controlling the expression of up to 100 genes in response to oxygen limitation, and its active DNA-binding form is a homodimer containing two [4Fe-4S]<sup>2+</sup> clusters (Kang et al. 2005; Kiley and Beinert 2003). The protein binds through a helix-turn-helix motif to the promoter region of target genes, repressing the expression of genes for aerobic respiration and inducing genes involved in alternative forms of anaerobic respiration.

The consensus DNA binding site for *E. coli* FNR is a symmetrical motif (TTGAT-N4-ATCAA) called the FNR box or anaerobox (Kiley and Beinert 1999, 2003; Körner et al. 2003). FNR homologs have been identified in a wide number of bacteria. Some of these proteins conserve an N-terminal cysteine-rich motif, which binds the Fe-S cluster, while others, like the members of the FixK group, lack it. Based on genome analysis, the number of members of the CRP/FNR family now includes 369 members distributed in 14 phylogenetic branches (Körner et al. 2003). The FnrN group of regulators includes putative proteins with a slight modification of the conserved cysteine motif of FNR, allowing the assembly of a [4Fe-4S]<sup>2+</sup> cluster and thus redox sensing. On the other hand, regulators belonging to the FixK branch are structurally homologous to FnrN but lack the N-terminal cysteine-rich motif. A characteristic frequently found in sequenced bacterial genomes is the existence of multiple members of the CRP/FNR regulators in the same host (Körner et al. 2003).

The reduction of nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) to nitric oxide (NO), the central reaction in denitrification, is catalyzed by nitrite reductase. There are two types of nitrite reductases with different prosthetic groups. The Cu-containing nitrite reductase (CuNir, encoded by *nirK*) uses copper as a redox active metal, and is a trimeric protein containing two types of copper centers. The other, a dimeric *cd*<sub>1</sub>-type nitrite reductase (cytochrome *cd*<sub>1</sub>), utilizes heme-bound iron and is encoded by the *nirS* gene. Phylogenetic distribution of NirK and NirS reductases appears to be random; however, even when both types of enzymes can be found in a single genus, they cannot coexist in a single bacteria (Shapleigh 2006; Zumft and Körner 1997).

Due to its toxicity, NO has to be reduced to nitrous oxide immediately. A membrane protein complex formed by two sub-

Corresponding author: L. Girard; Telephone: +(52) 777 3291896; Fax: +(52) 777 3175581; E-mail: girard@ccg.unam.mx

units encoded by the *norC* and *norB* genes catalyzes the reduction of two molecules of NO to nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) and water (cNOR). NorC is a *c*-type cytochrome, while NorB contains two *b*-type hemes. In general, *norCB* genes are clustered with the *norQ* and *norD* genes. Therefore, to remove the NO, reactions for reduction of nitrite and nitric oxide must be regulated in a concerted way (Hendriks et al. 2000; Philippot 2002; Zumft 2005). In addition to cNOR, another two different bacterial NOR have been characterized (qNOR and qCu<sub>A</sub>NOR) (de Vries et al. 2007; Zumft 2005).

In plants, NO has been proposed as a signaling molecule involved in diverse physiological processes, such as defense response, growth, and development (Besson-Bard et al. 2008). Nitric oxide in plants can be produced from nitrite via nonenzymatic or enzymatic pathways. Several enzymatic pathways have been proposed for the generation of NO in plants. One is a nitrate-dependent pathway that is catalyzed mainly by nitrate reductase. Additionally, two other enzymatic pathways that use L-Arg or polyamines as substrates have been reported. The corresponding enzymes in the last two pathways remain as yet unidentified, and the hypothesis that plants do possess a nitric oxide synthase (NOS)-like enzyme is highly controversial (Besson-Bard et al. 2008). The sources of NO in nodules are not clear; nodular NO may be a product of bacterial denitrifying metabolism (Meakin et al. 2007; Sánchez et al. 2010) or may also be produced in plant root tissue from arginine via an unidentified NOS-like enzyme (Baudouin et al. 2006). In symbiosis, NO is produced in early stages of the process and in the mature nodule. For example, in *Lotus japonicus*, a rapid and transient NO production is observed when roots are inoculated with *Mesorhizobium loti* (Shimoda et al. 2005). In *Medicago* spp., NO is involved in nodule formation and functioning (Ferrarini et al. 2008; Pii et al. 2007). In addition, modulation of NO levels are involved in the establishment of the symbiosis (Nagata et al. 2008). NO also interfere with nitrogen fixation in soybean (Trinchant and Rigaud 1982), *Alnus firma* (Sasakura et al. 2006), and *Lotus japonicus* nodules (Kato et al. 2010; Shimoda et al. 2009). NO affect nitrogenase activity or can bind to leghemoglobin to form nitrosylleghemoglobin (Lb-NO) complexes in soybean nodules (Mathieu et al. 1998; Meakin et al. 2007; Sánchez et al. 2010).

Denitrification capability is widespread in prokaryotes, including nitrogen-fixing bacteria. Among rhizobia, only *Bradyrhizobium japonicum*, the microsymbiont of soybean, has been shown to reduce NO<sub>3</sub><sup>-</sup> simultaneously to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and N<sub>2</sub> when cultured microaerobically with nitrate as terminal electron acceptor and sole source of nitrogen. Denitrification in *B. japonicum* depends on the consecutive action of the *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD*, and the *nosRZDYFLX* genes (Bedmar et al. 2005). Other rhizobia, like *Sinorhizobium meliloti*, are only partial denitrifiers that produce N<sub>2</sub>O as an end product, even when they contain the complete set of genes for microaerobic nitrate reduction (Becker et al. 2004; Holloway et al. 1996). The extreme situation is represented by *Rhizobium sullae* (formerly *Rhizobium hedysari*), which contains only the Cu-containing nitrite reductase (Toffanin et al. 1996).

*Rhizobium etli* CFN42 fixes nitrogen in association with bean plants, and its genome contains a chromosome and six large plasmids (pCFN42a to pCFN42f) whose sizes range from 184.4 to 642.5 kb (González et al. 2006). In *R. etli* CFN42, some important regulatory elements present on the pSym in other *Rhizobium* species are not encoded on this replicon. A *fix* region containing copies of the *fixK*, *fixNOQP*, *fixGHIS-stoR* genes and the *fixL* gene, which controls the expression of *fixKf*, is located on pCFN42f (Girard et al. 2000; Granados-Baeza et al. 2007). Downstream of the pCFN42f *fix* region, there is a gene cluster related with the denitrification

process that includes genes encoding for the Cu-containing nitrite reductase (*nirK*), a cytochrome-*c* type nitric oxide reductase (*norCBQD*), and a pseudoazurin (*azuPf*) (Girard et al. 2000; González et al. 2006). An additional gene, *nnrR*, is also present in the *nirK-norC* region in *R. etli*. In *B. japonicum* NnrR was described as a transcriptional regulator for *nirK* and *norC* genes in the presence of N oxides (Mesa et al. 2003).

Previously, we reported that *R. etli* shows nitrite reductase activity after incubation of the cells under anaerobic conditions. In this condition, a *R. etli nirK* mutant exhibits a poor nitrite reductase activity and nitrite uptake. In addition, *R. etli* is not able to use nitrate for respiration and does not present nitrate reductase activity. These results indicate that *R. etli* CFN42 is a nondenitrifying bacteria (Bueno et al. 2005). Therefore, the presence of NirK and NorC coding regions in an otherwise nondenitrifying bacterium can be explained by proposing that these enzymes have an N oxide-detoxifying role in *R. etli*, thus preventing accumulation of NO inside the cell. To gain insight into how *R. etli* responds to reactive nitrogen species, we carried out a genetic and functional characterization of the reductases encoded by *R. etli nirK* and *norC* genes. Also, we analyzed the participation of different regulatory proteins in the control of the expression of these genes. Nitrogenase-specific activity and the proportion of Lb-NO complexes formed in bean nodules demonstrate that *norC* has an important role in the microsymbiont in protection from NO and indicates that bacterial nitrite reductase is an important contributor to the formation of NO in nodules in response to nitrate.

## RESULTS

### Structural organization of *R. etli nirK* and *norC* region.

In *R. etli* CFN42, genes encoding denitrification enzymes were identified on plasmid pCFN42f. Genes located in this region include those encoding proteins with significant similarity to Cu-containing nitrite reductase (*nirK*), cytochrome-*c* type nitric oxide reductase (*norCBQD*), and pseudoazurin (*azuPf*). Neither genes encoding for a respiratory nitrate reductase (*nap* or *nar* genes) nor for the respiratory nitrous oxide reductase (*nos* genes) were found in the *R. etli* genome. Similar to denitrifiers, the *R. etli nor* gene cluster consists of *norCBQD*. An additional gene, annotated as *norE*, that codifies for an accessory protein of the nitric oxide reductase in *S. meliloti* (SMA1279) was found upstream of the *norC* operon. The *R. etli nirK* gene is transcribed in the opposite direction of open reading frame (ORF) RHE\_PF00524, which encoded for a hypothetical protein similar to NnrS from *Rhizobium* sp. strain NGR234 (NGR\_c09940) (Fig. 1).

In general, the *nirK* gene is clustered with *nirV*, an ORF that encodes for a putative periplasmic nitrite reductase. In *R. etli* CFN42, the structural arrangement of the *nirK-nirV* region suggests that these genes are part of the same operon. The predicted translational start of the *nirV* coding region is located 82 bp downstream of the *nirK* stop codon. Two additional ORF are located in the proximity of *nirK* and *nirV* in *R. etli*, *nnrR*, which encodes NnrR, the FNR-type transcriptional regulator of denitrification genes, and RHE\_PF00528, similar to denitrification regulator protein NnrU. The translational start of *nnrR* is located just 38 bp downstream of the *nirV* coding region, while the intergenic region between *nnrR* and *nnrU* coding regions comprises only 13 bp (González et al. 2006; Kazusa DNA Research Institute Rhizobase).

To determine if *nirK*, *nirV*, *nnrR*, and *nnrU* are arranged as an operon, we evaluated microaerobic expression of these genes by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). An insertional mutation within the *nirK* coding region

abolished the expression of *nnrR*, indicating that a mutation in this gene exerts a polar effect on the expression of *nnrR* (data not shown). In addition, the synthesis of different cDNA products corresponding to *nirK-nirV*, *nirV-nnrR*, or *nirV-nnrU* in the wild-type strain demonstrates that, in *R. etli*, *nirK*, *nirV*, *nnrR*, and *nnrU* constitute an operon.

To predict the location of the promoter for the *R. etli* *norC* and *nirK* operons, the transcriptional start sites of each transcriptional unit were identified in assays using the rapid amplification of cDNA 5' ends (RACE). Total RNA was purified from wild-type cells cultured under microaerobic conditions. Our results show that the *R. etli* *norC* transcriptional start site is a G located 60 nucleotides upstream of the putative translational start codon. Analysis of the DNA region upstream of the *norC* gene revealed the presence of a purine-rich Shine-Dalgarno-like sequence (AAGGGA) six bases in front of the *norC* ATG codon. We also identified a sequence similar to the consensus for the FNR-DNA binding site (5'-TTGCG-N4-AACAA-3') (Fig. 2A) centered at position -43.5 bp from the *norC* transcriptional start site.

For *R. etli* *nirK*, the transcriptional start site was defined as an A located 43 bp upstream of the putative translation start. Similar to *norC*, a possible Shine-Dalgarno sequence (AGGA GA) was located six bases upstream from the putative translation start of *nirK*. Three sequences with high similarity to FNR-binding sites (TTGCG-N4-GTCAA, TTGTG-N4-CACAA, and TTGAG-N4-CGCAA) were identified in the *nnrS-nirK* intergenic region. They were named according to their relative distance from the *nirK* transcription start site as anaerobox 1, 2, or 3 (ANB1, ANB2, or ANB3, respectively). The ANB1 located is at -42.5, ANB2 at -65.5 and ANB3 at -96.5 bp (Fig. 2B). Interestingly, overlapping with the ANB2 there is a sequence similar to the NifA-binding site (5'-TGT-N10-ACA) (upstream activator sequence) without any putative -12/-24 type promoter in the region.

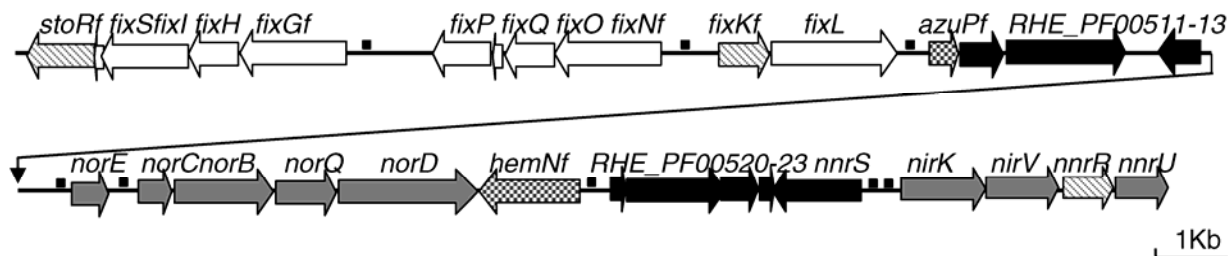
### Oxygen as a major signal for *R. etli* *nirK* and *norC* gene expression.

In *B. japonicum*, the expression of *nir* and *nor* genes in response to low oxygen concentration and NO (or a chemically

related species) is under the control of FixK and NnrR, respectively, which are two regulatory proteins belonging to the CRP/FNR family (Mesa et al. 2003). Presence of putative class II promoters in the *R. etli* *norC* and *nirK* regulatory regions suggests that microaerobic conditions are a prerequisite for their expression.

To evaluate the oxygen concentration response of these genes in *R. etli*, the regulatory regions of *norC* and *nirK* were fused to the promoterless *uidA* reporter gene in plasmid pBBMCS53 (Girard et al. 2000). A 401-bp PCR product that contains the *norC* upstream region was cloned to construct plasmid pNIC-01 (*norC::uidA*) (Fig. 2A). A 696-bp PCR product containing the *nnr-nirK* complete intergenic region, including all anaeroboxes, was cloned in both directions, generating plasmids pNIC-02 (*nnrS::uidA*) and plasmid pNIC-03 (*nirK::uidA*) (Fig. 2B). These plasmids were introduced separately into the *R. etli* wild-type strain. As shown in Table 1, only marginal expression of the *norC* and *nirK* genes was observed under aerobic conditions. A low-oxygen concentration (1%) induced *norC* expression nearly 50-fold and *nirK* expression 10-fold. Addition of 100  $\mu$ M sodium nitroprussiate (SNP, a NO-generating agent) or 1.0 mM nitrite to microaerobic cultures increased *norC* and *nirK* microaerobic expression about twofold. In contrast, expression of *nnrS* was not detected in aerobic and low-oxygen concentration conditions even in the presence of an N oxide.

To study the participation of FixKf and NnrR as regulators of the expression of the *R. etli* *norC* and *nirK* genes, expression patterns of plasmids pNIC-01 and pNIC-03 in the wild-type and in the *fixKf:: $\Omega$ Km* (CFNX637) and *nnrR::loxSp* (CFNX700) mutant backgrounds were analyzed. The microaerobic expression of *norC* and *nirK* is fully dependent on a functional FixKf protein (Fig. 3); in contrast, a differential dependence on NnrR for expression of these genes was observed. While expression of *norC* is almost abated in an *nnrR* mutant background (Fig. 3A), the *nirK* promoter shows only a marginal dependence of NnrR for expression in low-oxygen levels (Fig. 3B). These results indicate that, in addition to FixKf, the presence of NnrR is indispensable for *norC* expression. A full expression of *nirK* was observed in microaerobic cultures in



**Fig. 1.** Genomic context of the denitrification genes in *Rhizobium etli* CFN42. The region shown is located from bases 563,249 to 594,052 in plasmid f. Functional categories are indicated according to the annotation in databases: nitrogen fixation (white arrows), denitrification (gray arrows), FNR-type regulators (striped arrows), electron transfer (dotted arrows), hypothetical proteins (black arrows), and putative FNR-binding sites (black squares).

**Table 1.** Expression of *norC::uidA* and *nirK::uidA* gene fusions in *Rhizobium etli* wild type under free-living conditions

Strain	Fusion genotype	$\beta$ -glucuronidase specific activity ( $\pm$ SD) <sup>a</sup>		
		Aerobic	1% O <sub>2</sub>	1% O <sub>2</sub> + N oxide
CE3/pNIC-01	<i>norC::uidA</i>	8.4 $\pm$ 0.51	410 $\pm$ 45	741 $\pm$ 49 <sup>b</sup>
CE3/pNIC-02	<i>nnrS::uidA</i>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
CE3/pNIC-03	<i>nirK::uidA</i>	108.0 $\pm$ 11	1,078 $\pm$ 61	2,130 $\pm$ 120 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>  $\beta$ -glucuronidase-specific activity ( $\pm$  standard deviation [SD]). In nanomoles per min per milligram of protein; means from at least two independent determinations.

<sup>b</sup> After 10 h at 30°C, 100  $\mu$ M sodium nitroprussiate was added to microaerobic cultures and they were incubated 2 h more.

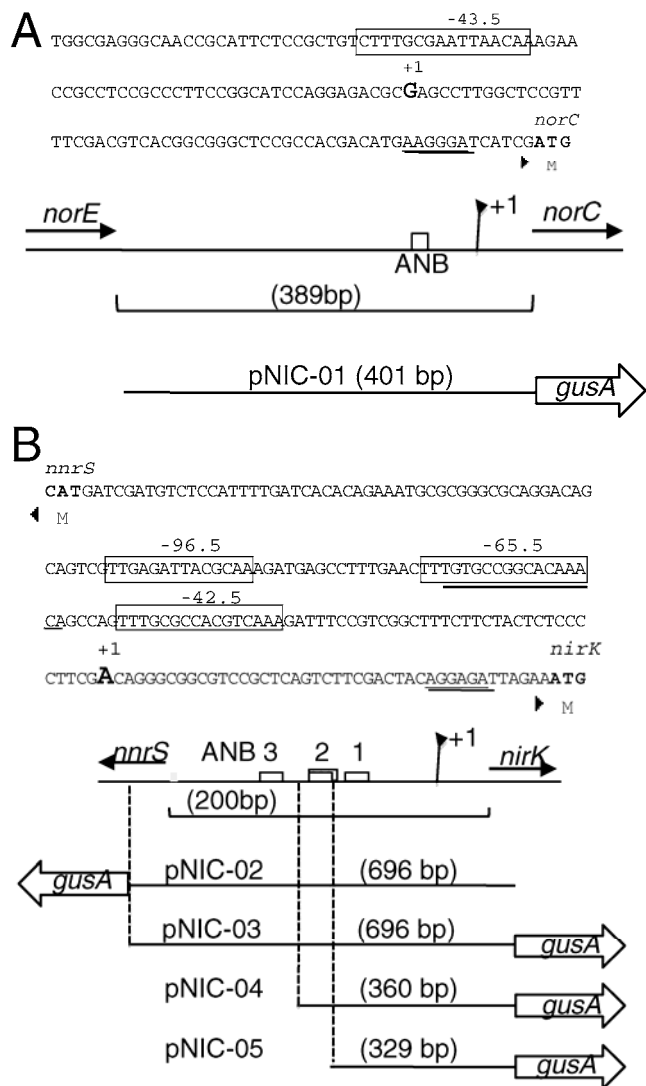
<sup>c</sup> ND = not detected.

<sup>d</sup> After 10 h at 30°C, 1.0 mM NaNO<sub>2</sub> was added to microaerobic cultures and they were incubated 2 h more.

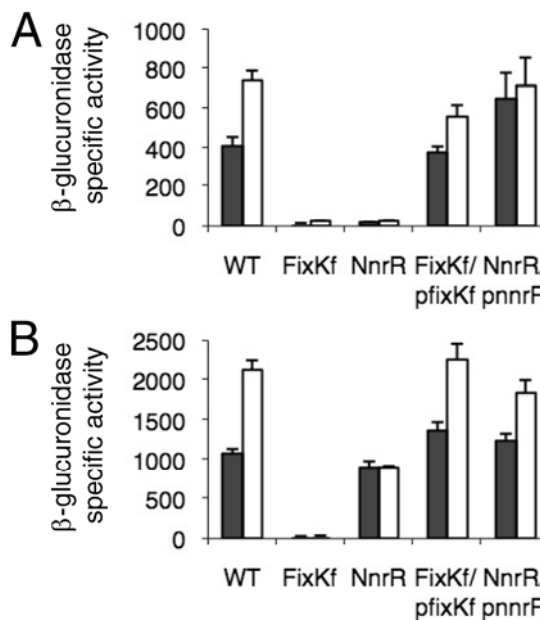
the presence of nitrite and FixKf and NnrR regulators. Complementation of CFNX637 (*fixKf::ΩKm*) and CFNX700 (*nnrR::loxSp*) mutant strains with plasmids *pfixKf* (pGHN-06) and *pnnrR* (pGHN-05), containing the wild-type *fixKf* and

*nnrR* genes, respectively, under the control of the *lacZ* promoter, restored the maximal *nirK* microaerobic expression observed when nitrite is present in the culture (Fig. 3B). Thus, our results clearly show that the induction of *nirK* and *norC* in response to N oxides is dependent on NnrR, which expression is microaerobically mediated by FixKf.

To define the key signal for activation of the *R. etli* NnrR transcriptional regulator, we compared the *nirK* microaerobic expression in different backgrounds in the presence of nitrite or SNP (Table 2). As observed previously, microaerobic expression of the *nirK* gene in the wild-type strain increased roughly two times in the presence of nitrite (from  $1,078 \pm 61$  to  $2,130 \pm 120$  [Table 2]). In contrast, in a *nirK* mutant (*nirK::loxP*, CFNX702), a strain unable to reduce  $\text{NO}_2^-$  to NO, the level of induction was significantly lower (from  $1,009 \pm 75$  to  $1,288 \pm 41$  [Table 2]). This suggests that reduction of  $\text{NO}_2^-$  to NO is crucial for induction of *nirK* microaerobic expression. In the presence of SNP, we observed the highest level of *nirK* expression in both wild-type and *nirK* mutant (Table 2). Microaerobic expression in a NnrR mutant was not affected by the presence of  $\text{NO}_2^-$  or NO (Table 2). This result indicates, in accordance with Figure 3, that a functional NnrR regulator is a requisite for the response of these genes to the presence of nitrogen oxides. Further evidence to support this interpretation



**Fig. 2.** Regulatory regions of *Rhizobium etli* *norC* and *nirK* genes. **A**, Sequence and schematic representation of the *norC* promoter region and construction of the *norC-gus* transcriptional fusion in plasmid pBBMCS53. **B**, Sequence and schematic representation of the *nirK* promoter region and fragments cloned in plasmid pBBMCS53 to generate *nnrS-gus* and *nirK-gus* transcriptional fusions. Putative FNR-binding sites are indicated as open boxes labeled ANB; NifA-UAS is underlined and the possible Shine-Dalgarno sequences are double underlined. The transcriptional start sites are indicated as +1 and by bent arrows. Relative positions of the regulatory elements identified and the size of fragments cloned in plasmid pBBMCS53 are indicated.



**Fig. 3.** Microaerobic expression of **A**, *norC* and **B**, *nirK* genes in different *Rhizobium etli* strains. Cells were grown microaerobically for 10 h (gray bars) and the expression was induced (white bars) by incubating 2 h more with sodium nitroprussiate to a final concentration of  $100 \mu\text{M}$  (A) or with nitrite at  $1 \text{ mM}$  (B).  $\beta$ -glucuronidase-specific activity is expressed as nanomoles per min per milligram of protein. Data are the mean of two replicas from three independent experiments.

**Table 2.** Nitric oxide as an environmental signal for the induction of the *nirK* microaerobic expression mediated by NnrR

Strain	Fusion genotype	$\beta$ -glucuronidase specific activity ( $\pm$ SD) <sup>a</sup>		
		1% $\text{O}_2$	1% $\text{O}_2$ + $\text{NaNO}_2^b$	1% $\text{O}_2$ + SNP <sup>c</sup>
CE3/pNIC-03	<i>nirK::uidA</i>	$1,078 \pm 61$	$2,130 \pm 120$	$2,445 \pm 131$
NirK/pNIC-03	<i>nirK::uidA</i>	$1,009 \pm 75$	$1,288 \pm 41$	$1,839 \pm 136$
NnrR/pNIC-03	<i>nirK::uidA</i>	$894 \pm 88$	$895 \pm 26$	$936 \pm 12$

<sup>a</sup>  $\beta$ -glucuronidase-specific activity ( $\pm$  standard deviation [SD]). In nanomoles per min per milligram of protein; means from at least two independent determinations.

<sup>b</sup> After 10 h at  $30^\circ\text{C}$ ,  $1.0 \text{ mM}$   $\text{NaNO}_2$  was added to microaerobic cultures and they were incubated 2 h more.

<sup>c</sup> After 10 h at  $30^\circ\text{C}$ ,  $100 \mu\text{M}$  sodium nitroprussiate (SNP) was added to microaerobic cultures and they were incubated 2 h more.

was obtained by analyzing the microaerobic expression of *nirK* in a wild-type background with NaNO<sub>2</sub> or SNP plus a NO scavenger (c-PTIO). In these experiments, the microaerobic expression of *nirK* was not affected by the presence of NaNO<sub>2</sub> or SNP when 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazo[1,5-d]imidazole-1-oxide (cPTIO) was added to the cultures (data not shown). These results clearly demonstrate that NO is the signal required for the induction of the microaerobic expression of *nirK* mediated by NnrR.

### Functional analysis of the putative Fnr-binding sites in the expression of *nirK*.

As noted above, we identified three sequences with high similarity to FNR-binding sites in the *nnrS-nirK* intergenic region. To analyze the functionality and participation of each putative anaerobox in the expression of the *nirK* operon, DNA fragments containing deletions of the *nirK* upstream sequence were synthesized by PCR and were fused with a promoterless  $\beta$ -glucuronidase gene. Plasmids containing transcriptional fusions were introduced separately into different *R. etli* CFN42 derivatives and their transcriptional regulation was studied under microaerobic conditions in comparison with the expression pattern observed with plasmid pNIC-03 (which contains the complete *nnrS-nirK* intergenic region [Fig. 2B]). A 360-bp-long fragment in plasmid pNIC-04 (*nirK::uidA* ANB1 and ANB2) carries ANB1 and ANB2, while pNIC-05 (*nirK::uidA* ANB1) only contains ANB1 in a 329-bp-long fragment. The level of *nirK* microaerobic expression observed in the wild-type strain or in the different mutant backgrounds remained unaffected when ANB3 was deleted, indicating that this sequence is not required for *nirK* expression (Table 3, compare lines 1 and 2, 4 and 5, 7 and 8, and 10 and 11). The absence of ANB2-induced *nirK* expression (Table 3, lines 2 and 3, 5 and 6, 8 and 9, and 11 and 12) suggests that the regulatory region present in pNIC-05 is sufficient for *nirK* expression and is probably the binding site for either FixKf, NnrR, or both. The increased microaerobic expression of *nirK* observed when ANB2 is deleted may be due to elimi-

nation of multiple FNR sites or ANB2 may be a site recognized by a repressor protein.

Since a potential NifA-binding site overlaps with ANB2, we analyzed *nirK* expression in a *R. etli nifA* mutant background (CFNX247). Interestingly, mutation of the *nifA* gene causes an overexpression of *nirK* even in the presence of the putative NifA-binding site (Table 3, lines 10 to 12), indicating that microaerobic expression of *nirK* in *R. etli* is subject to both positive and negative regulation, entailing the participation of two Fnr-type regulators (FixKf and NnrR) and a NifA dependent regulator. However, expression of *nirK* was also augmented 20% in the NifA mutant in the absence of ANB2 (Table 3, compare lines 11 and 12). Thus, the participation of several factors governs the expression of *nirK* in *R. etli* CFN42.

To define more exactly the importance that each anaerobox has as a regulatory site for the expression of *nirK*, site-specific mutations were introduced in ANB1 (from TTGCG-N4-GTC AA to ATAACG-N4-GTCAA) and ANB2 (from TTGTG-N4-CACAA to TTGTG-N4-GATAT). In each case, changes were designed to interrupt the complementarity in the palindromic regions; moreover, since ANB1 overlaps with the -35 regulatory sequence, changes introduced in this anaerobox were chosen to avoid affecting this region. DNA fragments containing specific mutations were synthesized by PCR and were fused with a promoterless  $\beta$ -glucuronidase gene. The plasmids constructed (pNIC-06 and pNIC-07) were introduced separately into different *R. etli* CFN42 derivatives and their transcriptional regulation was studied under microaerobic conditions in comparison with the expression pattern observed with plasmid pNIC-03, which contains the complete *nnrS-nirK* intergenic region (Fig. 2B). The microaerobic expression of *nirK* is drastically affected when ANB1 is mutated (Table 4). The very low expression levels observed confirm that this region is an essential target site for a positive transcriptional regulator that controls *nirK* microaerobic expression. Interestingly, when microaerobic expression of *nirK* is under the control of a regulatory region carrying specific mutations in ANB2 (plasmid pNIC-07), the level of expression is only half that

**Table 3.** Functional analysis of the *nirK* regulatory region

Strain	Strain genotype	Fusion genotype	$\beta$ -glucuronidase specific activity <sup>a</sup>
CE3/pNIC-03	Wild-type	<i>nirK::uidA</i> ANB1,2,3	1,078 $\pm$ 61
CE3/pNIC-04	Wild-type	<i>nirK::uidA</i> ANB1,2	1,037 $\pm$ 52
CE3/pNIC-05	Wild-type	<i>nirK::uidA</i> ANB1	1,920 $\pm$ 64
CFNX637/pNIC-03	<i>fixKf::</i> $\Omega$ Km	<i>nirK::uidA</i> ANB1,2,3	35 $\pm$ 12
CFNX637/pNIC-04	<i>fixKf::</i> $\Omega$ Km	<i>nirK::uidA</i> ANB1,2	51 $\pm$ 23
CFNX637/pNIC-05	<i>fixKf::</i> $\Omega$ Km	<i>nirK::uidA</i> ANB1	59 $\pm$ 7
CFNX700/pNIC-03	<i>nnrR::loxSp</i>	<i>nirK::uidA</i> ANB1,2,3	886 $\pm$ 59
CFNX700/pNIC-04	<i>nnrR::loxSp</i>	<i>nirK::uidA</i> ANB1,2	867 $\pm$ 63
CFNX700/pNIC-05	<i>nnrR::loxSp</i>	<i>nirK::uidA</i> ANB1	2,064 $\pm$ 22
CFNX247/pNIC-03	<i>nifA<sub>Δ</sub>::</i> $\Omega$ Sp	<i>nirK::uidA</i> ANB1,2,3	1,834 $\pm$ 73
CFNX247/pNIC-04	<i>nifA<sub>Δ</sub>::</i> $\Omega$ Sp	<i>nirK::uidA</i> ANB1,2	1,859 $\pm$ 108
CFNX247/pNIC-05	<i>nifA<sub>Δ</sub>::</i> $\Omega$ Sp	<i>nirK::uidA</i> -ANB1	2,372 $\pm$ 53

<sup>a</sup>  $\beta$ -glucuronidase-specific activity ( $\pm$  standard deviation). In nanomoles per min per milligram of protein; means from at least three independent determinations.

**Table 4.** Mutational analysis of the FNR sites in the *nirK* regulatory region

Strain	Fusion genotype	ANB <sup>a</sup>	Expression level <sup>b</sup>	
			Aerobic	Microaerobic
CE3/pNIC-03	<i>nirK::uidA</i>	1,2,3	108 $\pm$ 11	1,078 $\pm$ 61
CE3/pNIC-06	<i>nirK::uidA</i>	1m <sup>c</sup> , 2, 3	12 $\pm$ 4	38 $\pm$ 3
CE3/pNIC-07	<i>nirK::uidA</i>	1,2m <sup>d</sup> , 3	67 $\pm$ 5	510 $\pm$ 10

<sup>a</sup> FNR-binding site present in the transcriptional fusion.

<sup>b</sup>  $\beta$ -glucuronidase-specific activity ( $\pm$  standard deviation). In nanomoles of NO per h per milligram of protein; means from at least three independent determinations.

<sup>c</sup> Mutations in ANB1: from TTGCG-N4-GTCAA to ATAACG-N4-GTCAA.

<sup>d</sup> Mutations in ANB2: from TTGTG-N4-CACAA to TTGTG-N4-GATAT.



found when *nirK* expression is driven by a wild-type regulatory region (Table 4). Therefore, we hypothesize that ANB2 is also a target sequence for a positive regulator necessary for attaining the highest microaerobic expression of *nirK*.

#### *R. etli nirK* and *norC* encode functional reductases.

Previously, we reported that, in *R. etli* CE3, the *nirK* gene encodes a functional nitrite reductase. In contrast to the *R. etli* wild-type strain, a *nirK::ΩKm* mutant strain (CFNX699) lost the methyl viologen (MV)-dependent Nir activity and the capacity to consume nitrite from the medium in anaerobic cultures (Bueno et al. 2005). In this work, we demonstrate that disruption of *nirK* with a  $\Omega$ Km interposon exerts a polar effect on the downstream genes in the operon, including the gene encoding the NnrR transcriptional regulator. To avoid polarity effects on *nnrR*, a new *nirK::loxPSP* allele was generated. From this, an in-phase knock-out allele was derived (*nirK::loxP*) by Cre-mediated excision of the spectinomycin (Sp) cassette (strain CFNX702, discussed below). To evaluate the functionality of the reductase encoded by the *R. etli nirK* gene, nitrite reductase activity was determined in cell extracts from the wild-type and the *nirK::loxP* (CFNX702), *fixKf::ΩKm* (CFNX637), and *nnrR::loxPSP* (CFNX700) mutant strains grown microaerobically (Fig. 4). Nir activity was only detected in the wild-type strain.

Since specific mutations in the *nirK* regulatory sites (ANB1 and ANB2) affect gene expression, we performed a complementation analysis in the *nirK* mutant to ascertain if these mutations also have an effect on the Nir activity. To that end, three different plasmids were constructed: i) *pnirK-RRWt* (pGHN-01), in which the expression of *nirK* is under the control of the wild-type regulatory region; ii) *pnirK-ANB2m* (pGHN-03), in which the *nirK* regulatory region carried site-specific mutations in ANB2; and iii) *pnirK-ANB1m* (pGHN-02), in which the ANB1 was mutated. Wild-type Nir activity was restored upon introduction of plasmids pGHN-01 and pGHN-03 in the *nirK* mutant (Fig. 4). In contrast, plasmid pGHN-02, with ANB1 mutated, was unable to restore this activity. These data are consistent with a possible promoter located in ANB1 that is necessary for full expression of nitrite reductase activity.

As mentioned, a mutation in *nnrR* provokes a reduction of just 50% in *nirK* expression (Fig. 3B). Interestingly, Nir enzymatic activity was not detected in this background (Fig. 4), suggesting that NnrR is controlling other genes needed for Nir

activity. If this was the case, no Nir enzymatic activity should be seen in a *nnrR* mutant, even under conditions that restore full *nirK* expression. To substantiate this, two constitutive expression plasmids were generated, *pnirK* and *pnnrR* (pGHN-04 and pGHN-05, respectively), putting the *nirK* and the *nnrR* coding regions under the control of the *lacZ* promoter. Introduction of pGHN-04 in the *nnrR* mutant background failed to restore Nir activity, while wild-type activity was recovered in the *nnrR* mutant complemented with pGHN-05 (Fig. 4). These data support our interpretation that additional genes, controlled by *nnrR*, are required for full expression of Nir enzymatic activity.

#### *R. etli* responds to nitric oxide by the expression of *nirK* and *norC* genes.

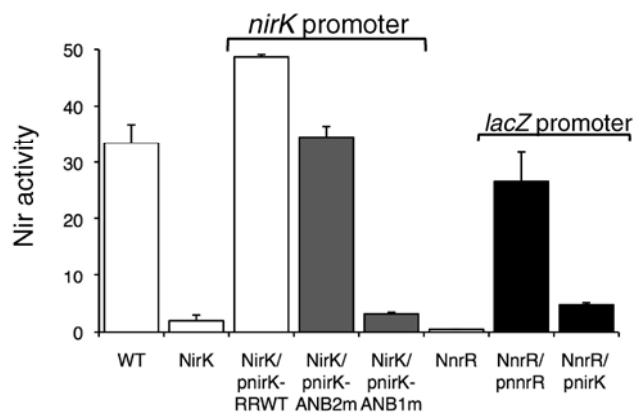
The *in vivo* relevance of the functions encoded by the *nirK* and *norC* genes can be further ascertained by exploring the response of the corresponding mutants to both nitrite and to nitric oxide generators, such as SNP. Although none of the mutants described here affect growth under microaerobic conditions (Fig. 5A), the presence of 1 mM NaNO<sub>2</sub> drastically affects this capacity, both in the wild-type strain and in the *norC* mutant and, to a lesser extent, in the *nnrR* mutant. Both the *nirK* and the *nnrR* mutants displayed a marked inhibition of growth in the presence of nitrite upon complementation with the corresponding genes, indicating that nitrite sensitivity in the wild-type strain is due to the presence of NirK and NnrR proteins (Fig. 5B). This sensitivity is most likely due to the role of both proteins, either directly or indirectly, to produce nitric oxide. To evaluate this possibility, levels of NO production and consumption were evaluated in the wild type and in the *nirK* mutant with a nitric oxide electrode (discussed below). As shown in Table 5, high levels of NO production were seen in the wild type, while in the *nirK* mutant, levels of this metabolite were almost negligible.

Significant levels of NO consumption were detected in the wild type. This activity is due to the product of *norC*, since levels of consumption were virtually undetectable in the corresponding mutant. Moreover, the *norC* mutant showed levels of NO production twice as high as that seen in the wild type. These data allow us to predict that the *norC* mutant should be hypersensitive to the effects of a nitric oxide generator such as SNP and to nitrite as well. As expected, the presence of 100 μM SNP in the culture severely affects the microaerobic growth of the *norC* (CFNX701) and *nnrR* (CFNX700) mutants, while the growth of the wild type was relatively resistant to SNP addition (Fig. 5C). Confirmation of the *in vivo* role of NorC in detoxifying the NO produced from nitrite was achieved by growth tests under microaerobic conditions of both the wild type and the *norC* mutant in the presence of sublethal concentrations of NaNO<sub>2</sub> (30 μM). The wild-type strain was still able to grow microaerobically in the presence of 30 μM NaNO<sub>2</sub>, while the *norC* mutant failed to grow in this condition (Fig. 5D). These data clearly indicate that the product of *norC* is required *in vivo* to detoxify NO and that the balance between the activities of NirK and NorC determine the level of tolerance to NO.

#### Symbiotic expression of the *nirK* and *norC* genes.

*Ex planta*, expression of both *nirK* and *norC* genes require low-oxygen conditions. This expression is further enhanced by the presence of a nitrogen oxide. To test if these genes are also expressed in nodules, common bean plants (*Phaseolus vulgaris*) were inoculated with either the wild-type, *nirK*, or *norC* mutant strains and were watered with or without nitrate.

The expression of *nirK* and *norC* genes in nodule was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). RNA was purified from nodules of bean plants that were inoculated with *R. etli* wild-type strain. The presence of a cDNA



**Fig. 4.** Methyl viologen-dependent nitrite reductase activity in free-living conditions of both the *nirK* or *nnrR* mutant derivatives carrying plasmids that express *nirK* or *nnrR* controlled by different promoters, i.e., wild-type promoters (white bars), mutated promoters (gray bars), and constitutive promoters (black bars). Nir activity is expressed as nanomoles NO<sub>2</sub><sup>-</sup> consumed per h per milligram of protein. Data show the mean of three independent experiments assayed three times. Error bars are indicated.

product corresponding to *nirK* and *norC* confirm that these genes are expressed in bean nodules (data not shown). Measurements of Nir activity in cell extracts from bean nodules revealed that the nitrite reductase activity in the wild-type nodules was about 4.8 times higher than that observed in extracts from nodules formed by the *nirK* mutant ( $95 \pm 6.3$  vs.  $19.5 \pm 0.7$  nmol  $\text{NO}_2^-$  consumed per milligram of protein per h, respectively). Only marginal increases in Nir activity were observed in plants treated with 4 mM  $\text{KNO}_3$  for 12 days before harvesting. Thus, in *R. etli* the symbiotic condition per se is sufficient to achieve a maximal activity of the reductase encoded by the *nirK* gene.

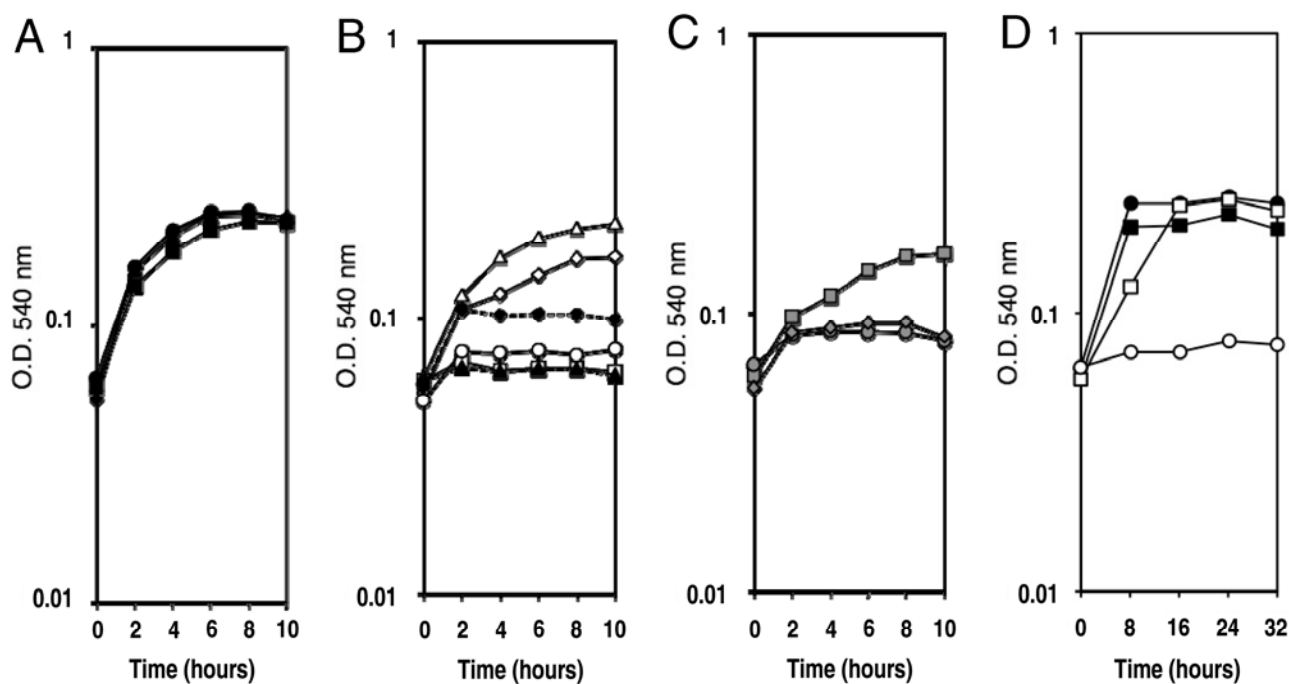
To evaluate the potential contribution of the bacterial micro-symbiont to NO production in bean plants, the proportion of Lb-NO complexes in nodules was quantified by UV-visible absorbance spectroscopy. To this end, bean plants were inoculated with wild type, *nirK*, or *norC* mutant strains and were watered with a solution containing nitrate at 14 days postinoculation (dpi). The proportion of Lb-NO complexes formed in nodules from plants cultivated without  $\text{KNO}_3$  was approximately 15 to 20%, irrespective of the strain used for inoculation (Table 6). However, Lb-NO formation increased to 64% with the application of nitrate in wild-type nodules and up to

95% in plants inoculated with the *norC* mutant. The marked increase in Lb-NO formation in the *norC* mutant may be due to impaired elimination of NO in these nodules, indicating an important role of the microsymbiont in protection from NO. Moreover, null mutations in the *nirK* gene prevent nitrate-induced increase in the formation of Lb-NO complexes, which remained at low levels (15 to 20%). This indicates that bacterial nitrite reductase is an important contributor to the formation of NO in nodules.

None of the mutants employed affected nitrogenase-specific activity in the absence of nitrate (Table 6). Nitrate induces a threefold decline in nitrogenase-specific activity for both the wild type and the *norC* mutant; in contrast, the nitrogenase-specific activity in nodules induced by the *nirK* mutant did not show a nitrate-induced decline (Table 6). This result may be explained by the reduced amount of Lb-NO present in these nodules, as compared with the wild type and the *norC* mutant.

## DISCUSSION

In this work, we demonstrate that, in *R. etli* CFN42, the *nirK* and *norCBQD* genes located on plasmid pCFN42f encode a



**Fig. 5.** Effect of nitrogen oxides on the microaerobic growth of *Rhizobium etli*. **A**, **B**, and **C**, Cells were cultivated in minimal medium at 30°C for 10 h or **D**, 32 h under **A**, microaerobic conditions or **B**, microaerobic conditions plus 1.0 mM  $\text{NaNO}_2$ , **C**, plus 100  $\mu\text{M}$  sodium nitroprussiate (SNP), or **D**, plus 30  $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$ . Squares indicate growth of wild-type strain under microaerobic conditions (■), plus  $\text{NaNO}_2$  (□), or plus SNP (▣); triangles indicate growth of *nirK* mutant strain CFNX702 under microaerobic conditions (▲), plus  $\text{NaNO}_2$  (△), or plus SNP (▴). Growth of complemented *nirK* mutant strain CFNX702 with plasmid pGHN-04 under microaerobic conditions with  $\text{NaNO}_2$  is indicated by --▲--. Circles indicate growth of *norC* mutant strain CFNX701 under microaerobic conditions (●), plus  $\text{NaNO}_2$  (○), or plus SNP (◐). Diamonds indicate growth of *mnrR* mutant strain CFNX700 under microaerobic conditions (◆), plus  $\text{NaNO}_2$  (◇), or plus SNP (◈). Growth of complemented *mnrR* mutant strain CFNX700 with plasmid pGHN-05 under microaerobic conditions with  $\text{NaNO}_2$  is indicated by --◆--.

**Table 5.** Nitric oxide production and consumption in *Rhizobium etli*

Strain	Genotype	NO production <sup>a</sup>	NO consumption <sup>b</sup>
CE3	Wild-type	$219.0 \pm 15$	$42 \pm 4$
CFNX702	<i>nirK::loxP</i>	$3.0 \pm 0.1$	Not measured
CFNX701	<i>norC::loxP</i>	$557.2 \pm 43$	Not detected

<sup>a</sup> NO produced in free-living cells after the addition of 30  $\mu\text{l}$  of 50 mM  $\text{NaNO}_2$ , expressed in nanomoles of NO per h per milligram of protein. Means from at least two independent determinations.

<sup>b</sup> NO consumed in free-living cells after the addition of 100  $\mu\text{l}$  of a saturated NO solution (1.91 mM), expressed in nanomoles of NO per h per milligram of protein. Means from at least two independent determinations.

functional Cu-containing nitrite reductase and a cytochrome *c*-type nitric oxide reductase, respectively. Previously, we demonstrated that *R. etli* fails to grow anaerobically with KNO<sub>3</sub> and lacks nitrate reductase activity (Bueno et al. 2005). In addition, we confirm by genome analysis that *R. etli* lacks the nitrate and the nitrous oxide reductases. As a consequence of the low efficiency of energy coupling using nitrite reduction, *R. etli* CFN42 displays a poor anaerobic growth at the expense of nitrite. Therefore, we propose that, in *R. etli* CFN42, the accumulation of toxic levels of nitric oxide is prevented by the NO reductase, acting in concert with the NO<sub>2</sub> reductase.

FixK and NnrR, two members of the CRP/FNR family, have been described as regulatory proteins for the expression of genes encoding reductases involved in denitrification. FixK is needed for activation of these genes under oxygen-limited conditions, while the response to the presence of N oxide depends of NnrR (Bedmar et al. 2005; Hartsock and Shapleigh 2010; Mesa et al. 2003; Robles et al. 2006). Recently, the participation of additional regulatory proteins for expression of these genes was reported. Among them, NifA is required in *B. japonicum* for a full expression of *nirK*, *norC*, and *napE* genes (Bueno et al. 2010), while *Agrobacterium tumefaciens* employs ActR and FnrR to control *nirK* and *norC* expression (Baek et al. 2008).

The novel operon arrangement reported here for *nirK* and one of its transcriptional regulators (*nnrR*) differentiates the way that *R. etli* regulates these genes. In the *norC* and *nirK* regulatory regions, we identified class II promoters in which an FNR regulator activates expression in response to low-oxygen concentrations (Wing et al. 1995). Expression analysis clearly shows that a functional FixKf protein is entirely required to activate, under low-oxygen conditions, *nirK* and *norC* promoters, while response to N oxides under microaerobiosis is mediated by NnrR. A differential dependence for NnrR was observed. Full expression of *norC* in response to N oxides under microaerobiosis requires the presence of FixK and NnrR. In contrast and similar to that described in *B. japonicum* (Mesa et al. 2003), microaerobic expression of *nirK* is still observed in an *nnrR* mutant background. Since *nirK* and *nnrR* are part of a single operon, this has the important consequence that NnrR controls its own N oxide-dependent expression. The signal required for the induction of the microaerobic expression of *nirK* mediated by NnrR is the production of NO. This regulatory arrangement in *R. etli* ensures that expression of *nirK* and *norC* is coupled to facilitate NO detoxification.

Three putative FNR sites were found in the *nirK* regulatory region. The observation that a *nirK* regulatory region with only ANB1 is highly expressed supports the idea that, in *R. etli*, the presence of more than one anaerobox has a repressive effect, as reported in other systems (Green et al. 2001). In addition, both ANB1 and ANB2 are target sites for other positive regulators, since a low expression level was observed when point mutations were introduced. Therefore, in *R. etli* CFN42, activation of *nirK* depends on FixKf, low oxygen conditions and

the FNR site ANB1. For maximum *nirK* expression, *nnrR* needs to be activated by NnrR when NO is present. Under these conditions, NnrR also activates *norC* to prevent NO accumulation. The removal of FixKf results in the loss of *nirK* expression, whereas in a *nnrR* mutant, levels of *nirK* are just halved. Interestingly, this mutant lacks any nitrite reductase activity. The dependence on NnrR for complete enzymatic activity may imply that this protein regulates some additional elements necessary for the nitrite reductase activity.

Additional members of the NnrR regulon in *R. etli* may be *cysG* and *azuPf*. It was reported that in *R. etli* CE3, the siroheme cofactor (product of the CysG activity) is required for nitrite reductase activity (Tate et al. 1997). The presence of a putative FNR-binding site in the *R. etli cysG* regulatory region (L. Girard, unpublished data) opens the possibility that this gene is also a NnrR target gene. Preliminary data from our laboratory suggest that the *azuPf* gene, encoding a blue copper pseudoazurin (a possible electron donor for the nitrite reductase), is also part of the NnrR regulon.

The structuring of regulatory circuits for controlling *nirK* and *norC* shows similarities between rhizobiales but also important differences. Common to all systems is the requirement of *nnrR*. A remarkable difference between *Agrobacterium* spp. and both *R. etli* and *B. japonicum* is the role of FixK as a regulator for *nirK* expression. Unlike *R. etli* and *B. japonicum*, FixK is not needed in *A. tumefaciens* for control of *nirK*, which is controlled by FnrN and ActR instead (Baek et al. 2008). Experiments to determine the involvement of ActR as an additional regulator of *nirK* in *R. etli* are considered for the future.

At very low oxygen concentrations, denitrification genes in *B. japonicum* need NifA for maximal expression (Bueno et al. 2010). In contrast, this regulator in *R. etli* has a negative effect on the expression of the *nirK* operon. In both cases, NifA appears to modulate by a factor of two the level of expression of *nirK*. It has been reported that the presence of both nitrite and a functional nitrite reductase affects oxygen respiration when nondenitrifying bacteria are growing in low-oxygen conditions (Toffanin et al. 1996). Furthermore, the binding of nitric oxide to cytochrome *c* oxidase can inhibit its activity (Brown and Cooper 1994). Therefore, we hypothesize that modulation of the *nirK* operon by NifA can be used in nondenitrifying bacteria, such as *R. etli*, to protect its symbiotic cytochrome oxidase operating during nitrogen fixation.

Nitric oxide participates in diverse plant processes as a signaling molecule. Several studies have shown the production of NO during different stages of the legume-rhizobia symbiosis (Baudouin et al. 2006; Cueto et al. 1996; Sánchez et al. 2010; Shimoda et al. 2005). Nevertheless, the exact source of NO in nodules is still controversial, with proposals that nodular NO comes as a product of bacterial denitrifying metabolism (Meakin et al. 2007; Sánchez et al. 2010) or may also be produced in plant root tissue from arginine via an unidentified NOS-like enzyme (Baudouin et al. 2006). In addition, in plant

**Table 6.** Nitrogenase activity and proportion of nitrosylhemoglobin (Lb-NO) in bean nodules formed by *Rhizobium etli* wild-type, *nirK*, and *norC* strains

Strain	Genotype	-KNO <sub>3</sub>		Lb-NO <sup>b</sup>	+KNO <sub>3</sub>	
		14 dpi <sup>a</sup>	25 dpi <sup>a</sup>		25 dpi <sup>a</sup>	Lb-NO <sup>b</sup>
CE3	Wild-type	38 ± 11	23 ± 8*	20 ± 3	13 ± 3*	66 ± 3
CFNX702	<i>nirK::loxP</i>	30 ± 13	25 ± 5	18 ± 3	31 ± 11	20 ± 2
CFNX701	<i>norC::loxPSP</i>	35 ± 8	31 ± 8*	15 ± 2	13 ± 5*	90 ± 5

<sup>a</sup> Nitrogenase-specific activity determined at 14 and 25 days postinoculation (dpi), expressed in micromole ethylene per gram of nodule per h. Data are the average of nine control plants (-KNO<sub>3</sub>) or nine plants watered with 4 mM KNO<sub>3</sub> for 12 days (+KNO<sub>3</sub>). Asterisks (\*) indicate that the means of the samples are different from the control plants at the 0.05 level ( $P = 0.05$ , Student's *t*-test).

<sup>b</sup> Percentage of Lb-NO complexes was determined by UV-Vis spectra. Nodules were isolated at 25 dpi from control plants or plants watered with KNO<sub>3</sub> for 12 days. Data are the average of two independent assays.

cells, NO can be produced from nitrate via both nonenzymatic and enzymatic pathways, i.e., those catalyzed by nitrate reductase (Meyer et al. 2005) or by the plasma membrane-bound nitrite NO reductase (Stöhr et al. 2001). In the root nodules, as a result of the reducing conditions needed for nitrogen fixation, formation of the Lb-NO complex is believed to occur as a result of the reduction of exogenous nitrate. In this condition, NO binding may inhibit the oxygen-carrying activity of the leghemoglobin. It has also been observed that, as a result of the exposition of root nodules to high concentrations of nitrate, results in an increased yield of Lb-NO with a concomitant decrease in acetylene (ethylene) reducing activity. Thus, formation of Lb-NO as a result of nitrate reduction appears to have deleterious effects on the functional activity of root nodules (Mathieu et al. 1998; Sánchez et al. 2010).

In this study, we found that levels of Lb-NO in bean plants exposed to nitrate are increased in a *norC* mutant but decreased in a *nirK* mutant. These results are consistent with production of NO from the bacterial nitrite reductase and its elimination by the bacterial nitric oxide reductase in bean nodules. Important as the bacterial contribution to NO metabolism seems to be, it should be pointed out that it is not the only route to NO production. Even in a *nirK* mutant, low levels of Lb-NO were seen, indicating that other routes of unknown origin are participating in NO production. In contrast to our observations, in soybean nodules formed by *nirK* and *norC* mutants, the maximal formation of Lb-NO complexes require a physiological stress condition such as flooding in addition to nitrate. In this condition, nitrogenase activity in *nirK* nodules is not affected (Sánchez et al. 2010).

Interestingly, in bean nodules, the nitrate-induced decline in nitrogenase-specific activity observed in both the wild type and the *norC* mutant was not detected in the *nirK* mutant. This can be explained by the high levels of Lb-NO observed in the former two strains and the reduced levels of Lb-NO in the latter strain. Thus, these results reveal the commitment of these reductases to safeguard nitrogenase activity in *R. etli* from toxic levels of nitrogen reactive species.

Thus, results from our present work clearly demonstrate that, in *R. etli* CFN42, the product of *norC* is required in vivo to detoxify NO and that the balance between the activities of NirK and NorC determine the level of tolerance to NO. The particular genomic arrangement in *R. etli* of *nirK* and *nirR* genes in a single operon suggests that NnrR controls its own expression in response to NO. Nitrite reductase activity and *norC* expression are totally dependent on NnrR. Therefore, gene expression in response to NO is tightly regulated in this bacterium to prevent deleterious effects by the expression of the nitrite reductase.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.

The bacterial strains and plasmids used are listed in Table 7. *Rhizobium* strains were grown at 30°C in PY rich medium (Noel et al. 1984) or in Y minimal medium (MMY) with succinate (10 mM) and ammonium chloride (10 mM) as carbon and nitrogen sources, respectively (Bravo and Mora 1988). *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani medium. Antibiotics were added at the following concentrations: carbenicillin, 100 µg ml<sup>-1</sup> (*E. coli*); streptomycin (Sm), 200 µg ml<sup>-1</sup> (*R. etli*); gentamicin (Gm), 15 µg ml<sup>-1</sup> (*E. coli* and *R. etli*); kanamycin (Km) 30 µg ml<sup>-1</sup> (for both *E. coli* and *R. etli*); nalidixic acid 20 µg ml<sup>-1</sup> (*R. etli*); and spectinomycin (Sp), 100 µg ml<sup>-1</sup> (*E. coli* or *R. etli*). When required, sucrose was added at 12.5% (wt/vol). For detection of β-galactosidase and β-glucuronidase activity, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide, respectively, were used in plates at a concentration of 20 µg ml<sup>-1</sup>.

For growth under microaerobic conditions, cultures were grown to mid-exponential phase in PY medium. Cells were collected by centrifugation, were washed with sterile MMY, and were concentrated 100-fold. MMY containing 10 mM of succinate and 10 mM of ammonium chloride as carbon and nitrogen sources (20 ml) were inoculated with these suspensions at an initial optical density at 540 nm of 0.05. Cultures were incubated in 150-ml bottles closed with an airtight stopper and were flushed with several volumes of an oxygen and argon (1:99, vol/vol) mixture. Cultures were grown with shaking (200 rpm) for 10 h at 30°C (Granados-Baeza et al. 2007). When needed, cells were cultivated with 10 mM KNO<sub>3</sub>, 30 µM or 1.0 mM NaNO<sub>2</sub>, 100 µM SNP or 1 mM cPTIO (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.); induction experiments were carried out by adding the corresponding N oxide to microaerobic cultures and incubating for 2 h more.

### Microbiological and recombinant DNA methods.

Total and plasmid DNA isolation, digestion with restriction enzymes, cloning, agarose gel electrophoresis, and *E. coli* transformation were performed using standard protocols (Sambrook et al. 1989). Enzymes used for DNA restriction and modification were purchased from either Invitrogen or Fermentas (Vilnius, Lithuania) and were used according to the instructions of the manufacturer.

Conjugative transfer of plasmids from *E. coli* to *Rhizobium* spp. was done routinely by triparental crosses, using either pRK2013 or pRK2073 as helpers. For determination of plasmid profiles, a modified Eckhardt procedure was used (Hynes and McGregor 1990).

For Southern hybridizations, DNA was digested with appropriate restriction enzymes, electrophoresed in 1% (wt/vol) agarose gels, and blotted onto nylon (Hybond N+). Hybridization was carried out under high stringency conditions using Rapid-hyb buffer (Amersham, Bucks, U.K.). Specific probes were normally obtained by PCR and were labeled with α<sup>32</sup>P-CTP by random priming, using Amersham's Rediprime system.

### Enzymatic assays.

Nitrate reductase and nitrite reductase activities were determined by a colorimetric MV-dependent assay (Bueno et al. 2005; Delgado et al. 2003; Mesa et al. 2003). To prepare free-living cell suspensions, 20 ml of microaerobic cultures were spun down at 8,000 rpm, 4°C for 10 min, were washed in 50 mM Tris-HCl buffer until no nitrite was detected, and were resuspended in 1.2 ml of the same buffer. For determinations of Nir activity, aliquots of 200 µl of cell suspension (1 to 3 mg of protein) were added to a reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.2 mM KNO<sub>2</sub>, and 0.4 mM MV. The reaction was started by the addition of 50 µl of freshly prepared sodium dithionite solution (30 mg/ml) in 300 mM NaHCO<sub>3</sub>. After incubation for 20 min at 30°C, the reaction was stopped by shaking, until the samples had lost their blue color. Control reactions were run at the same time, but the sodium dithionite was oxidized at the start of the reaction. Nitrate reductase reaction mixture contained 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 20 mM KNO<sub>3</sub>, 0.4 mM of MV, and 200 µl of cell suspension (1 to 3 mg of protein). The reaction was started by addition of 50 µl of freshly prepared sodium dithionite solution (8 mg ml<sup>-1</sup>) in Tris-HCl buffer. After incubation for 30 min at 30°C, the reaction was stopped by vigorous shaking until the samples had lost their blue color. Nitrite was estimated by the diazotation reaction, adding equal amounts of sulphanilamide, naphthylethylene diamine dihydrochloride, and cell suspension. This mixture was then incubated at room

temperature for 20 min, measuring the absorbance at 450 nm of each sample. The amount of nitrite was determined from a standard curve of known nitrite amounts.

Quantitative  $\beta$ -glucuronidase activity was measured from MMY cultures of *R. etli* strains harboring transcriptional fusions as described previously (Granados-Baeza et al. 2007). After 10 h of growth, gene expression was induced using either 10 mM NaNO<sub>3</sub>, 1.0 mM NaNO<sub>2</sub>, or 100  $\mu$ M SNP. Quantitative  $\beta$ -glucuronidase activity was performed 2 h after induction on 1.0-ml culture samples, using as substrate 1.25 mM PNPg (4-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucuronide) (Girard et al. 2000). Protein concentration was determined using the Bradford reagent or by Lowry assay over a second set of 1.0-ml samples. Specific activities are reported as nanomoles of product per minute per milligram of protein.

### PCR amplification.

Specific PCR primers were designed using the Oligo 6.0 software and were purchased from Unidad de Síntesis Química IBt-UNAM (Cuernavaca, Mexico). PCR amplifications were done in a Mastercycler 5330 (Eppendorf, Hamburg, Germany). Accuprime high fidelity *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) was used in PCR reactions with a cycling regime that includes a denaturing step at 94°C for 1 min, followed by 30 cycles of

94°C for 30 s, 45 to 60°C (according the primers' melting temperatures) for 30 s, and 72°C for 90 s. A final elongation step was made at 72°C for 5 to 10 min, according to the length of the DNA fragment to be amplified.

### RT-PCR analysis.

Total RNA was purified from both wild type and *nirK* mutant strains (*nirK*:: $\Omega$ Km, strain CFNX699 or *nirK*::*loxP*, strain CFNX702) grown under microaerobic conditions using the High Pure RNA isolation kit (Roche, Branchburg, NJ, U.S.A.). Single-stranded cDNA synthesis was performed using the RevertAid H Minus first-strand cDNA synthesis kit (Fermentas). Specific primers for genes forming the *nirK* operon analysis were designed and used to obtain RT-PCR products. The PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gels.

### 5' RACE.

Transcriptional start sites for the *nirK* and *norC* operons were identified in assays using the 5' RACE system, version 2.0 (Invitrogen). scDNA was synthesized from 2  $\mu$ g of total RNA purified from microaerobic cultures of the wild-type strain derivatives carrying *nirK* and *norC* transcriptional fusions in plasmid pBBMCS53 (pNIC-01 and pNIC-03, respectively), using complementary primer *gusLw* (5'-ACAGGACGTAACA

**Table 7.** Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Reference
<i>Rhizobium etli</i>		
CFN42	Wild type (type strain)	Quinto et al. 1982
CE3	Sm <sup>r</sup> derivative of CFN42	Noel et al. 1984
CFNX247	CE3 derivative, <i>nifAD</i> :: $\Omega$ Sp-Sm	Girard et al. 1996
CFNX637	CE3 derivative, <i>fixKf</i> :: $\Omega$ Km	Girard et al. 2000
CFNX699	CE3 derivative, <i>nirK</i> :: $\Omega$ Km	Bueno et al. 2005
CFNX700	CE3 derivative, <i>nrrR</i> :: <i>loxP</i>	This work
CFNX701	CE3 derivative, <i>norC</i> :: <i>loxP</i> Sp	This work
CFNX702	CE3 derivative, <i>nirK</i> :: <i>loxP</i>	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17recA1endA1gyrA96 thi-1relA1</i>	Sambrook et al. 1989
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> ( <i>r-gm-b</i> ) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Sambrook et al. 1989
BW21038	DE3 <i>lacX74 uidA</i> ( $\Delta$ <i>Mlu1</i> ): <i>pir</i> <sup>+</sup> miniTn5 Lac4 (Cm <sup>r</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>recA1</i>	Metcalfe et al. 1996
Plasmids		
pSK <sup>+</sup>	Cloning vector, Ap <sup>r</sup>	Stratagene
pCR2.1 TOPO	Cloning vector for polymerase chain reaction products, Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Invitrogen
pJQ200mp18	Suicide cloning vector, Gm <sup>r</sup>	Quandt and Hynes 1993
pK <sup>*</sup> <i>mobsacB</i>	Suicide cloning vector, Km <sup>r</sup>	Schäfer et al. 1994
pBBR1MCS5	Broad-host-range cloning vector, Gm <sup>r</sup>	Kovach et al. 1995
pBBMCS53	$\Delta$ <i>placZ</i> pBBR1MCS-5 derivative, carrying the promoterless <i>uidA</i> gene, Gm <sup>r</sup>	Girard et al. 2000
pRK2073	Conjugation helper plasmid, Sm/Sp <sup>r</sup>	Better and Helinski 1983
pRK2013	Conjugation helper plasmid, Km <sup>r</sup>	Figurski and Helinski 1979
pRK415	Broad-host-range plasmid, Tc <sup>r</sup>	Keen et al. 1988
pTR102	Broad-host-range plasmid, Tc <sup>r</sup>	Weinstein et al. 1992
pNIC-01	pBBMCS53 derivative <i>norC</i> :: <i>uidA</i>	This work
pNIC-02	pBBMCS53 derivative <i>nrrS</i> :: <i>uidA</i>	This work
pNIC-03	pBBMCS53 derivative <i>nirK</i> :: <i>uidA</i> transcriptional fusion with 463-bp upstream NirK ATG, containing anaeroboxes 1, 2, and 3	This work
pNIC-04	pBBMCS53 derivative <i>nirK</i> :: <i>uidA</i> transcriptional fusion with 133-bp upstream NirK ATG, containing anaeroboxes 1 and 2	This work
pNIC-05	pBBMCS53 derivative <i>nirK</i> :: <i>uidA</i> transcriptional fusion with 103-bp upstream NirK ATG, containing anaerobox 1	This work
pNIC-06	pBBMCS53 derivative <i>nirK</i> :: <i>uidA</i> transcriptional fusion with specific mutations in anaerobox 1	This work
pNIC-07	pBBMCS53 derivative <i>nirK</i> :: <i>uidA</i> transcriptional fusion with specific mutations in anaerobox 2	This work
pGHN-01	pNIC-03 derivative with the complete <i>nirK</i> coding region	This work
pGHN-02	pNIC-06 derivative with the complete <i>nirK</i> coding region	This work
pGHN-03	pNIC-07 derivative with the complete <i>nirK</i> coding region	This work
pGHN-04	pTR102 derivative carrying the <i>nirK</i> gene under the <i>lacZ</i> promoter	This work
pGHN-05	pTR102 derivative carrying the <i>nrrR</i> gene under the <i>lacZ</i> promoter	This work
pGHN-06	pRK415 derivative carrying the <i>fixKf</i> gene under the <i>lacZ</i> promoter	This work
pGHN-07	pK <sup>*</sup> <i>mobsacB</i> derivative, <i>nrrR</i> :: <i>loxP</i> Sp	This work
pGHN-08	pK <sup>*</sup> <i>mobsacB</i> derivative, <i>norC</i> :: <i>loxP</i> Sp	This work
pGHN-09	pJQ200mp18 derivative, <i>nirK</i> :: <i>loxP</i> Sp	This work

<sup>a</sup> Sm, Sp, Km, Cm, Ap, Gm, and Tc = streptomycin, spectinomycin, kanamycin, chloramphenicol, gentamicin, and tetracycline, respectively. <sup>r</sup> = antibiotic resistance.

TAAGGGACT-3') or *norCGSP1* (5'-CGAGGAAGTCCGCGA GAT-3'). After first-strand cDNA synthesis, the mRNA was removed by treatment with RNase and the scDNA was purified using a S.N.A.P. column. Terminal deoxynucleotidyl transferase and deoxycytidine triphosphate were used to add homopolymeric tails to the 3' ends of the cDNA. Nested PCR reactions were done using gene-specific primers *nirKGSP-2* (5'-AAGG ATCCACCTTCGGCCTTCTGCTGATG-3') (in positions 205 to 227) or *norCGSP2* (5'-AAGCTCGAGACGTGTTTCCC-3') (in positions 171 to 184) and the abridged anchor primer (AAP, GGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG, provided in the kit). The products were cloned into the pCR2.1 TOPO vector for sequencing.

### Plasmid construction.

Specific mutagenesis of the *nnrR* gene was done by PCR amplification of the corresponding genomic region from strain CE3, using the specific primers UpDRnnrR-BamHI (5'-CGGG ATCCGACCCGCGCACCATTCTCATT-3', underlined, introduced *Bam*HI site) and LwDRnnrR-BamHI (5'-CGGGATCCG CAAACAGCAGCCACAGAACC-3', underlined, introduced *Bam*HI site). The 2,345-bp PCR product (containing the 3' end of *nirV*, the complete coding region for *nnrR*, and the 5' end of the *nnrU* gene) was cloned by T-A annealing into pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). In this plasmid, a *nnrR::loxP*Sp deletion-substitution allele was generated by deleting a 49-bp sector (from nucleotide 233 to 282) by digestion with *Sma*I and inserting in its place a *Sma*I-*Sma*I *loxP*Sp cartridge. The fragment containing the *nnrR::loxP*Sp deletion-substitution allele was then removed by *Bam*HI digestion and was subcloned into *Bam*HI-restricted pK\*mobsacB vector (Schäfer et al. 1994), giving rise to plasmid pGHN-07.

To introduce a mutation into the *norC* gene, a 1,475-bp product was obtained by PCR using total DNA from strain CE3 as template with the specific primers UpDRnorC-EcoRI (5'-CGG AATTCATCTCATGACGACCTCTGG-3', *Eco*RI site underlined) and LwDRnorB-EcoRI (5'-CGGAATTCAGGTTGAC GGGTTGTAGAA-3', *Eco*RI site underlined). The *Eco*RI sites introduced by the primers were used to clone the fragment into the pSK+ vector (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.). To construct a suicide plasmid useful for homogenotization, the *Eco*RI-*Xho*I fragment containing the *norC* allele was cloned into the *Eco*RI-*Sa*II sites in pK\*mobsacB (Schäfer et al 1994). Mutagenesis of the *norC* gene was achieved by introducing into the *Bam*HI site (nucleotide 285) a *loxP*Sp interposon (Martínez-Salazar and Romero 2000), resulting in plasmid pGHN-08.

To introduce a mutation into the *nirK* gene, a 1,692-bp product was obtained by PCR using total DNA from strain CE3 as a template with primers UpnnrS-*Bam*HI (5'-TTGGATCCCTCG GAACTGCGGTGAGAAGGA-3', *Bam*HI site underlined) and LwDRnirK-*Bam*HI (5'-ATGGATCCAGCAGCCACCTTTA GCGTAG-3', *Bam*HI site underlined). The *Bam*HI sites introduced by the primers were used to clone the fragment into the pSK<sup>-</sup>1 vector (L. Girard, unpublished). Mutagenesis of the *nirK* gene was achieved by introducing into the *Eco*RI site (nucleotide 242 in the *nirK* coding region) a *loxP*Sp interposon (Martínez-Salazar and Romero 2000). To construct a suicide plasmid (pGHN-09) useful for homogenotization, the *Bam*HI fragment containing the *nirK::loxP*Sp allele, was cloned into the *Bam*HI site in pJQ200mp18 (Quandt and Hynes 1993).

To generate plasmids for expression analysis of the desired genes, the corresponding regulatory regions were cloned in the broad-host plasmid pBBRMCS53 (Girard et al. 2000) carrying a promoterless *uidA* gene. Plasmid pNIC-01, carrying a *norC::uidA* transcriptional fusion was constructed by cloning the *Eco*RI-*Xho*I 388-bp fragment synthesized by PCR with the specific primers NCUp-EcoRI (5'-TTAGAATTCCTCGGCCT

GCGT-3', *Eco*RI site underlined) and NCLw-*Xho*I (5'-AAGC TCGAGACGTGTTTCCC-3', *Xho*I site underlined). The intergenic region *nnrS-nirK* was obtained by PCR using total DNA from strain CE3 and specific primers (UpnnrS-*Bam*HI, 5'-TT GGATCCCTCGGAACTGCGGTGAGAAGGA-3' and LwnirK-*Bam*HI 5'-AAGGATCCACCTTCGGCCTTCTGCTGATG-3', *Bam*HI sites underlined). The *Bam*HI 696-bp fragment was cloned in both directions in pBBMCS53 to obtain plasmids pNIC-02 and pNIC-03.

To construct transcriptional fusions containing deletions of the *nirK* upstream sequence, two PCR products were synthesized using primers UpnirK-gusM (5'-CAGGATCCAAGATG AGCCTTTGAACCTTTG-3', *Bam*HI site is underlined) or UpnirK-gusS (5'-AAGGATCCAACAGCCAGTTTGC GCC AC-3', *Bam*HI site is underlined) with primer LwnirK-*Bam*HI. Fragments of 360 bp (containing the 133-bp upstream NirK start codon) and 329 bp (containing the 103-bp upstream NirK start codon) were cloned separately in pBBMCS53, giving plasmids pNIC-04 (*nirK::uidA*-M) and plasmid pNIC-05 (*nirK::uidA*-S). The correct orientation of the fragments in the plasmids was verified by PCR using primer gusLw and the corresponding upper primer in each case.

Mutations of the putative FNR-binding sites (ANB1 and ANB2) in the *nirK* promoter region were introduced using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). ANB1 was modified from TTGCG-N4-GTCAA to ATAACG-N4-GTCAA (nucleotides changed are underlined). The sequence of ANB2 was modified from TTGTG-N4-CACAA to TTGTG-N4-GATAT (nucleotides underlined indicate the modifications). Both modified *nirK* regulatory regions were cloned in plasmid pBBMCS53 to obtain plasmids pNIC-06 and pNIC-07.

Four additional plasmids were constructed by cloning the complete *nirK* coding region downstream of the *nirK* regulatory regions present in plasmids pNIC-03, pNIC-06, and pNIC-07, to obtain plasmids pnirK-RRWT (pGHN-01), pnirK-ANB2m (pGHN-03), and pnirK-ANB1m (pGHN-02). Plasmids with *nirK* (pGHN-04), *nnrR* (pGHN-05), and *fixKf* (pGHN-06) genes constitutively expressed from the *lacZ* promoter were obtained by cloning the respective coding region in the conjugative plasmids pTR102 or pRK415.

### *R. etli* mutant derivatives.

Introduction of all mutant alleles into *R. etli* was carried out by homogenotization using the *sacB* marker present in pJQ200mp18 and pK\*mobsacB vectors; this marker allows an easy selection for homogenotization events by scoring for resistance to sucrose. A *R. etli* strain containing *nnrR::loxP*Sp, *norC::loxP*Sp (CFNX701), and *nirK::loxP*Sp alleles were constructed using plasmids pGHN-07, pGHN-08, and pGHN-09, respectively. Double recombinants were selected as Sm<sup>r</sup>Sp<sup>r</sup>Km<sup>r</sup> or Sm<sup>r</sup>Sp<sup>r</sup>Gm<sup>r</sup> transconjugants. To verify that the desired gene replacements had occurred, both plasmid profiles as well as total DNA blots of all the derivatives were analyzed by Southern hybridization against the appropriate gene and cassette probes. Strains CFNX700 (*nnrR::loxP*) and CFNX702 (*nirK::loxP*) were obtained using the *cre-loxP* system on double recombinant strains carrying *nnrR::loxP*Sp and *nirK::loxP*Sp alleles (Martínez-Salazar and Romero 2000).

### Evaluation of nitrogen-fixation capacity.

Three-day-old *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa seedlings were inoculated with the desired strain and were grown in a greenhouse as previously described (Peralta et al. 2004). At 14 and 25 dpi, nine plants were analyzed for nitrogenase activity (by acetylene reduction) and nodule number as well as nodule and plant dry weight. Bacteria were isolated from nodules and their identities were verified by their antibiotic-resis-



tance patterns. When necessary, after 14 dpi, plants were watered with 4 mM KNO<sub>3</sub> for 12 days before harvesting.

### Quantification of Lb-NO complexes in bean nodules.

For quantification of the percentage of Lb bound to NO within nodules, Lb extracts were prepared as reported previously (Meakin et al. 2007). Fresh nodules (0.3 g) were crushed in 4 ml of Lb extraction buffer (40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 7.4), 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, pH 7.4, 0.02% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.1% NaHCO<sub>3</sub>) and were centrifuged at 12,000 × g at 4°C for 20 min. The supernatant was collected and used for assays. Absorption spectra from 300 to 700 nm at 25°C were obtained from 1 ml of reduced and nitrosylated nodule extracts, using a Beckman DU 650 spectrophotometer. Absorption measurements were taken from the spectra to allow quantification of the nodular Lb-NO, following the protocol previously described by Meakin and associates (2007).

### Measurement of NO production and consumption.

NO production and consumption in free-living cells was measured amperometrically using a NO electrode (Apollo 4000; World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, U.S.A.) in a water-jacketed and magnetically stirred (30°C) chamber. The membrane-covered electrode was situated at the bottom of the chamber, above the stirrer. For experimental assays, the chamber was filled to 2 ml with 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) and the cell suspension (0.2 to 0.3 mg of protein for NO production and 4 to 5 mg of protein for NO consumption). Oxygen present in the chamber was removed by incubating the cells for 5 min with glucose oxidase (to 4 U/ml), catalase (to 20 U/ml), sodium succinate (to 35 mM), and glucose (to 16 mM). To determine NO production by the cells, 30 µl of 50-mM NaNO<sub>2</sub> were added with a Hamilton syringe, and NO production was analyzed by adding 100 µl of a saturated NO solution (1.91 mM).

### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to J. Mora and E. Bedmar for their support and stimulating discussions and to D. Romero and M. Dunn for critical review of the manuscript. We also thank J. Martínez-Salazar and M. Á. Ramírez-Romero for useful scientific advice, A. Leija for skillful technical assistance, O. Castillo and I. Rodríguez for help with greenhouse experiments, and P. Gaytán and E. López for oligonucleotide synthesis. Partial financial support for this research was provided by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (grants IN201406 and IN202109) and by UNAM-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-CSIC (89537) cooperation agreements. N. Gómez-Hernández was supported during the Ph.D. program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by a scholarship from CONACYT (México).

### LITERATURE CITED

Baek, S. H., and Shapleigh, J. P. 2005. Expression of nitrite and nitric oxide reductases in free-living and plant-associated *Agrobacterium tumefaciens* C58 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4427-4436.

Baek, S. H., Hartsock, A., Shapleigh, J. P. 2008. *Agrobacterium tumefaciens* C58 uses ActR and FnrN to control *nirK* and *nor* expression. *J. Bacteriol.* 190:78-86.

Baudouin, E., Pieuchot, L., Engler, G., Pauly, N., Puppo, A. 2006. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19:970-975.

Becker, A., Bergès, H., Krol, E., Bruand, C., Rüberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F., de Bruijn, F. J., Fourment, J., Francez-Charlot, A., Kahn, D., Küster, H., Liebe, C., Pühler, A., Weidner, S., Batut, J. 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 17:292-303.

Bedmar, E. J., Robles, E. F., and Delgado, M. J. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* 33:141-144.

Besson-Bard, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:21-39.

Better, M., and Helinski, D. P. 1983. Isolation and characterization of a *recA* gene of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 115:311-316.

Bravo, A., and Mora, J. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170:980-984.

Brown, G. C., and Cooper, C. E. 1994. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 356:295-298.

Bueno, E., Gómez-Hernández, N., Girard, L., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. 2005. Function of the *Rhizobium etli* CFN42 *nirK* gene in nitrite metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 35:166-167.

Bueno, E., Mesa, S., Sanchez, C., Bedmar, E. J., Delgado, M. J. 2010. NifA is required for maximal expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environ. Microbiol.* 12:393-400.

Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M. L., Rodrigo, J., Lamas, S., Golvano, M. P. 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 398:159-164.

de Vries, S., Pouvreau, S., and Pouvreau L. A. M. 2007. Nitric oxide reductase: Structural variations and catalytic mechanism. Pages 57-66 in: *Biology of the Nitrogen Cycle*. H.Bothe, S. J. Ferguson, and W. E. Newton, eds. Elsevier, Amsterdam.

Delgado, M. J., Bonnard, N., Tresierra-Ayala, A., Bedmar, E. J., and Müller, P. 2003. The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology* 149:3395-3403.

Ferrarini, A., De Stefano, M., Baudouin, E., Pucciariello, C., Polverari, A., Puppo, A., and Delledonne, M. 2008. Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:781-790.

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.* 76:1648-1652.

Girard, L., Valderrama, B., Palacios, R., Romero, D., and Dávila, G. 1996. Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions. *Microbiology* 142:2847-2856.

Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M., and Romero, D. 2000. Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1283-1292.

González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Chandra Janga, S., Ramírez, M. A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J., and Dávila, G. 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:3834-3839.

Granados-Baeza, M. J., Gómez-Hernández, N., Mora, Y., Delgado, M. J., Romero, D., and Girard, L. 2007. Novel reiterated Fnr-type proteins control the production of the symbiotic terminal oxidase *cbb3* in *Rhizobium etli* CFN42. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:1241-1249.

Green, J., Scott, C., and Guest, J. R. 2001. Functional Versatility in the CRP-FNR Superfamily of Transcription Factors: FNR and FLP. *Adv. Microb. Physiol.* 44:1-34.

Hartsock, A., and Shapleigh, J. P. 2010. Identification, functional studies, and genomic comparisons of new members of the NnrR regulon in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 192:903-911.

Hendriks, J., Oubrie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S., and Saraste, M. 2000. Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1459:266-273.

Holloway, P., McCormick, W., Watson, R.J. and Chan, Y. K. 1996. Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 178:1505-1514.

Hynes, M. F., and McGregor, N. F. 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4:567-574.

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.* 187:1135-1160.

Kato, K., Kanahama, K., and Kanayama, Y. 2010. Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in *Lotus* root nodules. *J. Plant. Physiol.* 167:238-241.

Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D., and Trollinger, D. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* 70:191-197.

- Kiley, P. J., and Beinert, H. 1999. Oxygen sensing by the global regulator, FNR: The role of the iron-sulfur cluster. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Rev.* 22:341-352.
- Kiley, P. J., and Beinert, H. 2003. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:181-185.
- Körner, 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 (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Rev.* 27:559-592.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop II, R. M., and Peterson, K. M. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175-176.
- Martínez-Salazar, J. M., and Romero, D. 2000. Role of the *ruvB* gene in homologous and homeologous recombination in *Rhizobium etli*. *Gene* 243:125-131.
- Mathieu, C., Moreau, S., Frendo, P., Puppo, A., and Davies, M. J. 1998. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: Presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free. Radic. Biol. Med.* 24:1242-1249.
- Mesa, S., Bedmar, E. J., Chanfon, A., Hennecke, H., and Fischer, H. M. 2003. *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK2 regulatory cascade. *J. Bacteriol.* 185:3978-3982.
- Meakin, G. E., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E. J., Richardson, D. J., and Delgado, M. J. 2007. The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology* 153:411-419.
- Metcalf, W. W., Jiang, W., Daniels, L. L., Kim, S. K., Haldimann, A., and Wanner, B. L. 1996. Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying *lacZα* for cloning, mutagenesis, and allele replacement in bacteria. *Plasmid* 35:1-13.
- Meyer, C., Lea, U. S., Provan, F., Kaiser, W. M., and Lillo, C. 2005. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosyn. Res.* 83:181-189.
- Nagata, M., Murakami, E.-i., Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K.-i., Suzuki, A., Abe, M., Higashi, S., and Uchiyumi, T. 2008. Expression of a class I hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:1175-1183.
- Noel, K. D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., and Cevallos, M. A. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
- Peralta, H., Mora, Y., Salazar, E., Encarnación, S., Palacios, R., and Mora, J. 2004. Engineering the *nifH* promoter region and abolishing poly-β-hydroxybutyrate accumulation in *Rhizobium etli* enhance nitrogen fixation in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3272-3281.
- Philippot, L. 2002 Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1577:355-376.
- Pii, Y., Crimi, M., Cremonese, G., Spena, A., and Pandolfini, T. 2007. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol.* 7:21.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G., and Palacios, R. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature* 299:724-726.
- Quandt, J., and Hynes, M. F. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 127:15-21.
- Robles, E. F., Sánchez, C., Bonnard, N., Delgado, M. J., and Bedmar, E. J. 2006. The *Bradyrhizobium japonicum* *napEDABC* genes are controlled by the FixLJ-FixK(2)-NnrR regulatory cascade. *Biochem. Soc. Trans.* 34(Pt 1):108-110.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Sánchez, C., Gates, A. J., Meakin, G. E., Uchiyumi, T., Girard, L., Richardson, D. J., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. 2010. Production of nitric oxide and nitrosylleghemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:702-711.
- Sasakura, F., Uchiyumi, T., Shimoda, Y., Suzuki, A., Takenouchi, K., Higashi, S., and Abe, M. 2006. A class I hemoglobin gene from *Alnus firma* functions in symbiotic and nonsymbiotic tissues to detoxify nitric oxide. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:441-450.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Puhler, A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73.
- Shapleigh, J. P. 2006. The denitrifying prokaryotes. Pages 769-792 in: *Prokaryotes*. Vol. 2. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. Springer, New York.
- Shimoda, Y., Nagata, M., Suzuki, A., Abe, M., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Higashi, S., and Uchiyumi, T. 2005. Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant. Cell. Physiol.* 46:99-107.
- Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K., Kanamori, N., Nagata, M., Suzuki, A., Abe, M., Higashi, S., and Uchiyumi, T. 2009. Overexpression of class I plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant J.* 57:254-63.
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W. R., and Rockel, P. 2001. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212:835-841.
- Tate, R., Riccio, A., Iaccarino, M., and Patriarca, E. J. 1997. A *cysG* mutant strain of *Rhizobium etli* pleiotropically defective in sulfate and nitrate assimilation. *J. Bacteriol.* 179:7343-7350.
- Toffanin, A., Wu, Q., Maskus, M., Caselia, S., Abruna, H. D., and Shapleigh, J. P. 1996. Characterization of the gene encoding nitrite reductase and the physiological consequences of its expression in the nondenitrifying *Rhizobium "hedysari"* strain HCNT1. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4019-4025.
- Tosques, I. E., Kwiatkowski, A. V., Shi, J., and Shapleigh, J. P. 1997. Characterization and regulation of the gene encoding nitrite reductase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J. Bacteriol.* 179:1090-1095.
- Trinchant, J. C., and Rigaud, J. 1982. Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1385-1388.
- van Spanning, R. J., Delgado, M. J., and Richardson, D. J. 2005. The nitrogen cycle: Denitrification and its relationship to N<sub>2</sub> fixation. Pages 277-342 in: *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment*. D. Werner and W. E. Newton, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- van Spanning, R. J., Richardson, D. J., and Ferguson, S. J. 2007. Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. Pages 3-20 in: *Biology of the Nitrogen Cycle*. H. Bothe, S. J. Ferguson, and W. E. Newton, eds. Elsevier, Amsterdam.
- Wang, H., Tseng, C. P., and Gunsalus, R. P. 1999. The *napF* and *narG* nitrate reductase operons in *Escherichia coli* are differentially expressed in response to submicromolar concentrations of nitrate but not nitrite. *J. Bacteriol.* 181:5303-5308.
- Weinstein, M., Roberts, R. C., and Helinski, D. R. 1992. A region of the broad-host-range plasmid RK2 causes stable in planta inheritance of plasmids in *Rhizobium meliloti* cells isolated from alfalfa root nodules. *J. Bacteriol.* 174:7486-7489.
- Wing, H. J., Williams, S. M., and Busby, S. J. 1995. Spacing requirements for transcription activation by *Escherichia coli* FNR protein. *J. Bacteriol.* 177:6704-6710.
- Zumft, W. G. 2002. Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4:277-286.
- Zumft, W. G. 2005. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J. Inorg. Biochem.* 99:194-215.
- Zumft, W. G., and Korner, H. 1997. Enzyme diversity and mosaic gene organization in denitrification. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71:43-58

## AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCE

Kazusa DNA Research Institute Rhizobase database:  
[bacteria.kazusa.or.jp/rhizobase](http://bacteria.kazusa.or.jp/rhizobase)



## RESULTADOS ADICIONALES.

En virtud de que la mayor parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de investigación, se reportaron en el artículo **Nicolás Gómez-Hernández**, Alma Reyes-González, Cristina Sánchez, Yolanda Mora, María J. Delgado, y Lourdes Girard. 2011. “Regulation and symbiotic role of *nirK* and *norC* expression in *Rhizobium etli*”. Molecular Plant-Microbe Interactions. 24 (2): 233-245, a continuación se describirán algunos resultados adicionales relevantes.

En el plásmido pRet42f de *R. etli* CFN42, se encuentra una región de 20 Kpb en la cual están codificados genes relacionados con el proceso de desnitrificación, dentro de este grupo de genes encontramos, entre otros, a *norCB*, *nirK* y a *azuPf*. Los genes *norCB* y *nirK* codifican para la óxido nítrico reductasa y para la nitrito reductasa respectivamente, mientras que *azuPf* codifica para una pseudoazurina cuya función es la de proveer de electrones a la nitrito reductasa tipo cobre codificada por *nirK*; cabe mencionar que en el plásmido pRet42d de *R. etli* se encuentra una reiteración del gen *azuPf* anotado como *azuPd* (González et. al., 2006). En la región reguladora de todos estos genes, identificamos motivos de ADN conocidos como cajas de anaerobiosis que son reconocidos por reguladores transcripcionales tipo FNR. En el plásmido pRet42f y río abajo de *norCB* se encuentran los genes *norQ* y *norD* estos últimos genes codifican para proteínas encargadas del ensamblaje de la proteína NorC. Río abajo de *nirK* se encuentran los genes *nirV*, *nnrR* y *nnrU*; *nnrR* codifica para un factor transcripcional tipo FNR encargado de regular genes de desnitrificación en respuesta a óxidos de nitrógeno. Aún no se ha establecido la función fisiológica de NirV ni de NnrU. El arreglo genómico y el tamaño de las regiones intergénicas de cada uno de los genes río abajo de *norC* y *nirK* sugieren que tanto *norCB* como *nirK* están formando parte de operones con sus genes vecinos, dichos operones estarían constituidos por los genes *norCBQD* y *nirKnirVnnrRnnrU* respectivamente.

Con el fin de caracterizar genética y funcionalmente los genes *nirK* y *norC* de *R. etli*, se construyeron mutantes en los genes *nirK*, *norC*, *azuPd*, *azuPf* y *nnrR* mediante interrupción con un interposón.

Mediante experimentos de RT-PCR, se determinó que la mutación en el gene *nirK* tiene un efecto polar sobre *nnrR*, lo que comprueba que estos genes forman una unidad transcripcional. Por 5'RACE determinamos el inicio de transcripción de tanto de *nirK* como de *norC*.

Con el objetivo de analizar los patrones de expresión de los genes de interés en distintas condiciones medioambientales, se construyeron fusiones transcripcionales de los genes *nirK*, *norC*, *azuPd* y *azuPf* con el gen reportero *uidA*, el cual codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa. Los resultados obtenidos mediante estas fusiones transcripcionales nos dicen que el gen *azuPf* es regulado por NnrR mientras que el gen *azuPd* se expresa constitutivamente en condiciones microaeróbicas.

Como parte del análisis fenotípico en vida libre, se evaluó la capacidad de crecimiento en aerobiosis (20% de O<sub>2</sub>) y microaerobiosis (1% de O<sub>2</sub>) de las cepas silvestre, *nirK*, *norC* y *nnrR* en presencia de compuestos generadores de especies reactivas de nitrógeno tales como el nitrato (10 mM), nitrito (1 mM) y nitroprusiato de sodio (0.1 mM) (SNP, liberador de óxido nítrico). De igual forma, se analizó el patrón de crecimiento en estas mismas condiciones de las cepas mutantes en *azuPd* y *azuPf*, la mutación de los genes que codifican para las pseudoazurinas no afecta de forma significativa al crecimiento aeróbico o microaeróbico en presencia o ausencia de óxidos de nitrógeno.

Las cepas silvestre y mutantes en *nirK*, *norC* y *nnrR*, crecen de manera similar, tanto en condiciones aeróbicas como en condiciones de limitación de oxígeno. Sin embargo, la mutación de estos genes afecta el crecimiento microaeróbico y anaeróbico cuando al medio de cultivo se le adiciona algún óxido de nitrógeno como el nitrito o algún generador de óxidos de nitrógeno como el SNP.

Un dato importante es que la mutación tanto del gen *nirK* como del gen *nnrR* afectan la actividad de nitrito reductasa en vida libre, este es el resultado esperado para una cepa mutante en *nirK* dado que este gen codifica para la enzima encargada de reducir el nitrito a óxido nítrico, sin embargo, la actividad de nitrito reductasa no debería estar disminuida en una mutante *nnrR* dado que este gen está río abajo en el

operón *nirK*; esto sugiere que NnrR es indispensable para activar genes necesarios para la actividad de nitrito reductasa en *R. etli*.

En simbiosis, nuestros experimentos de inoculación de semillas de frijol con las cepas de *R. etli* silvestre y mutantes en *nirK* y *norC*, muestran que la capacidad de fijar nitrógeno no se ve afectada cuando las plantas no se someten a ningún tipo de estrés, sin embargo, la actividad de nitrogenasa se afecta de forma considerable en la cepa silvestre y en la cepa mutante en *norC* cuando las plantas inoculadas se cultivan en presencia de  $\text{KNO}_3$  a una concentración de 4 mM; cabe mencionar que en la mutante *nirK* no se afecta la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en estas mismas condiciones. La disminución en la actividad específica de nitrogenasa en las cepas silvestre y mutante en *norC* pudiera deberse a la acumulación de óxido nítrico en el nódulo en presencia de nitrato, esta acumulación de NO en el nódulo no se observa en una mutante *nirK*, al no producirse NO en exceso, el daño a la leghemoglobina o a la nitrogenasa son menores por lo cual, no observamos una disminución de la fijación de nitrógeno en una cepa NirK<sup>-</sup>.

Dado que NnrR es indispensable para la actividad de nitrito reductasa en *R. etli*, nos propusimos identificar posibles blancos de regulación de este factor transcripcional adicionales a *nirK*, *norC* y *azuPf*. Esto último con el objetivo de identificar genes cuyo producto pudiera participar en la reducción del nitrito. Para ello, llevamos a cabo un análisis global de la expresión microaeróbica de *R. etli* por medio de experimentos de microarreglos. Cultivos microaeróbicos en presencia de  $\text{KNO}_2$  1 mM de las cepas silvestre y mutante *nnrR* en microaerobiosis fueron utilizados para purificar ARN total. .

Los resultados obtenidos mediante microarreglos indican que NnrR regula mayoritariamente a sus genes blanco de forma positiva. Nuestro análisis muestra 39 genes expresados diferencialmente en la cepa silvestre respecto a la cepa mutante, esto es, disminuyen su expresión en un fondo *nnrR*<sup>-</sup>. Por lo tanto, concluimos que este factor transcripcional regula directa o indirectamente sus genes blanco de forma positiva (Tabla 1). De estos 39 genes, el 23 % (11 genes) contienen al menos una caja de anaerobiosis en su región promotora, lo que sugiere una participación directa por parte de NnrR, no obstante que la gran mayoría de genes no cuenta con caja de anaerobiosis en su región promotora, estos genes si están siendo afectados por la mutación en *nnrR*

dado que los encontramos reprimidos en la mutante. Es importante hacer notar que el 48.7% de los genes identificados, no tienen función asignada y las proteínas que codifican entran en la categoría de hipotéticas conservadas o probables. De los genes con función asignada 12 de ellos están directamente relacionados con la desnitrificación, 2 están implicados en la síntesis de flagelo, 2 genes están relacionados con la síntesis de sulfolípidos; y 2 mas se requieren para la conjugación.

Tabla 1. Regulón NnrR

	<b>GENE ID</b>	<b>Función</b>	<b>ANB 1</b>	<b>Z score</b>	<b>Veces de cambio</b>
1	RHE_CH00329-ypch00125	Putativa acetiltransferasa	<b>Ninguna</b>	-1.4097	-1.44
2	RHE_CH00547-ypch00199	Regulador transcripcional Putativo	<b>Ninguna</b>	-2.8157	-2.92
3	RHE_CH00659-flgC	Cuerpo basal del flagelo	<b>Ninguna</b>	-1.6458	-1.60
4	RHE_CH01132-cysH	Fosfoadenosina-fosfosulfato reductasa (cysH)	<b>Ninguna</b>	-2.2160	-1.75
5	RHE_CH02986-ypch01047	Probable transportador de azucar tipo ABC.	<b>Ninguna</b>	-2.3748	-5.64
6	RHE_CH03035-aptch	Adenina Fosforribosiltransferasa	<b>Ninguna</b>	-2.1724	-1.87
7	RHE_CH03100-oppF	Transportador de oligopéptidos tipo ABC	<b>Ninguna</b>	-2.2234	-1.88
8	RHE_CH03469-sqdD	Glicosiltransferasa (Biosíntesis de sulfolípidos)	<b>Ninguna</b>	-3.3045	-2.92
9	RHE_CH03470-sqdC	Biosíntesis de sulfolípidos	<b>Ninguna</b>	-0.7461	-1.25
10	RHE_PA00103-yia00035	Secuencia de inserción Transposasa Putativa	<b>Ninguna</b>	-2.7903	-2.82
11	RHE_PA00174-trbJ	Conjugación – Transferencia	<b>Ninguna</b>	-2.1735	-2.18

12	RHE_PA00177-trbC	Conjugación – Transferencia	<b>Ninguna</b>	-2.0815	-1.83
13	RHE_PD00014-yhd00009	Hipotética conservada	<b>Ninguna</b>	-2.5914	-3.00
14	RHE_PD00073-yhd00037	Hipotética	<b>Ninguna</b>	-2.9688	-2.79
15	RHE_PD00254-yi04b- I00036	Hipotética	<b>Ninguna</b>	-2.6794	-3.38
16	RHE_PD00255-yi0500037	Secuencia de inserción Probable transposasa	<b>Ninguna</b>	-2.9125	-2.50
17	RHE_PE00092-ype00035	Probable transportador tipo ABC (permeasa).	<b>Ninguna</b>	-1.6542	-1.79
18	RHE_PFO0343-ypf00173	Putativa L- fuculosa-fosfato aldolasa	<b>Ninguna</b>	-1.8610	-1.62
19	RHE_PFO0419-yhf00126	Hipotética conservada	<b>Ninguna</b>	-1.6640	-1.87
20	RHE_PFO0433-ypf00230	Regulador transcripcional Putativo. Familia MerR	<b>Ninguna</b>	-2.2568	-2.61
21	RHE_PFO0468-fhuF	Reductasa de fierro	<b>Ninguna</b>	-3.0190	-4.18
22	RHE_PD00298-azuPd	Pseudoazurina de cobre	<b>gaatttgacggcgcaagag</b>	-2.5779	-2.79
23	RHE_PD00337-yhd00113	Hipotética	<b>agaattgatcaggacaacgtt</b>	-1.6025	-1.48
24	RHE_PFO0172-flgKf	Flagelo	<b>gaccttgcagegcaacgtc</b>	-2.3687	-1.87
25	RHE_PFO0510-azuPf	Pseudoazurina de cobre	<b>gagtttgacggcgcaagaa</b>	-1.9847	-2.35
26	RHE_PFO0514-norE	Óxido nítrico reductasa	<b>ctctttgcgatcggtcaagag</b>	-2.8618	-4.79
27	RHE_PFO0515-norC	Óxido nítrico reductasa	<b>gtctttgcaattaacaagaa</b>	-4.2186	-8.08
28	RHE_PFO0516-norB	Nitric oxide reductase		-0.9749	-1.58
29	RHE_PFO0517-norQ	Óxido nítrico reductasa		-4.3579	-14.10
30	RHE_PFO0518-norD	Óxido nítrico reductasa		-2.4869	-2.58
31	RHE_PFO0520-yhf00150	Hipotética conservada	<b>atattgtccgctgcaagtc</b> <b>ttccttgccecaaatcaatgat</b>	-0.9714	-3.04
32	RHE_PFO0521-yhf00151	Hipotética conservada		-1.6879	-2.25
33	RHE_PFO0522-yhf00152	Hipotética conservada		-2.1509	-3.38
34	RHE_PFO0523-yhf00153	Hipotética		-1.4468	-2.30

		conservada			
35	RHE_PF00524-yhf00154	Hipotética conservada	<b>atctttgcgtaatctcaacgac</b>	-1.5584	-3.06
36	RHE_PF00525-nirK	Nitrito reductasa	<b>cagtttgcccacgtcaaagat</b> <b>aactttgtccggcacaacag</b>	0.7459	-0.81
37	RHE_PF00526-nirV	Metabolismo del nitrito		-3.3172	-3.88
38	RHE_PF00527-nnrR	Regulador transcripcional Familia CRP/FNR		-2.1308	-2.15
39	RHE_PF00528-nnrU	Probable regulador de la desnitrificación		-2.6595	-2.31

A pesar de que los resultados del microarreglo no han sido validados por experimentos de qRT-PCR, podemos sugerir que el regulón de NnrR en *R. etli* está formado por 39 genes ya que el análisis de expresión realizado en blancos de regulación de NnrR mediante fusiones transcripcionales y reportado en el artículo “Regulation and symbiotic role of *nirK* and *norC* expression in *Rhizobium etli*”, es altamente coincidente con los datos obtenidos mediante microarreglos.

En base a las cajas de anaerobiosis identificadas en la región promotora de los genes regulados por NnrR, se realizó un consenso y se elaboró el “logo” de la caja de anaerobiosis que reconoce NnrR utilizando el programa “WEBLOGO” Figura 4 (Crooks, et. al. 2004), este programa nos permite tener una representación gráfica del alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos; en nuestro caso, se alinearon cajas de anaerobiosis localizadas en la región promotora de los genes regulados por NnrR, el tamaño de las letras en el “logo” representa el nivel de conservación de ese nucleótido en esa posición específica.

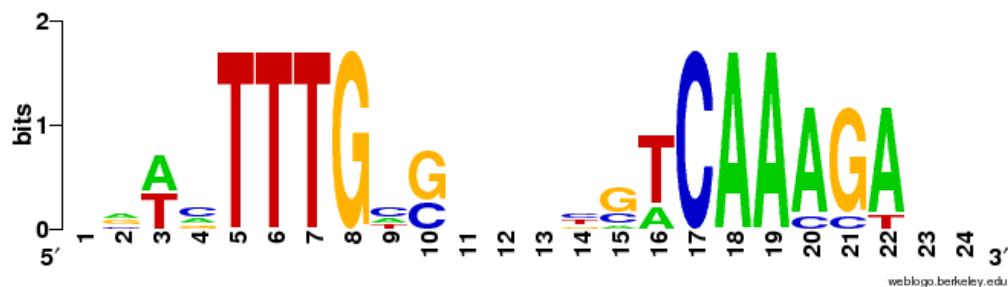


Figura 4. Probable anaerobox reconocida por NnrR de *R. etli* CFN42

La distancia promedio a la que se encuentran las posibles cajas de anaerobiosis reconocidas por NnrR en *R. etli* es de 92 nucleótidos río arriba del ATG (Tabla 2) lo que hace factible una regulación mediada por un factor transcripcional tipo FNR como lo es NnrR.

Tabla 2. Distancia del anaerobox al ATG de los genes regulados por NnrR

Gene ID	Distancia al ATG
RHE_PD00337	-8
<i>norE</i>	-45
RHE_PF00524	-56
<i>azuPd</i>	-73
<i>azuPf</i>	-73
<i>nirK</i>	-79
	-102
<i>norC</i>	-97
RHE_PF00520	-99
	-146
<i>flgKf</i>	-233

Es importante hacer notar que los genes relacionados con la desnitrificación en *R. etli* se encuentran agrupados dentro de una misma región en el plásmido pRet42f (Figura 5); el gen *nnrR* está inmerso en esta región de “desnitrificación/detoxificación” lo que sigiere una participación activa de NnrR en la regulación de estos genes.

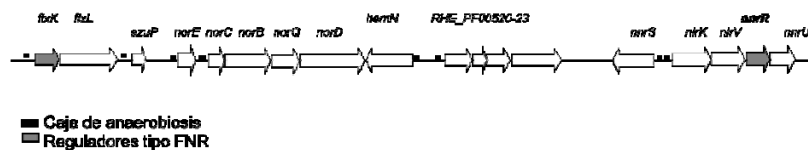


Figura 5. Organización estructural de la región de desnitrificación/detoxificación en el plásmido pRet42f.

Como parte de la caracterización de la región promotora de *nirK* y *norC*, identificamos el +1 de estos genes; mediante 5'RACE determinamos que inician su transcripción en promedio a 43 nucleótidos río abajo de la caja de anaerobiosis, dado que estos genes se regulan por NnrR, sugerimos que este factor transcripcional es un regulador FNR del tipo II. Sería interesante mapear el inicio de la transcripción de los otros 7 genes del regulón NnrR que cuentan con caja de anaerobiosis para corroborar esta hipótesis.

En *S. meliloti*, se ha propuesto que el regulador NnrR reconoce una caja de anaerobiosis “extendida” cuyo consenso es: TTTG-N<sub>8</sub>-CAAA (Meilhoc et. al., 2010). En el caso de *R. etli*; 7 de las 11 cajas de anaerobiosis del regulón NnrR cuentan con ese consenso. Sería interesante establecer la importancia de estas cajas extendidas para el reconocimiento o pegado por parte de NnrR.

## CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Una parte importante del ciclo del nitrógeno la constituye la desnitrificación, este es un proceso por medio del cual se puede obtener energía al acoplar la reducción de los óxidos de nitrógeno como el nitrato o el nitrito a la síntesis de ATP; sin embargo, durante este proceso se generan especies reactivas de nitrógeno (ERN) que resultan tóxicas para el organismo desnitrificante, para protegerse de estas moléculas, los organismos cuentan con los mecanismos necesarios para combatir los efectos tóxicos de estas ERN. Nuestro modelo de estudio, *R. etli* CFN42, no es un verdadero desnitrificante dado que no es capaz de crecer en condiciones de desnitrificación (anaerobiosis con nitrato como aceptor de electrones). Además de esto, en el genoma no están anotadas ni la nitrato reductasa ni la óxido nitroso reductasa que completarían la vía de desnitrificación. Esto es, en *R. etli* además de que no identificamos ningún gen que codifique para la nitrato reductasa, no pudimos determinar la actividad de esta enzima en ninguna de las condiciones probadas (anaerobiosis mas nitrato 10 mM ó 1% de oxígeno mas nitrato 10 mM). En el genoma de *R. etli* tampoco está anotado ningún gen que codifique para una óxido nitroso reductasa, en este punto, nos falta hacer un análisis de consumo de óxido nitroso o cuantificar la producción de nitrógeno molecular para demostrar la no reducción de óxido nitroso a N<sub>2</sub>. No obstante la falta de la primera y la última de las enzimas de la vía de desnitrificación, este organismo cuenta con las



enzimas intermedias del proceso; la nitrito reductasa tipo cobre y la óxido nítrico reductasa tipo *c* y las proteínas accesorias que les permiten a estas reductasas llevar a cabo su función. Ejemplo de estas proteínas accesorias las tenemos en las pseudoazurinas codificadas por los genes *azuP* localizados en los plásmidos pRet42d y pRet42f de la cepa.

En este trabajo demostramos que la nitrito reductasa de *R. etli* es funcional en microaerobiosis, microaerobiosis mas nitrito, en simbiosis y en simbiosis mas nitrito. Además de estas condiciones, pudimos detectar actividad de nitrito reductasa en anaerobiosis en presencia de nitrito. La reducción de nitrito condiciones anaeróbicas es muy baja, sin embargo, dicha actividad si puede cuantificarse. La baja actividad de nitrito reductasa en anaerobiosis en presencia de nitrito correlaciona con la poca respiración y crecimiento de la cepa en esas mismas condiciones (Anaerobiosis en presencia de nitrito 1 mM como aceptor de electrones).

En condiciones microaeróbicas, la nitrito reductasa reduce el nitrito a óxido nítrico de forma bastante eficiente (35 nmol de NO<sub>2</sub> por mg de proteína por hora) dando como resultado óxido nítrico potencialmente tóxico si este último gas se produce en exceso y se acumula; sin embargo, esta molécula es reducida por la óxido nítrico reductasa disminuyendo así su efectos tóxicos, el gen que codifica para la óxido nítrico reductasa de *R. etli* se transcribe cuando la bacteria se encuentra en presencia de óxido nítrico, al traducirse el mensajero se tiene una proteína activa, la presencia de la óxido nítrico reductasa evita que el NO se acumule en las células.

Durante la simbiosis planta-bacteria, se produce óxido nítrico en los nódulos, tanto la planta como el simbiote contribuyen a la formación de esta molécula. En el caso de organismos fijadores de nitrógeno que pueden llevar a cabo la desnitrificación, se ha visto que se reduce significativamente la fijación de nitrógeno cuando el proceso simbiótico se lleva a cabo en condiciones desnitrificantes, tal es el caso de *B. japonicum* (Mathieu, et. al. 1998; Sánchez, et. al. 2010), en el caso de *R. etli*, sabemos que la nitrito reductasa codificada por *nirK* contribuye de forma importante a la formación de óxido nítrico durante la simbiosis en presencia de nitrato. También sabemos que la óxido nítrico reductasa es funcional en estas condiciones y que participa en la destoxicación del óxido nítrico producido por la nitrito reductasa.

Interesantemente, en nódulos de plantas inoculadas con la cepa mutante en *nirK* se producen en promedio 25% menos complejos nitrosil-leghemoglobina que los que se forman en los nódulos de plantas inoculadas con la mutante en *norC* o con la cepa silvestre en las mismas condiciones desnitrificantes ( $\text{NO}_3$  0.4 mM), esto se explica por la acumulación del óxido nítrico en la cepa mutante en *norC*. El aumento de NO en el nódulo en estas condiciones, provoca la inactivación de la leghemoglobina simbiótica ya que el NO se une a esta enzima. En la cepa mutante en *nirK*, no se produce óxido nítrico en concentraciones altas dado que aquí no hay reducción de nitrito; al no producirse NO por la falta de la actividad NiR, no se forman tantos complejos nitrosil-leghemoglobina como los que se forman en la cepa silvestre y mutante en *norC*. Cabe hacer notar que aún en los nódulos de plantas inoculadas con la cepa NirK<sup>-</sup>, se forman complejos Lb-NO, En este caso, la fuente del NO pudiera ser la misma planta ya que Estos organismos cuentan con nitrato reductasas que pudiera ser activas en estas condiciones (Dean y Harper, 1998; Rockel et. al., 2002). Además de la presencia de nitrato reductasas productoras de NO, se ha propuesto que las plantas pueden sintetizar óxido nítrico a través de proteínas tipo NO sintasas (Corpas et. al., 2009), poiamino oxidasas (Yamasaki y Cohen, 2006) y nitrito-NO reductasas (Stohr y Stremlau, 2006).

Los datos de producción y acumulación de NO, así como la formación de complejos Lb-NO en las mutantes de la nitrito y óxido nítrico reductasas así como en la cepa silvestre, están correlacionados con la actividad específica de nitrogenasa cuando la planta se cultiva en presencia de nitrato. La actividad de nitrogenasa se ve fuertemente afectada en la cepa silvestre y en la cepa mutante en *norC* mientras que en la mutante *nirK*, dicha actividad no se afecta significativamente. Interesantemente, en la cepa silvestre y en la mutante en *norC* es donde mas se observa acumulación de óxido nítrico y formación de complejos Lb-NO cuando las plantas se cultivan en presencia de nitrato.

En base a nuestros resultados de consumo de óxido nítrico en la cepa silvestre de *R. etli*, y acumulación de NO en la cepa silvestre y en la mutante *norC*, podemos concluir que la óxido nítrico reductasa de este organismo, aunque funcional, no es lo bastante eficiente para contender contra el NO; dado que NirK reduce el nitrito a óxido nítrico y que esta actividad se ve aumentada cuando en el medio se encuentran óxidos de nitrógeno (nitratos, nitritos y óxido nítrico), la regulación de los genes de

desnitrificación de *R. etli* debe estar sujeta a un balance muy fino para no dañar a la bacteria cuando esta se enfrenta a nitrito ya sea en vida libre o en simbiosis.

En Rhizobiales, la regulación de la fijación de nitrógeno se lleva a cabo principalmente por reguladores pertenecientes a la familia CRP/FNR como FixK y NnrR; sin embargo, también se ha visto la participación de reguladores que no pertenecen a esta familia como es el caso de NifA en *B. japonicum* y el sistema de dos componentes ActS-ActR en *Agrobacterium tumefaciens*. En *B. japonicum* se requiere de NifA para obtener la máxima expresión de los genes de desnitrificación (Bueno, et. al. 2010). En *A. tumefaciens* se requiere de ActR además de FnrR para regular la expresión de *nirK* y *norC* (Baek, et. al. 2008). En nuestro modelo de estudio, el factor transcripcional NifA regula negativamente a la nitrito reductasa. Actualmente se está investigando el papel regulatorio del sistema de dos componentes ActS/R sobre los genes de desnitrificación de *R. etli*.

En este trabajo demostramos que la expresión de los genes *nirK* y *norC* en *R. etli* es regulada por la concentración de oxígeno y la presencia de óxidos de nitrógeno. Esta expresión es mediada por proteínas de la familia Crp/Fnr (FixK y NnrR). Sin embargo, en *R. etli* encontramos diferencias significativas en cuanto a la forma en que se regulan *nirK* y *norC* en otros Rizobiales, por ejemplo, en *A. tumefaciens*, se requiere de NnrR para expresar tanto a *nirK* como a *norC*. En *R. etli*, *nirK* y *norC* dependen diferencialmente de NnrR, el activador transcripcional del gen *norC* en condiciones microaeróbicas en presencia y ausencia de óxido nítrico es NnrR a través de FixK mientras que la expresión microaeróbica de *nirK* es debida a FixK y la inducción por óxido nítrico es mediada por NnrR. Este tipo de regulación es bastante elegante, mediante este sistema la célula expresa el gen *norC* solo cuando en el medio ambiente se encuentra óxido nítrico. Podemos sugerir que el arreglo en el mismo operón de *nirK* y *nnrR*, le permite a la célula asegurar la expresión de *nnrR* y por lo tanto de *norC* si y solo si *nirK* se expresa.

En cuanto a los blancos de regulación de NnrR, los datos de microarreglos sugieren que NnrR es un regulador específico del proceso de desnitrificación dado que regula un número muy pequeño de genes (39 genes) en su mayoría relacionados con la reducción de óxidos de nitrógeno.

En resumen, nuestros datos sugieren que, tanto la nitrito reductasa codificada en el operón *nirK**nirV**nnrR**nnrU* así como la óxido nítrico reductasa codificada en el operón *norCBQD* en *R. etli* tienen un papel clave tanto en la destoxificación de óxidos de nitrógeno, tanto en vida libre como en simbiosis.

## **PERSPECTIVAS**

Dado que los genes *nirK* y *norC* participan en procesos de destoxificación de especies reactivas de nitrógeno en *R. etli*, sería interesante analizar que papel tiene la expresión de estos genes en etapas tempranas de la simbiosis, etapas en la que se ha sugerido que la planta produce óxido nítrico como un mecanismo de defensa contra la invasión por patógenos. Para ello, es necesario comparar la capacidad de la cepa silvestre de *R. etli* con las mutantes *nirK* y *norC* para infectar las raíces de las plantas de frijol.

No solo se ha detectado la presencia de NO en etapas tempranas de la simbiosis sino que también se ha cuantificado el óxido nítrico en las raíces y en el nódulo durante el todo el proceso simbiótico *Phaseolus-Rhizobium*, especialmente en la senescencia del nódulo, habría que cuantificar el efecto que tienen las mutaciones en *nirK* y *norC* en la cinética de nodulación para entender mejor este proceso tan complejo.

Durante el desarrollo del trabajo de tesis, identificamos varios niveles de regulación para el gen *nirK*, así como la participación de distintos reguladores transcripcionales tales como FixK, NnrR y NifA. A pesar de que nuestros resultados han contribuido al entendimiento de como se lleva a cabo el control transcripcional de *nirK*, aún se debe definir el orden jerárquico que rige la participación de estos reguladores. Para continuar con el análisis, es necesario estudiar los patrones de expresión del gen *nirK* en cepas de *R. etli* mutantes en otros reguladores transcripcionales tales como el sistema de dos componentes ActS/R.

Aún nos falta profundizar en la forma en que los 6 diferentes reguladores tipo CRP/FNR de *R. etli* participan en la regulación de la expresión de los genes de desnitrificación. La probable participación de reguladores adicionales para la expresión de *nirK* y *norC* se basa en los datos de expresión de *nirK* en una mutante *fixL*. Sabemos

que en una cepa mutante en *fixL* no se expresa el regulador *fixKf*, al no haber FixKf, el operón *nirK* no se expresaría como lo reportado en este trabajo para la fusión *nirK::uidA* en un fondo FixKf. Sin embargo, en una mutante *fixL*, el gen *nirK* se sigue expresando a niveles similares a los de la cepa silvestre. Por lo tanto, en ausencia de FixL, existen reguladores transcripcionales adicionales que participan en la expresión de *nirK* e indirectamente en la expresión de *norC*, estos factores transcripcionales pudieran ser los reguladores tipo FNR presentes en el genoma de *R. etli*.

Durante el transcurso de este trabajo de investigación, se hizo énfasis y se avanzó en el conocimiento de la regulación de la expresión del gen *nirK* en vida libre y en simbiosis, está pendiente profundizar en el estudio del gen *norC* para conocer en que etapa particular de la simbiosis se expresa y con ello inferir con mas claridad en que procesos pudiera estar participando activamente; es probable que NorC no solo se requiera para detoxificar óxido nítrico sino que pudiera tener un papel en modular las concentraciones de este gas en el nódulo y con ello tener un papel regulatorio. Para ello debemos hacer un análisis de la expresión de *norC* durante todo el proceso simbiótico.

En cuanto al regulón NnrR, es importante validar mediante experimentos de RT-PCR o qRT-PCR los resultados obtenidos en el microarreglo, esto con la finalidad de determinar el regulón NnrR.

Nuestros resultados de microarreglos muestran que *hemNf* (RHE\_PF00519) y los genes RHE\_PF00520, RHE\_PF00521, RHE\_PF00522 y RHE\_PF00523, que codifican para proteínas de función desconocida, se regulan positivamente por NnrR. Es interesante que estos genes están localizados entre los operones *norCBQD* y *nirKnirVnnrRnnrU* ambos regulados por NnrR y con participación funcional en la reducción de óxidos de nitrógeno. Por lo tanto, es interesante analizar su posible participación en este proceso.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arai, H., Igarashi, Y., Kodama, T. 1995. Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. FEBS Lett. 371(1): 73-76.
- Arai, H., Kodama, T. and Higarashi, Y. 1999. Effect of nitrogen oxides on expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 170: 19-24.
- Baek, S.H., Hartsock, A., Shapleigh, J.P. 2008. *Agrobacterium tumefaciens* C58 uses ActR and FnrN to control *nirK* and *nor* expression. J. Bacteriol. 190(1):78-86.
- Baker, G., Fesefeldt, A., Witzel, K. P. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 64(10): 3769-3775.
- Bartnikas, T. B., Tosques, I. E., Laratta, W. P., Shi, J., Shapleigh, J. P. 1997. Characterization of the nitric oxide reductase-encoding region in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. J. Bacteriol. 179(11): 3534-3540.
- Baudouin, E., Pieuchot, L., Engler, G., Pauly, N., Puppo, A. 2006. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. Mol. Plant. Microbe. Interact. 19(9):970-975.
- Becker, A., Bergès, H., Krol, E., Bruand, C., Rüberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F., de Bruijn, F.J., Fourment, J., Francez-Charlot, A., Kahn, D., Küster, H., Liebe, C., Pühler, A., Weidner, S., Batut, J. 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. Mol. Plant. Microbe. Interact. 17(3):292-303.
- Bedmar, E.J., Robles, E.F., and Delgado, M.J. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Biochem. Soc. Trans. 33: 141-144.
- Berks, B.C., Ferguson, S. J., Moir, J.W., Richardson, D.J. 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. Biochim. Biophys. Acta. 1232(3):97-173.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., Wendehenne, D. 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. Annu. Rev. Plant. Biol. 59:21-39.
- Braun, C., Zumft, W. G. 1992. The structural genes of the nitric oxide reductase complex from *Pseudomonas stutzeri* are part of a 30-kilobase gene cluster for denitrification. J. Bacteriol. 174(7): 2394-2397.
- Brom, S., García de los Santos, A., Girard, M. L., Davila, G., Palacios, R. and Romero, D. 1991. High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli plasmids. J. Bacteriol. 173 (3):1344-1346.

- Brom, S., García-de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., Palacios, R., 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174(16):5183-5189.
- Brom, S., Martínez, E., Dávila, G. y Palacios, R. 1988. Narrow and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. Strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1280-1283.
- Brown, G. C. and Croper, C. E. 1994. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 356: 295-298.
- Brunori, M., Giuffrè, A., Forte, E., Mastronicola, D., Barone, M. C., Sarti, P. 2004. Control of cytochrome c oxidase activity by nitric oxide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1655(1-3):365-371.
- Bueno, E., Gómez-Hernández, N., Girard, L., Bedmar, E.J., and Delgado, M.J. 2005. Function of the *Rhizobium etli* CFN42 *nirK* gene in nitrite metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 35: 166-167.
- Bueno, E., Mesa, S., Sanchez, C., Bedmar, E.J., Delgado, M.J. 2010. NifA is required for maximal expression of denitrification genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environmental Microbiology.* 12(2), 393-400.
- Cabello P, Roldán MD, Moreno-Vivián C. 2004. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology.* 150:3527-3546.
- Carr, G. J., Ferguson, S. J. 1990. The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* 269(2): 423-429.
- Casella, S., Shapleigh, J. P., Payne, W. J. 1986. Nitrite reduction in *Rhizobium "hedysari"* strain HCTN1. *Arch. Microbiol.* 146: 233-238.
- Clegg, S. J., Jia, W., Cole, J. A. 2006. Role of the *Escherichia coli* nitrate transport protein, NarU, in survival during severe nutrient starvation and slow growth. *Microbiology.* 152(7):2091-2100.
- Cramm, R., Pohlmann, A., Friedrich, B. 1999. Purification and characterization of the single-component nitric oxide reductase from *Ralstonia eutropha* H16. *FEBS Lett.* 460(1): 6-10.
- Cramm, R., Siddiqui, R. A., Friedrich, B. 1997. Two isofunctional nitric oxide reductases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* 179(21): 6769-6777.
- Cramm, R., Strube, K. 2008. Redox-controlled dinitrosyl formation at the diiron-oxo center of NorA. *Methods Enzymol.* 437:103-116.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., Brenner, S. E. 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research.* 14:1188-1190.

- Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Ventura, M. L., Rodrigo, J., Lamas, S., Golvano, M.P. 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. FEBS Lett. 398(2-3):159-164.
- De Boer, A. P. N., Reijnders, W. N. M., Kuenen, J. G., Stouthamer, A. H., and van Spanning, R. J. M. 1994. Isolation, sequencing and mutational analysis of a gene cluster involved in nitrite reduction in *Paracoccus denitrificans*. Antonie Leeuwenhoek 66: 111-127.
- De Boer, A. P., Van der Oost, J., Reijnders, W. N., Westerhoff, H. V., Stouthamer, A. H., van Spanning, R. J. 1996. Mutational analysis of the *nor* gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. Eur. J. Biochem. 242(3): 592-600.
- Delgado, M. J., Drevon, J. J., Bedmar, E. J. 1991. Denitrification by bacteroids of an uptake hydrogenase negative (Hup<sup>-</sup>) mutant and its isogenic Hup<sup>+</sup> parental strain of *Bradyrhizobium japonicum*. FEMS Microbiology Letters, 77: 157-162.
- Fedtke, I., Kamps, A., Krismer, B., Götz, F. 2002. The nitrate reductase and nitrite reductase operons and the *narT* gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC. J. Bacteriol. 184(23):6624-6634.
- Fenderson, F. F., Kumar, S., Adman, E. T., Liu, M. Y., Payne, W. J., LeGall, J. 1991. Amino acid sequence of nitrite reductase: A copper protein from *Achromobacter cycloclastes*. Biochemistry. 30 (29): 7180-7185.
- Ferguson, S. J. 1994. Similarities between mitochondrial and bacterial electron transport with particular reference to the action of inhibitors. Antonie Van Leeuwenhoek. 66: 89-110.
- Ferrarini, A., De Stefano, M., Baudouin, E., Pucciariello, C., Polverari, A., Puppo, A., Delledonne, M. 2008. Expression of Medicago truncatula genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. Mol. Plant Microbe Interact. 6:781-790.
- Fischer, H. M., 1994. Genetic regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. Microbiological Reviews. 58 (3): 352-386.
- Flock, U., Reimann, J., Adelloth, P. 1994. Proton transfer in bacterial nitric oxide reductase. Biochem. Soc. Trans. 34(Pt 1):188-190.
- Flock, U., Reimann, J., Adelloth, P. 2006. Proton transfer in bacterial nitric oxide reductase. Biochem Soc. Trans. 34(1):188-190.
- Frey, A. D., Farres, J., Bollinger, C. J., and Kallio, P. T. 2002. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 68(10):4835-4840.



- Fulop, V., Moir, J. W., Ferguson, S. J., Hajdu, J. 1995. The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome cd1. *Cell*. 81(3):369-377.
- Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., Gennis, R. B. 1994. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J. Bacteriol.* 176(18):5587-5600.
- Gennis, R. B., Ferguson-Miller, S. 1996. Protein structure: proton-pumping oxidases. *Curr. Biol.* 6(1):36-38.
- Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M. and Romero, D. 2000. Differential regulation of *fixN* reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL-fixK* cascade. *Molecular Plant- Microbe Interactions*. 13(12):1283-1292.
- Girard, M. L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R. and Davila, G. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli. *J. Bacteriol.* 173(8):2411-2419.
- Glockner, A. B., Jungst, A., Zumft, W. G. 1993. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1-free background (NirS-) of *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* 160(1):18-26.
- Goddard, A. D., Moir, J. W., Richardson, D. J., Ferguson, S. J. 2008. Interdependence of two NarK domains in a fused nitrate/nitrite transporter. *Mol. Microbiol.* 70(3):667-681.
- González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Chandra Janga, S., Ramírez, M. A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J., and Dávila, G. 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:3834-3839.
- Goretski, J., Zafiriou, O. C., Hollocher, T. C. 1990. Steady-state nitric oxide concentrations during denitrification. *J. Biol. Chem.* 265(20):11535-11538.
- Granados-Baeza, M.J., Gómez-Hernández, N., Mora, Y., Delgado, M.J., Romero, D., Girard, L. 2007. Novel reiterated Fnr-type proteins control the production of the symbiotic terminal oxidase cbb3 in *Rhizobium etli* CFN42. 2007. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 20(10):1241-1249.
- Green, J., Scott, C., Guest, J. R. 2001. Functional versatility in the CRP-FNR superfamily of transcription factors: FNR and FLP. *Adv. Microb. Physiol.* 44:1-34.
- Guest, J. R., Green, J., Irvine, A. S. and Spiro, S. 1996. The FNR modulon and FNR-regulated gene expression. En : *Regulation of gene expression in Escherichia coli* (Lin, E. C. C. and Lynch, A. S., Eds.), pp. 317-342. R. G. Landes, Austin, TX.
- Hendriks, J., Oubrie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S., Saraste, M. 2000. Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1459(2-3):266-273.

- Holloway, P., McCormick, W., Watson, R.J. and Chan, Y.K. 1996. Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 178: 1505-1514.
- Horchani, F., Prevot, M., Boscari, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C., Raymond, P., Boncompagni, E., Aschi-Smiti, S., Puppo, A., Brouquisse, R. 2011. Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. Plant Physiol. En prensa.
- Jetten, M. S. M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L. A., de Vries, S., van Loosdrecht, M. C. M. and Kuenen, J. G. 1997. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. Antonie van Leeuwenhoek. 71:75-93.
- John, P. 1977. Aerobic and anaerobic bacterial respiration monitored by electrodes. J. Gen. Microbiol. 98(1):231-238.
- Kartal, B., Tan, N. C., Van de Biezen, E., Kampschreur, M. J., Van Loosdrecht, M. C., Jetten, M. S. 2010. Effect of nitric oxide on anammox bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 76(18):6304-6306.
- Kiley, P. J. and Beinert, H. 1998. Oxygen sensing by the global regulator FNR: the role of the iron-sulfur cluster. FEMS Microbiol. Rev. 22:341-352.
- Körner, H., Sofia, H. J., Zumft, W. G. 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: Exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. FEMS. Microbiol. Rev. 27:559-592.
- Kucera, I., Kaplan, P. and Zeman, A. 1996. Oxygen increases the steady-state level of nitrate in denitrifying cells of *Paracoccus denitrificans*. FEMS Microbiol. Lett. 145: 163-166.
- Kwiatkowski, A. and Shapleigh, J. P. 1996. Requirement of nitric oxide for induction of genes whose products are involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. J. Biol. Chem. 271: 24382-24388.
- Landeta, C., Dávalos, A., Cevallos, M. A., Geiger, O., Brom, S., Romero, D. 2011. Plasmids with a chromosome-like role in *Rhizobium*. J. Bacteriol. En prensa.
- Lloret, L., Martínez-Romero, E. 2005. Evolution and phylogeny of rhizobia. Rev. Latinoam. Microbiol. 47(1-2):43-60.
- Luciński, R., Polcyn, W., Ratajczak, L. 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. Acta Biochim. Pol. 49(2):537-546.
- Mathieu, C., Moreau, S., Frendo, P., Puppo, A., Davies, M. J. 1998. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. Free Radic. Biol. Med. 24(7-8):1242-1249.
- Meakin, G. E., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E. J., Richardson, D. J., Delgado, M. J. 2007. The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of

nitrosylhaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology*. 153(2):411-419.

Membrillo-Hernández, J., Loannidis, N., and Poole, R. K. 1996. The flavohemoglobin (Hmp) of *Escherichia coli* generates superoxide in vitro causes oxidative stress in vivo. *FEBS Lett.* 382:141-144.

Mesa, S., Bedmar, E.J., Chanfon, A., Hennecke, H., and Fischer, H.M. 2003. *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK2 regulatory cascade. *J. Bacteriol.* 185 (13): 3978-3982.

Mesa, S., Ucurum, Z., Hennecke, H., Fischer, H. M. 2005. Transcription activation in vitro by the *Bradyrhizobium japonicum* regulatory protein FixK2. *J. Bacteriol.* 187(10):3329-3338.

Mesa, S., Velasco, L., Manzanera, M. E., Delgado, M. J. and Bedmar, E. J. 2002. Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology*. 148:3553-3560.

Meyer, C., Lea, U. S., Provan, F., Kaiser, W. M., Lillo, C. 2005. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game?. *Photosynth. Res.* 83(2):181-189.

Moreno-Vivián, C., Flores, E. 2007. Nitrate assimilation in bacteria. *Biology of the nitrogen cycle*. Bothe, H., Ferguson, S. J., Newton, W. E. (Eds). Elsevier, pp. 263-282.

Murphy M.P. 1999. Nitric oxide and cell death. *Biochem. Biophys. Acta.* 1411:401-414.

Nathan, C. and Shiloh, M. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian host and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(16):8841-8848.

Nellen-Anthamatten, D., Rossi, D. P., Preisig, O., Kullik, I., Babst, M., Fisher, H. M. and Hennecke, H. 1998. *Bradyrhizobium japonicum* FixK2, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. *J. Bacteriol.* 180:5251-5255.

Nishiyama, M., Suzuki, J., Kukimoto, M., Ohnuki, T., Horinouchi, S., Beppu, T. 1993. Cloning and characterization of a nitrite reductase gene from *Alcaligenes faecalis* and its expression in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 139(4):725-733.

O'Hara, G. M. and Daniel, R.M. 1985. Rhizobial denitrification: A review. *Soil. Biol. Biochem.* 17:1-9.

Ogawa, K., Akagawa, E., Yamane, K., Sun, Z. W., LaCelle, M., Zuber, P., Nakano, M. M. 1995. The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177(5):1409-1413.

Palmedo, G., P. Seither, H. Korner, J. C. Matthews, R. S. Burkhalter, R. Timkovich, and W. G. Zumft. 1995. Resolution of the *nirD* locus for heme d1 synthesis of cytochrome

- cd1 (respiratory nitrite reductase) from *Pseudomonas stutzeri*. Eur. J. Biochem. 232:737-746.
- Philippot, L. 2002. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. Biochim. Biophys. Acta. 1577(3):355-376.
- Philippot, L., Højberg, O. 1999. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 1446(1-2):1-23.
- Pii, Y., Crimi, M., Cremonese, G., Spena, A., Pandolfini, T. 2007. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. BMC Plant. Biol. 7:21.
- Pohlmann, A., Cramm, R., Schmelz, K., Friedrich, B. 2000. A novel NO-responding regulator controls the reduction of nitric oxide in *Ralstonia eutropha*. Mol. Microbiol. 38(3):626-638.
- Pooche, S. R., Leach, E. R., Moir, J. W. B., Cole, J. A. and Richardson, D. J. 2002. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite reductase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 277(26):23664-23669.
- Poole, R. K., Anjum, M. F., Membrillo-Hernández, J., Kim, S., Hughes, M. and Stewart, V. 1996. Nitric oxide, nitrite and Fnr regulation of *hmp* (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 178:5487-5492.
- Ralph, E. T., Guest, J. R., Green, J. 1998. Altering the anaerobic transcription factor FNR confers a hemolytic phenotype on *Escherichia coli* K12. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95(18):10449-10452.
- Richardson, D. J., Van Spanning, R. J., Ferguson, S. J. 2007. The prokaryotic nitrate reductases. Biology of the nitrogen cycle. Bothe, H., Ferguson, S. J., Nexton, W. E. (Eds). Elsevier, pp. 21-36.
- Robles, E. F., Sánchez, C., Bonnard, N., Delgado, M. J., Bedmar, E. J. 2006. The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes are controlled by the FixLJ-FixK(2)-NnrR regulatory cascade. Biochem. Soc. Trans. 34(1):108-110.
- Rubio, L. M., Herrero, A., Flores, E. 1996. A cyanobacterial *narB* gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase. Plant. Mol. Biol. 30(4):845-850.
- Sánchez, C., Gates, A. J., Meakin, G. E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D. J., Bedmar, E. J., Delgado, M. J. 2010. Production of nitric oxide and nitrosyl-hemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. Mol. Plant. Microbe. Interact. 23(5):702-711.
- Saraste, M., Castresana, J. 1994. Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. FEBS Lett. 341(1):1-4.
- Schlüter, A., Patschkowski, T., Uden, G., Priefer, U. B. 1992. The *Rhizobium leguminosarum* FnrN protein is functionally similar to *Escherichia coli* Fnr and

promotes heterologous oxygen-dependent activation of transcription. *Mol. Microbiol.* 6(22):3395-3404.

Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert, M., Jahn, D. 2007. The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J. Bacteriol.* 189(11):4310-4314.

Sears, H. J., Little, P. J., Richardson, D. J., Berks, B. C., Spiro, S., Ferguson, S. J. 1997. Identification of an assimilatory nitrate reductase in mutants of *Paracoccus denitrificans* GB17 deficient in nitrate respiration. *Arch. Microbiol.* 167(1):61-66.

Segovia, L., Young, P., and Martinez-Romero, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* Biovar Phaseoli Type I Strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43(2):374-377.

Shapleigh, J.P. 2006. The denitrifying prokaryotes. *Prokaryotes.* 2:769-792.

Shimoda, Y., Nagata, M., Suzuki, A., Abe, M., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Higashi, S., Uchiumi, T. 2005. Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant. Cell. Physiol.* 46(1):99-107.

Spiro, S. 2006. Nitric oxide-sensing mechanisms in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* 34(1):200-202.

Spiro, S. and Guest, J. R. 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 75:399-428.

Teixidó, L., Cortés, P., Bigas, A., Alvarez, G., Barbé, J., Campoy, S. 2010. Control by Fur of the nitrate respiration regulators NarP and NarL in *Salmonella enterica*. *Int. Microbiol.* 13(1):33-39.

Toffanin, A., Wu, Q., Maskus, M., Caselia, S., Abruna, H. D., Shapleigh, J. P. 1996. Characterization of the gene encoding nitrite reductase and the physiological consequences of its expression in the non denitrifying *Rhizobium "hedysari"* strain HCNT1. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (11): 4019-4025.

Tosques, I. E., Kwiatkowski, A. V., Shi, J., and Shapleigh, J. P. 1997. Characterization and regulation of the gene encoding nitrite reductase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J. Bacteriol.* 179:1090-1095.

Tosques, I. E., Shi, J. and Shapleigh, J. P. 1996. Cloning and characterization of *nnrR*, whose product is required for the expression of proteins involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J. Bacteriol.* 178:4958-4964.

Uden G, Bongaerts J. 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta.* 1320(3):217-34.

Van der Oost, J., de Boer, A. P., de Gier, J. W., Zumft, W. G., Stouthamer, A. H., van Spanning, R. J. 1994. The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of

terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase. FEMS Microbiol. Lett. 121(1):1-9.

Van Spanning, R. J. M., de Boer, A. P. N., Reijnders, W. N. M., Spiro, S., Westerhoff, H. V., Stouthamer, A. H. and van der Oost, J. 1995. Nitrite and nitric oxide reduction in *Paracoccus denitrificans* is under the control of NnR, a regulatory protein that belongs to the FNR family of transcriptional activators. FEBS Lett. 360:151-154.

Van Spanning, R. J. M., Houben, E., Reijnders, W. N. M., Spiro, S., Westerhoff, A., Stouthamer, H. V. and Saunders, N. 1999. Nitric oxide is a signal for NnR-mediated transcription activation in *Paracoccus denitrificans*. J. Bacteriol. 181:4129-4132.

Vollack, K. U., Hartig, E., Korner, H. and Zumft, W. G. 1999. Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: Characterization of four fnr-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. Mol. Microbiol. 31: 1681-1694.

Vollack, K.U. and Zumft, W. G. 2001. Nitric oxide signaling and transcriptional control of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri*. J. Bacteriol. 183:2516-2526.

Watmough, N. J., Butland, G., Cheesman, M.R., Moir, J.W., Richardson, D.J., and Spiro, S. 1999. Nitric oxide in bacteria: sintesis and consumption. Biochim. Biophys. Acta. 1411:456-474.

Weber, K. D., Vincent, O. D., Kiley, P. J. 2005. Additional determinants within *Escherichia coli* FNR activating region 1 and RNA polymerase alpha subunit required for transcription activation. J. Bacteriol. 187(5):1724-1731.

Wing, H. J., Williams, S. M., and Busby, S. J. 1995. Spacing requeriments for transcription activation by *Escherichia coli* FNR protein. J. Bacteriol. 177:6704-6710.

Wu, Q., Stewart, V. 1998. NasFED proteins mediate assimilatory nitrate and nitrite transport in *Klebsiella oxytoca (pneumoniae)* M5al. J. Bacteriol. 180(5):1311-1322.

Ye, R. W., Arunakumari, A., Averill, B. A. and Tiedje, J. M.. 1992. Mutants of *Pseudomonas fluorescens* deficient in dissimilatory nitrite reduction are also altered in nitric oxide reduction. J. Bacteriol. 174:2560-2564.

Zahrt, T. C. and Deretic, V. 2002. Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses: Unusual adaptations in *Mycobacterium tuberculosis*. Antioxid. Redox Signal 4:141-159.

Zumft, W. G. 1992. The denitrifying prokaryotes: Ballows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Shleifer, K. H. (Eds) The prokaryotes, 2nd. Ed. (pp 554'582) Springer-Verlag, Berlin.

Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 61(4):533-616.

Zumft, W. G. 2002. Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4 (3):277-286.

Zumft, W. G., Korner, H. 1997. Enzyme diversity and mosaic gene organization in denitrification. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 71(1-2): 43-58.