



“Degradación de compuestos nitroaromáticos por *Rhodobacter*: Purificación de la nitrorreductasa NprB”

Memoria presentada por D. Rodolfo Gómez Cruz para optar al Grado de Doctor en
Ciencias por la Universidad de Córdoba, España.

Córdoba, noviembre de 2009.

TITULO: *Degradación de compuestos nitroaromáticos por Rhodobacter:
purificación de la nitrorreductasa Npr*

AUTOR: *RODOLFO GOMEZ CRUZ*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2010
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

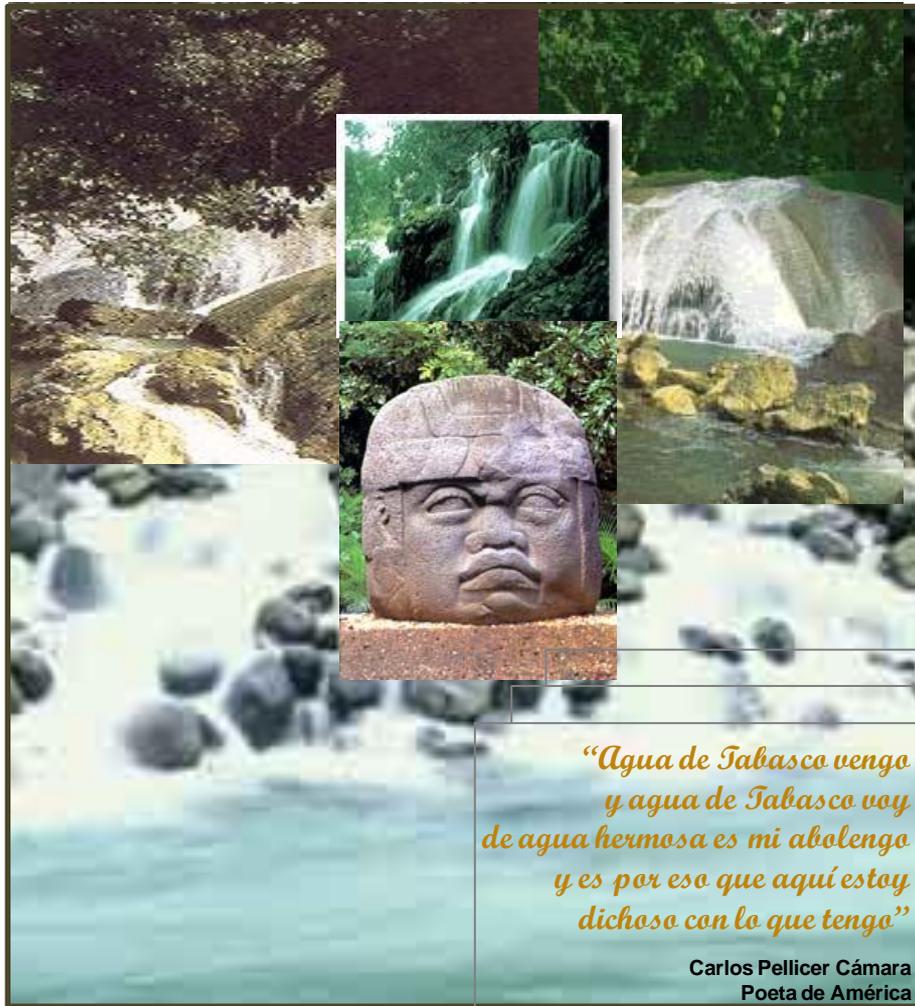
ISBN-13: 978-84-692-9386-7
D.L.: CO-188-2010

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo BIO-117, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad de Córdoba, España, con la financiación del:

- Ministerio de Ciencia y Tecnología. Proyecto BIO2005-07741-C02-01, España
- Ministerio de Ciencia e Innovación. Proyecto BIO2008-04542-C02-01, España
- Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP), de la Secretaría de Educación Pública (SEP), México
- Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), México

promep





*“Agua de Tabasco vengo
y agua de Tabasco voy
de agua hermosa es mi abolengo
y es por eso que aquí estoy
dichoso con lo que tengo”*

**Carlos Pellicer Cámara
Poeta de América**

Con mucho cariño,

A mis padres, los perseverantes luchadores, por todo el gran ejemplo que me han dado.

A mis hermanos consanguíneos, también los persistentes luchadores.

A todos los demás miembros de mi familia consanguínea, especialmente a mis abuelitos que también formaron en mí valores sólidos desde mi infancia.

A mi esposa e hijos por el reto de haber aceptado y compartido momentos cruciales de cambios e integración en una cultura diferente junto conmigo.

¡Muchas gracias!

Haciendo un poco de memoria, recuerdo que buscaba información sobre Programas Doctorales de Biotecnología que me interesaran por INTERNET y me llamaron demasiado la atención tanto la línea como los trabajos de investigación del Grupo BJO-117, liderado por el Dr. Francisco Castillo Rodríguez. A ese momento me pregunté ¿será verdad realmente todo esto que estoy leyendo?

Después de estos 5 años de trabajo he constatado la veracidad de la información que había encontrado en la página web de la UCO relacionado con el Programa Doctoral “Experimentación en Biociencias” y el trabajo de laboratorio y la dirección de mi Tesis Doctoral en el Grupo BJO-117. Por lo tanto, una de las primeras cosas que debo de reconocer es que me siento muy agradecido y contento con el “barco”, el capitán y todos los “tripulantes” que me acogieron y enseñaron a navegar en el mar de una parte de la Biotecnología Ambiental, porque a pesar de que es muy interesante me era desconocido.

Deseo expresar mi gratitud al Dr. Conrado Moreno Vivión por haberme aceptado en su Grupo de Investigación y haber contribuido con su magnífico ejemplo y ayuda a mi desarrollo en excelente ambiente científico. Muchas gracias Conrado por todo el tiempo de dedicación y esfuerzo en la codirección y revisión de este trabajo. Mi más sincero reconocimiento.

A la Dra. M^a Dolores Roldán Ruiz por cogerme de la mano y enseñarme a caminar en una parte de este campo de la Investigación Científica, muchas gracias. Haber contado siempre contigo Lola en el lado de mis dudas y mis vacíos siempre me pusieron de pie y me enseñaron, cuando yo creía que no podía hacerlo. Asimismo, me

enseñaste a disfrutar del lado bonito de esto gracias a tu tenacidad, entusiasmo, gozo, trabajo de grupo, respeto y confianza. Muchas gracias porque siempre me animaste y me tuviste gran paciencia a pesar de los momentos que tenías tan saturados. También, por todo el tiempo que siempre me hiciste para disipar dudas, discutir e interpretar los resultados y por la entrega y esfuerzo constante en la codirección y revisión de esta tesis.

A los Drs. Francisco Castillo Rodríguez, Manuel Martínez Luque-Romero y Francisco Javier Caballero Domínguez por su ayuda, buen ejemplo de trabajo y confianza en el Grupo de Investigación BJC-117.

A la Dra. Eva Pérez Reinado por compartir conmigo muchos valores. Aprecio mucho Eva toda la ayuda e interés que me brindaste pese a tu carga de trabajo. Algo que nunca olvidaré es que me enseñaste a tener voluntad y disciplina en el trabajo bien hecho para la confiabilidad de mis resultados. Muchas gracias.

A Victor, Lara, M^a José y Mary Paz, excelentes “hermanos” de laboratorio. Muchas gracias porque siempre me dieron toda la confianza, tiempo y paciencia para poner también mis dudas en claro, aprender de sus “tip’s” de laboratorio y tener buenas charlas de pasillo.

A Jessica, Isabel, Silvia, Rito y Oscar, compañeros de laboratorio que de una manera u otra contribuyeron al buen ambiente de cooperación y de respeto.

A todos mis compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, particularmente a los Grupos de Investigación vecinos, muy especialmente a los Grupos BJC-128. Dr. Emilio

Fernández Reyes, BJO 159. Dr. Manuel Pineda Priego, BJO-216. Dr. José Antonio Bárcena Ruiz y BJO-278. Dr. Juan Muñoz Blanco, del Edificio C-6 “Dr. Severo Ochoa” por su actitud siempre presta a la ayuda y también a la convivencia en la hora de la comida. Muchas gracias, porque sinceramente pasé muchos momentos agradables con ustedes.

A Inés, Pilar, Conchi y Susana por su estupenda labor en las gestiones administrativas. Realmente tienen “bien puesta la camiseta” del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y de la UCO. Muchas gracias.

Y finalmente, agradezco a todas las Instituciones y Autoridades de Educación que contribuyeron de diferentes maneras para que realizara este Programa Doctoral, como: mi querida Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), México (Rectoría, DACBiol, DJP, SF y autoridades respectivas, entre otras), Universidad de Córdoba (UCO), España, Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMP) de la Secretaría de Educación Pública (SEP), México, por haberme concedido una beca de mejoramiento por todo este lapso de tiempo, y a los Ministerios Españoles de Ciencia y Tecnología (Proyecto BJO2005-07741-C02-01) y Ciencia e Innovación (Proyecto BJO2008-04542-C02-01) por haber cofinanciado la parte complementaria para el desarrollo experimental de esta tesis (cursos teóricos, materiales y reactivos de laboratorio, y salidas a Congresos, ente otras cosas).

¡Muchas gracias por todo!

ÍNDICE	X
INDICE DE FIGURAS	XVI
ÍNDICE DE TABLAS	XXII
ABREVIATURAS	XXIII

INTRODUCCIÓN	1
1 LOS COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS	3
1.1. Propiedades químicas	5
1.2. Toxicidad	6
2 METABOLISMO DE COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS EN BACTERIAS	9
2.1. Metabolismo oxidativo	11
2.2. Metabolismo reductivo	13
3 LAS NITRORREDUCTASAS	16
3.1. Tipos y mecanismos de reducción	17
3.2. Distribución biológica y propiedades bioquímicas	20
3.3. Estructuras cristalográficas	25
3.4. Las nitrorreductasas de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	31
3.5. Importancia biotecnológica de las nitrorreductasas	33
4 LAS BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS	35
4.1. <i>Rhodobacter capsulatus</i>	38
4.2. <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	39
5 OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO	41

M	ATERIALES Y MÉTODOS	43
1	ESTIRPES BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS	43
2	MEDIOS DE CULTIVO	44
	2.1. Medios líquidos	44
	2.1.1. Medio LB	44
	2.1.2. Medio PY	44
	2.1.3. Medio RCV	45
	2.1.4. Ensayos de bioactivación del profármaco CB1954	46
	2.2. Medios sólidos	46
	2.3. Antibióticos	46
3	CONDICIONES DE CULTIVO	47
4	PUREZA Y MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS	48
5	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACELULARES	48
6	DETERMINACIONES ANALÍTICAS	49
	6.1. Medida del crecimiento celular	49
	6.2. Determinación de la concentración de proteínas	49
	6.3. Detección de compuestos nitroaromáticos por UV/vis y HPLC	49
7	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITRORREDUCTASA DE NprB	50
8	TÉCNICAS RUTINARIAS DE MANIPULACIÓN DE DNA	52
	8.1. Aislamiento y purificación de DNA plasmídico	52

8.2.	Aislamiento de DNA total	52
8.2.1.	Mediante kit comercial	52
8.2.2.	Método del fenol/cloroformo	53
8.3.	Digestión del DNA total con endonucleasas de restricción	54
8.3.1.	DNA genómico de <i>Rhodobacter</i>	54
8.3.2.	Digestión DNA plasmídico	54
8.4.	Ligación	54
8.5.	Electroforesis de DNA	55
8.6.	Secuenciación del DNA	56
8.7.	Transformación por tratamiento con cloruro de calcio en frío	57
8.7.1.	Obtención de células competentes	57
8.7.2.	Transformación de células competentes	57
8.7.3.	Selección de los transformantes	58
8.8.	Mutagénesis por inserción al azar del transposón Tn5 en el genoma de <i>R. sphaeroides</i> DSM158S	59
8.8.1.	Transferencia por conjugación de plásmidos movilizables desde <i>E. coli</i> S17-1 a <i>R. sphaeroides</i> DSM158S	60
8.8.2.	Selección de mutantes de <i>R. sphaeroides</i> DSM158S afectados en la ruta de degradación de DNP	61
8.9.	Hibridación del DNA genómico del mutante D1-2 de <i>R. sphaeroides</i> DSM158S (Southern blotting)	62
8.9.1.	Transferencia del DNA genómico del mutante D1-2 de <i>R. sphaeroides</i> DSM158S a membranas de nailon	62
8.9.2.	Condiciones de hibridación del DNA genómico del mutante D1-2 de <i>R. sphaeroides</i>	63
9	HIPEREXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB EN <i>E. coli</i>	64
9.1.	Amplificación del gen <i>nprB</i> de <i>R. capsulatus</i> B10S mediante PCR	64
9.2.	Clonación del gen <i>nprB</i> en el vector de expresión pQE32	66

10	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SULFODODECILSULFATO DE SODIO (SDS-PAGE)	67
	10.1. Tinción de proteínas con azul de Coomassie	69
	10.2. Análisis inmunológico	69
	10.2.1. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	69
	10.2.2. Inmunodetección de la proteína His ₆ -NprB	70
11	PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	71
12	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB PURIFICADA	73
	12.1. Efecto del pH	73
	12.2. Efecto de la temperatura	74
	12.3. Espectro de absorción UV/vis	74
	12.4. Determinación de la actividad dihidropterina reductasa de His ₆ -NprB	74
	12.5. Efecto de inhibidores sobre la actividad nitrorreductasa de NprB	75
	12.6. Caracterización cinética de las enzimas NprA y NprB	76
	R RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
1	CLONACIÓN DEL GEN <i>nprB</i> DE <i>Rhodobacter capsulatus</i> B10S	77
2	EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB	83
	2.1. Amplificación mediante PCR del gen <i>nprB</i> de <i>R. capsulatus</i>	84
	2.2. Clonación del gen <i>nprB</i> en el vector de expresión pQE32	85
	2.3. Detección de la proteína His ₆ -NprB en geles	

	de poliacrilamida mediante tinción por Coomassie e inmunodetección	86
2.4.	Expresión heteróloga de la proteína recombinante His ₆ -NprB en <i>Escherichia coli</i> y análisis de su capacidad de activar al profármaco CB1954	87
3	PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	91
4	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB	94
4.1.	Donadores fisiológicos de electrones y sustratos de la proteína His ₆ -NprB	94
4.2.	Espectro UV/vis de la proteína recombinante His ₆ -NprB	98
4.3.	Temperatura y pH óptimos de la actividad nitrorreductasa de la proteína His ₆ -NprB	101
4.4.	Efecto de posibles inhibidores sobre la actividad nitrorreductasa de la proteína His ₆ -NprB	102
4.5.	Caracterización cinética de las nitrorreductasas NprA y NprB de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	105
4.5.1.	Determinación de la K_M aparente para los sustratos TNP y TNT	105
4.5.2.	Inhibición de la actividad nitrorreductasa de las proteínas His ₆ -NprA y His ₆ -NprB en presencia de capsaicina. Determinación de la K_i	111
4.6.	Actividad enzimática de la proteína His ₆ -NprB con dihidrobiopterina o con quinonas como posibles sustratos fisiológicos	117
5	CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN DEL 2,4-DINITROFENOL EN <i>Rhodobacter sphaeroides</i> DSM158S: OBTENCIÓN DE MUTANTES POR INSERCIÓN AL AZAR DEL TRANSPOSÓN Tn5	121
5.1.	Mutagénesis por inserción al azar	

	del transposón Tn5 en el genoma de <i>R. sphaeroides</i> DSM158S	123
5.2.	Selección de mutantes de <i>R. sphaeroides</i> DSM158S afectados en la ruta de degradación de DNP	123
5.3.	Caracterización fisiológica de las estirpes mutantes de <i>R. sphaeroides</i> DSM158S	124
5.4.	Comprobación de la presencia del transposón Tn5 en los mutantes de <i>R. sphaeroides</i> mediante hibridación (Southern blot)	126
5.5.	Aislamiento e identificación de las secuencias flanqueantes a Tn5 en el mutante D1-2	127
5.5.1.	Digestiones parciales del DNA genómico de la estirpe mutante D1-2 de <i>R. sphaeroides</i> con la enzima de restricción <i>Sau3A</i>	127
5.5.2.	Ligación de los fragmentos <i>Sau3A</i> de la estirpe mutante D1-2 de <i>R.</i> <i>sphaeroides</i> DSM158S en el plásmido pBKS digerido con <i>Bam</i> HI y amplificación por PCR de la mezcla de ligación	129
5.5.3.	Clonación de los productos de PCR correspondientes a las regiones flanqueantes de Tn5 en el plásmido pGEM-T y secuenciación de dichas regiones	131

C ONCLUSIONES 133

R ESUMEN 135

B IBLIOGRAFÍA 136

1. Introducción		Página
Figura 1.	Algunos compuestos xenobióticos aromáticos representativos de tipo cloroaromático y nitroaromático	2
Figura 2.	Algunos compuestos nitroaromáticos naturales y sintéticos (xenobióticos) constituidos por un anillo bencénico como principal componente estructural	3
Figura 3.	Esquema general de la biodegradación de compuestos xenobióticos	9
Figura 4.	Transformación bioquímica de los compuestos nitroaromáticos	10
Figura 5.	Rutas aeróbicas oxidativas de degradación del anillo aromático de los compuestos nitroaromáticos	12
Figura 6.	Mecanismo de transferencia de electrones de la nitrobenzeno dioxigenasa de <i>Comamonas</i> sp. JS765	12
Figura 7.	Reducción de los compuestos nitroaromáticos	13
Figura 8.	Reducción del anillo aromático y formación de complejos hidruro–Meisenheimer	14
Figura 9.	Hidruro-transferasas de <i>Rhodococcus (opacus) erythropolis</i> HL PM–1 implicadas en la ruta de degradación del ácido pírico	15
Figura 10.	Tipos de nitrorreductasas	17
Figura 11.	Reducción del nitrobenzeno catalizada por la nitrobenzeno reductasa de <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JS45	20
Figura 12.	Árbol filogenético de las nitrorreductasas	23
Figura 13.	Rutas reductivas de degradación del TNT	24
Figura 14.	Ruta de reducción del cloramfenicol por nitrorreductasas de <i>Haemophilus influenzae</i>	25

Figura 15.	Centro activo de la flavín reductasa (Frp) de <i>Vibrio harveyi</i>	27
Figura 16.	Estructura de la nitrorreductasa (NR) de <i>Enterobacter cloacae</i>	28
Figura 17.	Estructuras cristalográficas de las nitrorreductasas NR de <i>Enterobacter cloacae</i> (1NEC), YdjA de <i>Escherichia coli</i> (Ec_ydjA) y NAD(P)H-flavín oxidoreductasa de <i>Helicobacter pylori</i> (2HOU)	29
Figura 18.	Estructuras de las proteínas OYE	31
Figura 19.	Profármacos biorreducibles que son activados por nitrorreductasas bacterianas	34
Figura 20.	Esquema general de las terapias enzima/profármaco para determinados tipos de cáncer	35

2. Materiales y métodos

Figura 21.	Marcadores de tamaño para electroforesis de DNA	56
Figura 22.	Esquema de la mutagénesis con Tn5 y posterior selección de mutantes afectados en la degradación de DNP	60
Figura 23.	Esquema del programa de PCR para la amplificación del gen <i>nprB</i> de <i>R. capsulatus</i> B10S	65
Figura 24.	Construcción de un vector para la expresión de la proteína recombinante His ₆ -NprB	66
Figura 25.	Marcadores de masa molecular para electroforesis proteínas	68

3. Resultados

Figura 26.	Regiones de DNA flanqueantes al gen RRC03929 de <i>Rhodobacter capsulatus</i> SB1003	78
-------------------	--	----

Figura 27.	Gen <i>nprB</i> y las regiones adyacentes	78
Figura 28.	Secuencia del fragmento de ~1,6 kb que contiene el gen <i>nprB</i> de <i>Rhodobacter capsulatus</i> B10S y sus regiones flanqueantes	80
Figura 29.	Alineamiento múltiple de la proteína NprB de <i>Rhodobacter capsulatus</i> B10S con diferentes nitrorreductasas	81
Figura 30.	Amplificación de un fragmento de unos 0,7 kb que contiene el gen <i>nprB</i>	84
Figura 31.	Secuencia nucleotídica del gen <i>nprB</i> de <i>R. capsulatus</i>	85
Figura 32.	Tinción con Coomassie e inmunodetección de la proteína His ₆ -NprB	86
Figura 33.	Efecto del profármaco CB1954 sobre el crecimiento aeróbico de células de <i>E. coli</i> JM109 que expresan los genes <i>nprB</i> y <i>nprA</i> de <i>R. capsulatus</i>	88
Figura 34.	Reducción del profármaco CB1954 con enzimas DT-diaforasas o nitrorreductasas	89
Figura 35.	Perfil de elución de la proteína His ₆ -NprB en una columna de afinidad con níquel-NTA agarosa	92
Figura 36.	Tinción con Coomassie e inmunodetección de la proteína His ₆ -NprB en las fracciones cromatográficas	93
Figura 37.	Actividad nitrorreductasa de la proteína His ₆ -NprB con diferentes sustratos	96
Figura 38.	Espectro de absorción UV/visible de la proteína recombinante His ₆ -NprB	99
Figura 39.	Efecto de la temperatura sobre la actividad nitrorreductasa de la proteína His ₆ -NprB	101
Figura 40.	Efecto del pH sobre la actividad nitrorreductasa de la proteína His ₆ -NprB	101

Figura 41.	Efecto de posibles inhibidores sobre la actividad nitrorreductasa de las proteínas His ₆ -NprA y His ₆ -NprB	103
Figura 42.	Velocidad de reacción frente a la concentración de TNP como sustrato para la proteína recombinante His ₆ -NprA	106
Figura 43.	Representación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la actividad nitrorreductasa de la proteína recombinante His ₆ -NprA con TNP como sustrato	106
Figura 44.	Velocidad de reacción frente a la concentración de TNP como sustrato para la proteína recombinante His ₆ -NprB	107
Figura 45.	Representación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la actividad nitrorreductasa de la proteína recombinante His ₆ -NprB con TNP como sustrato	108
Figura 46.	Velocidad de reacción frente a la concentración de TNT como sustrato para la proteína recombinante His ₆ -NprB	109
Figura 47.	Representación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la actividad nitrorreductasa de la proteína recombinante His ₆ -NprB con TNT como sustrato	110
Figura 48.	Velocidad de reacción frente a la concentración de TNP de la proteína recombinante His ₆ -NprA en presencia de capsaicina 10 y 100 μM	112
Figura 49.	Representación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la actividad de la proteína recombinante His ₆ -NprA con TNP como sustrato en presencia de capsaicina 10 y 100 μM	112
Figura 50.	Representación directa de la velocidad de la reacción catalizada por la proteína recombinante His ₆ -NprB frente a la concentración de TNP en presencia de capsaicina 10 y 100 μM	113

Figura 51.	Representación de dobles recíprocos de Lineweaver–Burk para la actividad de la proteína recombinante His ₆ –NprB con TNP como sustrato en presencia de capsaicina 10 y 100 μM	114
Figura 52.	Representación de la velocidad de la reacción catalizada por la proteína recombinante His ₆ –NprB con TNT como sustrato en presencia de capsaicina 10 y 100 μM	115
Figura 53.	Representación de dobles recíprocos de Lineweaver–Burk para la actividad de la proteína recombinante His ₆ –NprB con TNT como sustrato en presencia de capsaicina 10 y 100 μM	116
Figura 54.	Posible función fisiológica de la proteína NprA en la regeneración de la tetrahidrobiopterina en el metabolismo de aminoácidos aromáticos	117
Figura 55.	Actividad dihidropterina reductasa de las proteínas His ₆ –NprA y His ₆ –NprB	119
Figura 56.	Actividad de la proteína His ₆ –NprB con quinonas	121
Figura 57.	Estrategia para la mutagénesis con Tn5 y la identificación del sitio de inserción del transposón	122
Figura 58.	Crecimiento y consumo de DNP de la estirpe silvestre y los posibles mutantes de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> DSM158S cultivados fototróficamente con DNP	125
Figura 59.	Hibridación con una sonda del transposón Tn5 del DNA genómico de la estirpe mutante D1–2 de <i>R. sphaeroides</i> , digerido con diferentes enzimas de restricción	127
Figura 60.	Digestiones parciales del DNA genómico del mutante D1–2 con la enzima de restricción <i>Sau3A</i> a diferentes tiempos y diluciones	128
Figura 61.	Amplificación por PCR de la región flanqueante de Tn5 tras la ligación en pBKS de los fragmentos <i>Sau3A</i> obtenidos en la digestión parcial	129

Figura 62.	Esquema del programa de PCR para la amplificación de las regiones flanqueantes a Tn5 de la estirpe D1–2 de <i>R. sphaeroides</i> DSM158S	130
Figura 63.	Amplificación de las regiones flanqueantes a Tn5 del mutante <i>R. sphaeroides</i> D1–2	131
Figura 64.	Posible localización del transposón Tn5 en el mutante D1-2 de <i>R. sphaeroides</i>	132

1. Introducción Página

Tabla 1.	Nitrorreductasas bacterianas tipo I o insensibles a oxígeno más relevantes	21
-----------------	--	----

2. Materiales y Métodos

Tabla 2.	Estirpes bacterianas y plásmidos utilizados	43
-----------------	---	----

3. Resultados y Discusión

Tabla 3.	Proteínas con las que presenta homología NprB	82
-----------------	---	----

ADEPT	antibody–directed enzyme prodrug therapy (terapia de activación enzimática de profármacos, dirigida con anticuerpos)
ADNT	amino–4,6–dinitrotolueno
ANP	2–amino–4–nitrofenol
Ap	ampicilina
BCIP	5–bromo–4–cloro–3–indolil fosfato
BSA	seroalbúmina bovina
CAP	capsaicina (<i>trans</i> –8–metil– <i>N</i> –vanillil–6–nonenamida)
CB1954	5– (aziridin–1–yl) –2,4–dinitrobenzamida
CHES	ácido 2–[ciclohexilamino] etanosulfónico
Cm	cloramfenicol
DCM	dicumarol
2,4–DHANT	2,4–dihidroamilamino–nitrotolueno
DMSO	dimetilsulfóxido
DMPH ₄	6,7–dimetil–5,6,7,8–tetrahidropterina
DNasa	desoxirribonucleasa
DNB	dinitrobenzoato
DNP	dinitrofenol
DNT	dinitrotolueno
dNTPs	desoxirribonucleósidos trifosfato
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
F420	coenzima F420
FNT	<i>o</i> –fenantrolina
FZD	furazolidona
GDEPT	gene–directed enzyme prodrug therapy (terapia de activación enzimática de profármacos, dirigida por transformación génica)
GS/GOGAT	glutamina sintetasa/glutamato sintasa
GTN	trinitroglicerina

HEPES	ácido 2- [4- (2-hidroxietil)piperacina-1-yl] etanosulfónico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
2HX	5- (aziridin-1-yl) -2- hidroxilamino-4-nitrobenzamida
4HX	5- (aziridin-1-yl) -4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida
IPTG	isopropil β -tiogalactósido
Km	kanamicina
MES	ácido 2- <i>N</i> -morfolinoetano sulfónico
MOPS	ácido 3- <i>N</i> -morfolinopropano sulfónico
NBZ	nitrobenzeno
NDEA	<i>N</i> -nitrosodietilaminas
NFN	nitrofurantoína
NFZ	nitrofurazona
NTB	azul nitro-tetrazolio
NQO	NAD(P)H-quinona oxidorreductasa
NR	nitrorreductasa
NTA	ácido nitrilo triacético
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PETN	pentaeritritol tetranitrato
PVDF	difluoruro de polivinilideno
<i>q</i> DPR	dihidropterina quinonoide reductasa
<i>q</i> DMPH ₂	forma quinonoide de la 6,7-dimetil-7,8-dihidropterina
RNasa	ribonucleasa
SDS	dodecil sulfafo sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
Sm	estreptomycin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina
TNP	2,4,6-trinitrofenol (ácido pícrico)
TNT	2,4,6-trinitrotolueno
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

U	unidades de actividad enzimática ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)
UV/Vis	espectro ultravioleta y visible
VDEPT	virus-directed enzyme prodrug therapy (terapia de activación enzimática de profármacos, dirigida por transformación génica con virus)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

INTRODUCCIÓN

El concepto de residuo tóxico y peligroso viene siendo utilizado desde los años 70 en EE.UU., donde aparecieron iniciativas legales para su regulación. A estos residuos se les llamaba “residuos industriales especiales” o “residuos químicos”. Los “residuos tóxicos y peligrosos” son todos aquellos que satisfacen cualquiera de estos criterios: inflamabilidad, reactividad, corrosividad y/o toxicidad. Debe destacarse que los principales problemas de los residuos peligrosos van asociados a su naturaleza tóxica o nociva a largo plazo, y a la incapacidad del medio ambiente para degradarlos completamente.

Los compuestos xenobióticos son residuos o sustancias químicas tóxicas y peligrosas que tienen su origen principalmente en diversas actividades industriales, a través de la química de síntesis (Testa y Krämer, 2006). Desde comienzos del siglo XX, la mayoría de estos compuestos han estado presentes como agentes químicos extraños para las células (Abayomi, 2007). La cantidad de compuestos xenobióticos producidos por el hombre y emitidos al medio ambiente en forma de residuos peligrosos ha crecido desde los 1.000 kilos en 1930 a más de 400 millones de toneladas en los albores del siglo XXI (Mason, 2002). Según la Agencia para la Protección de la Salud del Reino Unido, cada mes aparecen más de 600 compuestos xenobióticos nuevos que se añaden a los 80.000 ya existentes, aunque por el momento sólo se ha demostrado un efecto nocivo en el ser humano para un 7% de estos agentes.

La razón fundamental de que muchos de estos compuestos xenobióticos no sean fácilmente biodegradables y tiendan a acumularse en la naturaleza y en los tejidos de los seres vivos radica en la gran estabilidad de sus estructuras químicas, que son distintas a las de los compuestos naturales. Incluso los que tienen estructuras similares a las naturales son muy inalterables porque suelen contener modificaciones,

con átomos de carbono unidos covalentemente a grupos muy electronegativos (halógenos y grupo nitro), lo que confiere una extraordinaria estabilidad a los productos resultantes y disminuye la capacidad degradativa de los seres vivos (Spain, 1995a; Roldan *et al.*, 2008).

Aproximadamente un 25% de la biomasa de la Tierra está constituida por compuestos que contienen un anillo aromático como principal componente estructural (Gibson y Harwood, 2002). Una gran cantidad de compuestos xenobióticos sintetizados y emitidos al medio ambiente contienen en su estructura uno o varios anillos aromáticos, que les hace especialmente estables debido a la deslocalización de la nube electrónica en el anillo (Aihara, 1992). Así, los compuestos xenobióticos presentan una gran variedad de estructuras químicas y diferentes grados de toxicidad, lo cual se refleja en su resistencia a la degradación microbiana (Qasim *et al.*, 2007). Debido a su estructura inusual, algunos xenobióticos persisten mucho tiempo en la biosfera sin alterarse y por eso se dice que son recalcitrantes a la biodegradación. Entre los compuestos xenobióticos aromáticos, los derivados más estables son los cloroaromáticos y los nitroaromáticos (Fig. 1). La existencia de dos o más grupos nitro en el anillo aromático confiere carácter recalcitrante a los compuestos polinitroaromáticos y existen evidencias que sugieren que estos compuestos se encuentran entre los más potentes mutágenos y carcinógenos identificados hasta el momento (Vance y Levin, 1984; Roldan *et al.*, 2008).

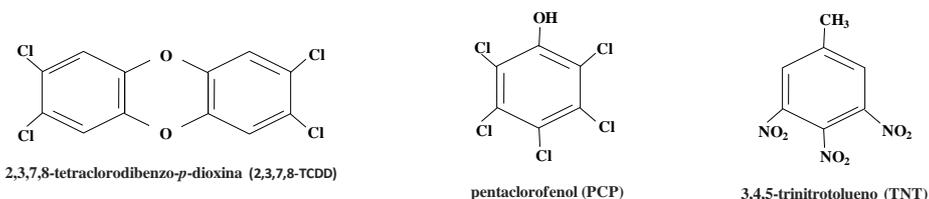


Figura 1. Algunos compuestos xenobióticos aromáticos representativos de tipo cloroaromático y nitroaromático.

1. LOS COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS

La transformación microbiana de los compuestos nitroaromáticos ha sido demostrada desde hace tiempo (Cartwright y Cain, 1959a; 1959b; Villanueva, 1964; Jensen y Lautrup-Larsen, 1967; McCormick *et al.*, 1976; Spain *et al.*, 1979; Boopathy y Manning, 1996). Aunque existen algunas bacterias que mineralizan ciertos compuestos nitroaromáticos (Dickel y Knackmuss, 1991; Lenke *et al.*, 1992; Blasco *et al.*, 1999; Nishino *et al.*, 2000), en general, las características recalcitrantes y tóxicas de estas sustancias plantean una amenaza para el ambiente y para la salud (Roldan *et al.*, 2008).

Aunque existen algunos compuestos nitroaromáticos naturales como el antibiótico cloramfenicol, la mayoría de los compuestos nitroderivados son compuestos orgánicos sintéticos (xenobióticos) que contienen uno o varios grupos nitro ($-\text{NO}_2$) (Fig. 2). Los compuestos

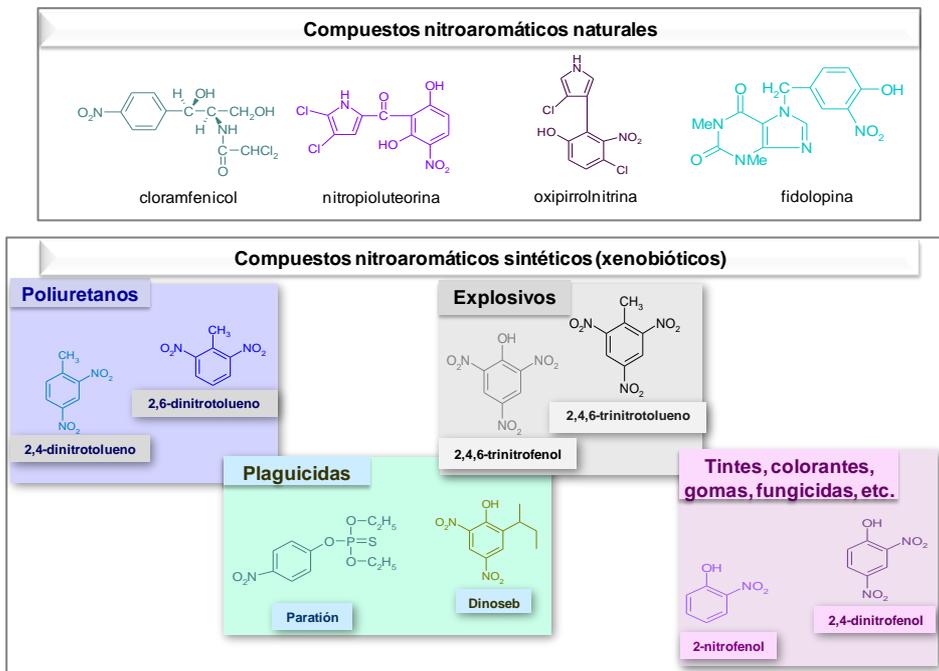


Figura 2. Algunos compuestos nitroaromáticos naturales y sintéticos (xenobióticos) constituidos por un anillo bencénico como principal componente estructural.

nitroderivados se pueden organizar en dos grupos: los compuestos nitroaromáticos y los nitroalifáticos.

Los compuestos nitroaromáticos se emplean en la industria química para la fabricación de productos de consumo. Entre ellos se encuentran las espumas flexibles de poliuretano, fabricados a partir de 2,4- y 2,6-dinitrotoluenos (DNT) que se usan en la industria de colchones, ropa de cama, muebles, tintes y en bolsas de aire de automóviles; plaguicidas como el paratión (dietil-*p*-nitrofenilmonotiofosfato) y el dinoseb (2-*sec*-butil-4,6-dinitrofenol); explosivos convencionales como el TNT (2,4,6-trinitrotolueno) y el ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol), que se han empleado como cargas explosivas en proyectiles navales o altos explosivos sintéticos como la Goma-2; y los mono y dinitrofenoles, que se encuentran como subproductos de la síntesis de plásticos, colorantes, disolventes y fármacos (Spain, 1995a; Luckenbach y Epel, 2005; Pérez-Reinado, 2005; Roldan *et al.*, 2008). Los primeros compuestos nitroaromáticos utilizados como agentes antimicrobianos fueron los nitrofuranos (nitrofurazona, furazolidona y nitrofurantoína) (Chamberlain, 1976).

Por otra parte, los compuestos nitroalifáticos, tales como nitrometano y nitroetileno, son usados extensamente en la fabricación de productos farmacéuticos, fibras, recubrimientos, disolventes o aditivos de ciertos explosivos, pesticidas y fungicidas. Desde el punto de vista industrial, los compuestos nitroderivados más importantes son nitrobenzenos, mono, di y trinitrotoluenos, mononitroclorobenzenos, nitroanilinas, nitroclorotoluenos, nitronaftalenos, di y trinitrofenoles, entre otros. Estos compuestos son liberados al medio ambiente casi exclusivamente a través de fuentes antropogénicas (Marvin-Sikkema y de Bont, 1994).

1.1. Propiedades químicas

La estructura del grupo nitro puede ser representada como un híbrido de resonancia parecido a las estructuras de los zwitteriones polares iónicos. La estructura híbrida contiene un átomo de nitrógeno cargado positivamente y dos átomos de oxígeno cargados negativamente. Debido a la polaridad de los grupos nitro, los puntos de ebullición de los compuestos nitroderivados son inusualmente altos en comparación con otros compuestos de la misma masa molecular. Los nitroalcanos son poco solubles en agua (los miembros más ligeros son relativamente más solubles que los de alto peso molecular), y los compuestos nitroaromáticos son insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos. La presencia del grupo nitro en los compuestos fenólicos aumenta su acidez. La carga parcial positiva sobre el N del grupo $-\text{NO}_2$ causa una deficiencia electrónica en el anillo aromático, tanto mayor cuanto más elevado sea el número de grupos nitro. La carga parcial del anillo aromático también queda influenciada por la presencia de otros sustituyentes como $-\text{CH}_3$ (nitrotoluenos), $-\text{OH}$ (nitrofenoles), $-\text{COO}^-$ (nitrobenzoatos) o $-\text{NH}_2$ (aminoaromáticos). Algunos sustituyentes pueden aumentar aún más la carga parcial positiva del anillo ($-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$), mientras que otros la disminuyen ($-\text{Cl}$, $-\text{C}\equiv\text{N}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COO}^-$). Por lo tanto, la capacidad de reducción de los derivados nitroaromáticos está determinada por la naturaleza química de los otros sustituyentes del anillo (Roldan *et al.*, 2008). Así, la capacidad de reducción del grupo nitro por la acción de bacterias aumenta a medida que se incrementa el efecto atrayente de electrones cuando otro sustituyente se encuentra en la posición *para* según el orden: $-\text{NH}_2 < -\text{OH} < -\text{H} < -\text{CH}_3 < -\text{COOH} < -\text{NO}_2$ (McCormick *et al.*, 1976). Esto conlleva a que la reducción de un primer grupo $-\text{NO}_2$ a $-\text{NH}_2$ (que incrementa la densidad electrónica del anillo) dificulta la reducción de

otro grupo $-\text{NO}_2$. Por lo tanto, según esta regla, en el caso del 2,4-dinitrotolueno (DNT), el grupo nitro situado en la posición 4 (*para*) es el primero en reducirse, mientras que cuando se trata del 2,4-dinitrofenol (DNP), el grupo nitro en posición 2 (*orto*) se reduce primero (McCormick *et al.*, 1976; Roldan *et al.*, 2008).

1.2. Toxicidad

Muchos compuestos con grupo(s) nitro son tóxicos y/o mutagénicos, según revelan diversos estudios en varios organismos, incluyendo bacterias, algas, plantas, invertebrados y mamíferos (Won *et al.*, 1976; Kaplan y Kaplan, 1982; Spanggord *et al.*, 1985; Rieger y Knackmuss, 1995; Robidoux *et al.*, 1999; Schäfer y Achazi, 1999). Consecuentemente, varios compuestos nitroaromáticos (2,4-dinitrotolueno, 2,6-dinitrotolueno, nitrobenceno, 2,4-dinitrofenol, 2-nitrofenol, 4,6-dinitro-*o*-cresol, 4-nitrofenol) están incluidos como agentes contaminantes prioritarios, según la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos.

La toxicidad de los compuestos nitroaromáticos se asocia a los productos formados durante la reducción de los grupos nitro (Haack *et al.*, 2001; Šarlauskas *et al.*, 2004). Los derivados aromáticos hidroxilamino pueden reaccionar con las biomoléculas, incluyendo el DNA, causando efectos tóxicos y mutagénicos. Los efectos tóxicos se relacionan con el carácter electrofílico de estos derivados, mientras que los efectos mutagénicos son principalmente debidos a la formación de aductos de hidroxilamina por medio de la esterificación con la guanina (Corbett y Corbett, 1995). También, se ha propuesto que los efectos genotóxicos están asociados a los derivados de la hidroxilamina (Cramer *et al.*, 1960; Mastandrea *et al.*, 2005).

En mamíferos, los compuestos nitroaromáticos se transforman en metabolitos conjugados que son disociados y/o reducidos por la microflora intestinal. Las nitrorreductasas de la microflora intestinal presentan un papel clave en el metabolismo de los productos nitroaromáticos exógenos a los cuales se expone el hospedador. Los estudios en animales axénicos y no-axénicos han revelado la implicación de estas nitrorreductasas microbianas en la transformación de los compuestos nitroaromáticos en metabolitos carcinogénicos debido a la reducción de los grupos nitro, que produce los correspondientes derivados hidroxilamino (Blumer *et al.*, 1980). Los efectos mutagénicos pueden ser causados por la producción de arilhidroxilaminas o acetoxiarilaminas y el ion electrofílico nitrenio ($-N^+$), los cuáles pueden interactuar con el DNA (Fu, 1990). Algunos agentes químicos carcinogénicos derivados de los compuestos *N*-nitroso, como las *N*-nitrosodietilaminas (NDEA), necesitan ser metabolizados inicialmente por enzimas, como el citocromo P450, para inducir una actividad mutagénica. Así, las nitrorreductasas de la microflora intestinal estimulan la toxicidad mientras que las acetiltransferasas estimulan la mutagenicidad de la NDEA. Las nitrorreductasas también pueden neutralizar el mecanismo de la mutagenicidad generando compuestos inocuos, probablemente actuando sobre el producto que se genera después de activar la NDEA (Aiub *et al.*, 2006; Mittal *et al.*, 2008). El 1-nitropireno, clasificado como posible carcinogénico por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (Möller, 1994), es transformado a 1-aminopireno y *N*-formil-1-aminopireno (Manning *et al.*, 1986) a través de la hidroxilación del anillo aromático después de la reducción del grupo nitro por la microflora intestinal, debido a la acción del citocromo P450 (Hatanaka *et al.*, 2001). Sin embargo, la *N*-

acetilación de los derivados amino ocurre principalmente en el hígado (Kinouchi y Ohnishi, 1983).

En el caso de los dinitropirenos, los aductos de DNA se producen solamente cuando se reduce el grupo nitro, puesto que la oxigenación del anillo aromático es menos favorable en presencia de dos grupos nitro (Heflich *et al.*, 1985). Los efectos tóxicos se pueden producir como resultado de la reacción de arilaminas con otras moléculas, como la oxihemoglobina. Ambas, tanto la arilamina como la oxihemoglobina, se oxidan en presencia del oxígeno, formando un ciclo redox para producir ferrihemoglobina e hidroxilamina, que puede reaccionar otra vez con la oxihemoglobina (Singh *et al.*, 2007; Umbreit, 2007). Los nitrosoarenos, que son los productos de la ruta de oxidación de los grupos amino de las arilaminas, son electrófilos que reaccionan con los grupos sulfhidrilos de las proteínas, causando su inactivación debido a la formación de aductos sulfonamidas (Liu *et al.*, 2008).

También se ha descrito la genotoxicidad y la carcinogenicidad potencial del TNT en seres humanos expuestos a este explosivo y se ha encontrado la formación de aductos de hemoglobina por amino-derivados del TNT (Won *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 2005). El ataque del TNT a las proteínas puede causar efectos citotóxicos en el hígado (Liu *et al.*, 1992). Además, algunos compuestos nitroaromáticos actúan como desacoplantes de la fosforilación oxidativa, inhibiendo la generación del gradiente electroquímico de protones, que es la fuerza motora requerida para la síntesis del ATP, como ocurre en el caso del 2,4-dinitrofenol y del ácido pícrico (Hanstein y Hatefi, 1974).

2. METABOLISMO DE COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS EN BACTERIAS

Algunos microorganismos son capaces de degradar compuestos xenobióticos, pudiendo en muchos casos mineralizarlos mediante rutas metabólicas que generan intermediarios o productos que pueden ser utilizados para el crecimiento del microorganismo (Fig. 3). En condiciones fisiológicas, las enzimas responsables de la transformación de los compuestos xenobióticos pueden tener una función metabólica determinada, diferente de la biodegradación del compuesto xenobiótico. Sin embargo, su amplia especificidad de sustrato les permite usar análogos de sus sustratos naturales (Somerville *et al.*, 1995). Todo esto, unido a la selección natural de los organismos con nuevas posibilidades de degradación, constituye el proceso por el cual los microorganismos se han adaptado a la degradación de los compuestos xenobióticos (Alexander, 1981). Si bien el grupo nitro

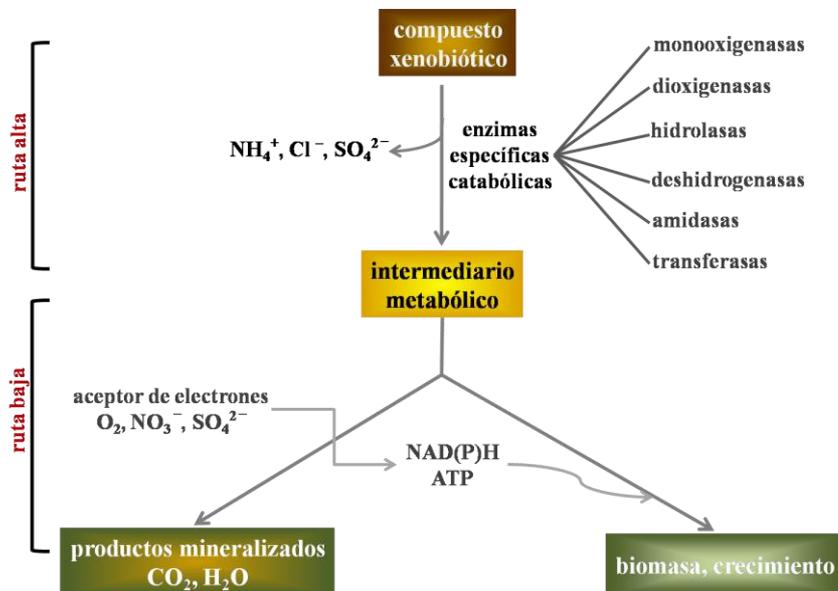


Figura 3. Esquema general de la biodegradación de compuestos xenobióticos. Ruta alta: pérdida del carácter xenobiótico; Ruta baja: metabolismo central.

aumenta la resistencia del anillo aromático a la biodegradación, diversos autores han descrito estirpes bacterianas capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono, liberando nitrito al medio. Entre estas cepas se incluyen especies pertenecientes a los géneros *Arthrobacter* (Chauhan *et al.*, 2000), *Bacillus* (Kadiyala *et al.*, 1998), *Pseudomonas* (Zeyer *et al.*, 1986), *Burkholderia* (Bhushan *et al.*, 2000), *Rhodobacter* (Roldán *et al.*, 1998), *Sphingomonas* (Zablotowicz *et al.*, 1999), *Nocardioides* (Ebert *et al.*, 1999) y *Rhodococcus* (Lenke *et al.*, 1992).

En general, los compuestos nitroaromáticos pueden ser degradados a través de dos tipos diferentes de mecanismos dependiendo del número de sustituyentes nitro del anillo: uno de ellos es el mecanismo oxidativo típico de compuestos mononitroaromáticos y el otro es el mecanismo reductivo que ocurre frecuentemente en los compuestos polinitroaromáticos (Rieger y Knackmuss, 1995; Roldan *et al.*, 2008). La oxidación de los compuestos nitroaromáticos ocurre en aerobiosis (Spain *et al.*, 1979; Zeyer *et al.*, 1986; Spain, 1995a); sin embargo, la reducción de los compuestos nitroaromáticos ocurre tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Hallas y Alexander, 1983) (Fig. 4).

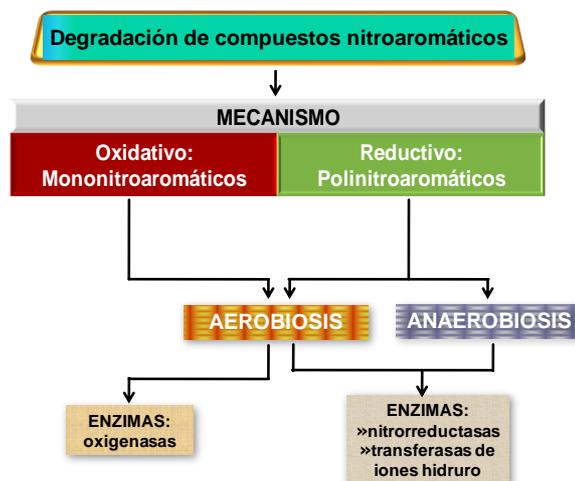


Figura 4. Transformación bioquímica de los compuestos nitroaromáticos.

La presencia de los grupos nitro en el anillo dificulta el ataque oxidativo y favorece el mecanismo reductivo. En compuestos mononitroaromáticos sustituidos la ruta inicial preferida es hidroxilación sobre el anillo realizada por mono o dioxigenasas. La presencia de dos o más grupos nitro determina una mayor resistencia a la oxidación. Por lo tanto, los compuestos polinitroaromáticos son degradados a través de rutas reductivas (Roldan *et al.*, 2008).

2.1. Metabolismo oxidativo

El mecanismo oxidativo para la degradación de los compuestos nitroaromáticos ha sido ampliamente estudiado (Spain *et al.*, 1979; Spain, 1995a; 1995b). La estirpe *Moraxella* sp. utiliza el 4-nitrofenol como única fuente de carbono y de nitrógeno a través de la catálisis inicial mediante una monooxigenasa y una posterior eliminación del grupo nitro en forma de nitrito (Spain y Gibson, 1991). También existen reacciones similares de monooxigenasas en las estirpes *Arthrobacter* sp. JS443 y *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 que eliminan el grupo nitro del 4-nitrocatecol o del 4-nitrofenol antes de la rotura del anillo aromático (Jain *et al.*, 1994; Chauhan *et al.*, 2000). Las estirpes *Pseudomonas putida* B2 y *Alcaligenes* sp. NyZ215 también emplean monooxigenasas para la hidroxilación en posición *orto* del anillo y la eliminación del grupo nitro del *o*-nitrofenol, formando catecol que posteriormente sufre una rotura del anillo aromático por la acción de una dioxigenasa (Zeyer *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 2007). Por lo tanto, el ataque por una monooxigenasa sobre un compuesto nitroaromático puede implicar el reemplazo del grupo nitro por un grupo hidroxilo, aunque también se puede hidroxilar el anillo sin salida del grupo nitro (Fig. 5a).

El segundo mecanismo oxidativo implica la acción de una dioxigenasa que da lugar a la adición simultánea de dos grupos

hidroxilos (Fig. 5b). El mecanismo oxidativo de las dioxigenasas se ha encontrado en las rutas de biodegradación del 2,4–dinitrotolueno (Spangord *et al.*, 1991), 1,3–dinitrobenzono (Dickel y Knackmuss, 1991), 3–nitrobenzoato (Nadeau y Spain, 1995), 2–nitrotolueno (An *et al.*, 1994; Haigler *et al.*, 1994) y nitrobenzono (Caravatti, 2007). En la figura 6 se muestra el mecanismo de transferencia electrónica de la nitrobenzono dioxigenasa, una enzima que contiene un átomo de hierro en el sitio activo (Caravatti, 2007). Sin embargo, la oxidación de compuestos dinitroaromáticos tales como el 2,4–dinitrotolueno (DNT) se ha demostrado solamente en pocas ocasiones (Heidi *et al.*, 2000).

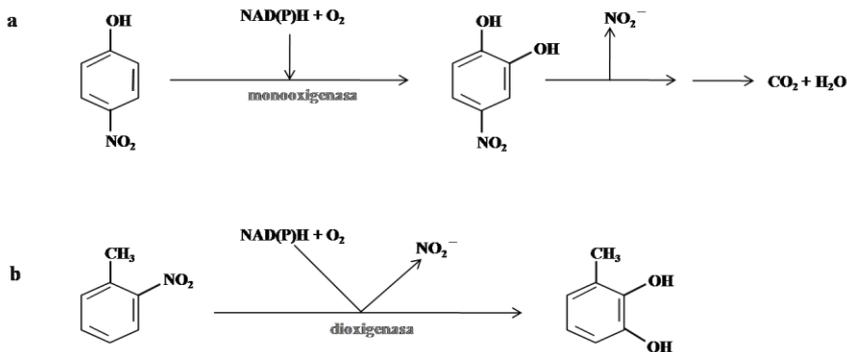


Figura 5. Rutas aeróbicas oxidativas de degradación del anillo aromático de los compuestos nitroaromáticos. (a) conversión de *p*-nitrofenol a nitrocatecol y su posterior degradación y (b) conversión de *o*-nitrotolueno a metilcatecol (Castillo *et al.*, 2005).

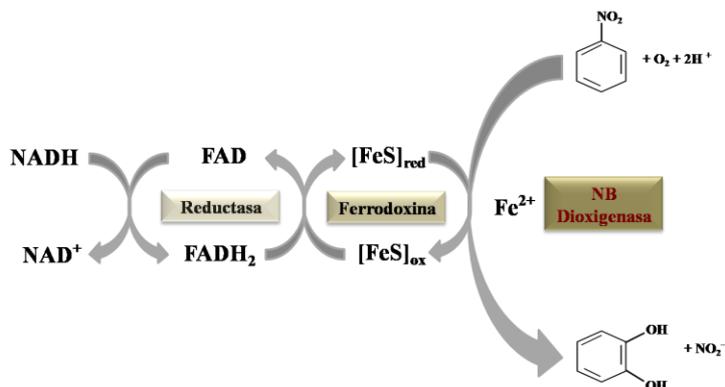


Figura 6. Mecanismo de transferencia de electrones de la nitrobenzono dioxigenasa de *Comamonas* sp. JS765.

2.2. Metabolismo reductivo

El carácter atrayente de electrones del grupo nitro favorece los procesos reductivos dando lugar, bien a la reducción del anillo mediante la adición de iones hidruros, o bien a la reducción de grupo nitro para obtener los derivados nitroso, hidroxilamino o amino. El nitrito o el amonio liberado del anillo aromático por vías degradativas pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno para el crecimiento bacteriano (Roldán *et al.*, 2008) (Fig. 7).

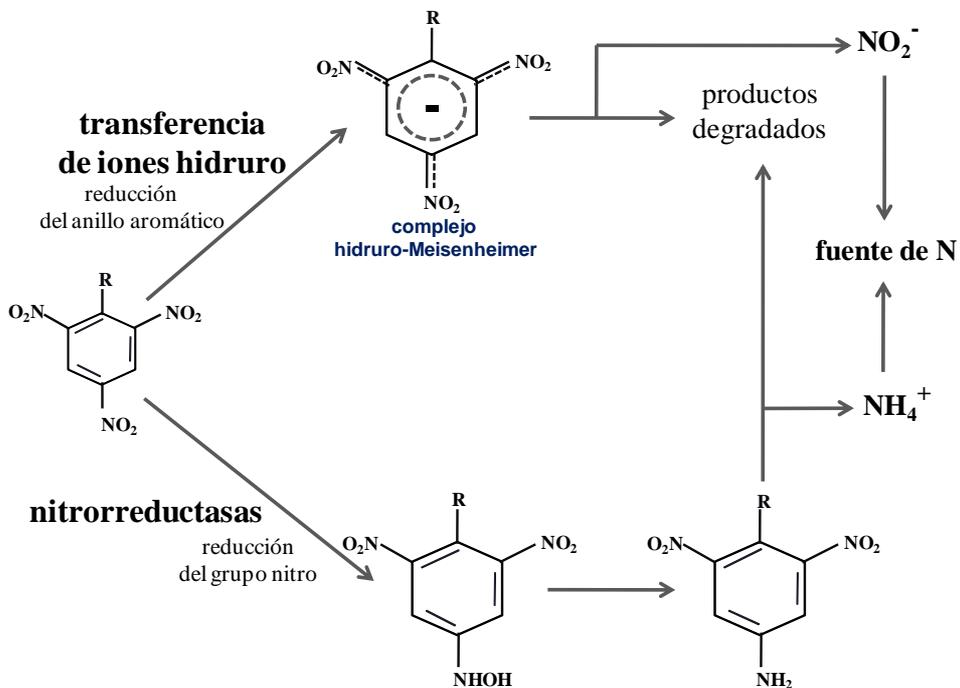


Figura 7. Reducción de los compuestos nitroaromáticos. Reducción del anillo aromático (arriba) y reducción del grupo nitro (abajo) (adaptada de Roldán *et al.*, 2008).

Las hidruro transferasas generan complejos hidruro-Meisenheimer que se pueden metabolizar posteriormente, generalmente con liberación de nitrito (Nishino y Spain, 1993). La participación de

este tipo de complejos en el metabolismo bacteriano de los compuestos polinitroaromáticos ha sido descrita por varios autores, principalmente en estirpes de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium* (Haïdour y Ramos, 1996; French *et al.*, 1998; Vorbeck *et al.*, 1998; Rieger *et al.*, 1999). Este tipo de proceso reductivo del anillo aromático no solamente ocurre en el metabolismo del ácido pícrico sino también en el del TNT en aerobiosis (Haïdour y Ramos, 1996). Los complejos de Meisenheimer (Fig. 8) presentan una intensa coloración roja-anaranjada en solución, y una carga negativa deslocalizada sobre el anillo y los grupos nitro.

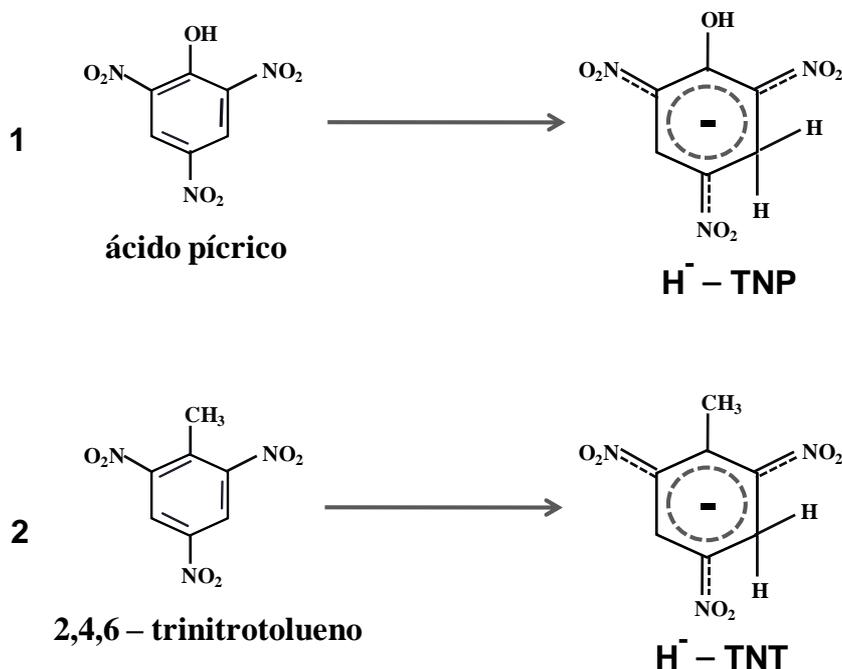


Figura 8. Reducción del anillo aromático y formación de complejos hidruro–Meisenheimer. (1) A partir del ácido pícrico; (2) a partir del TNT.

Estudios realizados para determinar la función de los genes *npd* en *Rhodococcus (opacus) erythropolis* HL PM–1 (Heiss *et al.*, 2002) han demostrado que la enzima hidruro–transferasa II (NpdI) cataliza una

hidrogenación inicial del ácido pícrico para dar un complejo hidruro–Meisenheimer (H^- -TNP), y a continuación la enzima hidruro–transferasa I (NpdC) cataliza una segunda hidrogenación que forma el complejo dihidruro–Meisenheimer (2H^- -TNP). La proteína NpdH de *R. opacus* es una tautomerasa que cataliza el equilibrio entre las formas nitro y *aci*-nitro del complejo 2H^- -TNP. Las reacciones catalizadas por las hidruro–transferasas NpdI y NpdC requieren la participación de una F420 reductasa dependiente de NADPH codificada por el gen *npdG* (Ebert *et al.*, 2002) (Fig. 9).

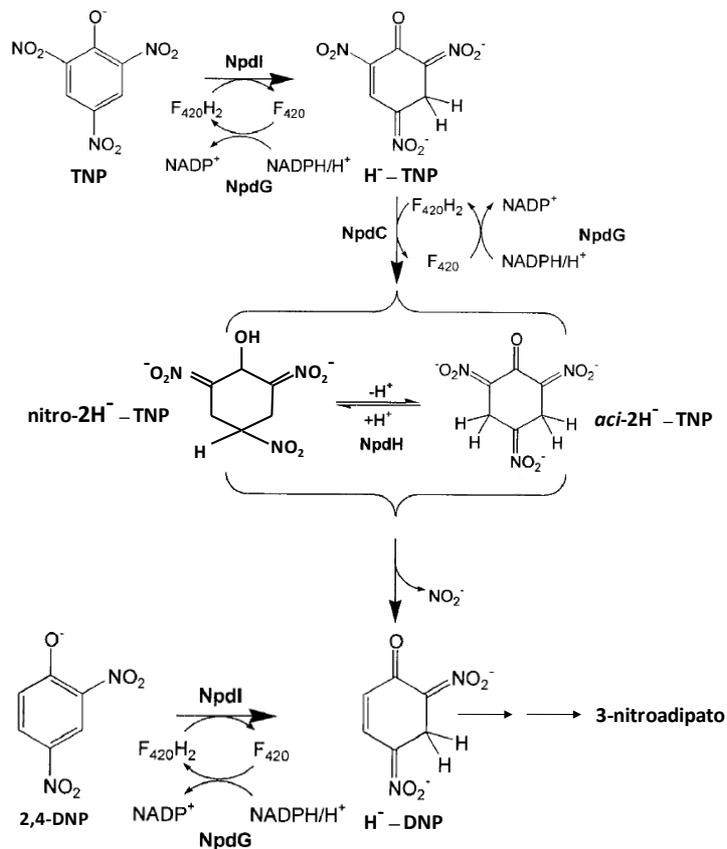


Figura 9. Hidruro–transferasas de *Rhodococcus (opacus) erythropolis* HL PM-1 implicadas en la ruta de degradación del ácido pícrico. Adaptada de Ebert *et al.*, 2002.

También *Nocardioides simplex* FJ2-1 contiene una hidruro transferasa denominada HTES (hydride transferring enzyme system) implicada en la transferencia del ion hidruro (H^-) al anillo aromático del ácido pícrico que igualmente produce H^- -TNP (Ebert *et al.*, 1999). Esta enzima HTES de *N. simplex* FJ2-1 también cataliza la transferencia del segundo ion hidruro transformando el complejo H^- -TNP en $2H^-$ -TNP.

Sucesivas adiciones de iones H^- sobre la molécula de TNT también podrían generar complejos dihidruros-TNT (Vorbeck *et al.*, 1998). Una tautomerización dependiente del pH en el complejo dihidruro-Meisenheimer del TNT ($2H^-$ -TNT) también se ha observado en *R. opacus* HL PM-1 (Vorbeck *et al.*, 1998). Otros estudios también han descrito la formación de tautómeros $2H^-$ -TNT, y sugieren que esto podría llevar a la eliminación de los grupos nitro y a la degradación efectiva del TNT (Pak *et al.*, 2000; Kim y Song, 2005).

3. LAS NITRORREDUCTASAS

Los compuestos polinitroaromáticos también pueden ser reducidos a derivados hidroxilamino o aminoaromáticos por numerosas bacterias anaerobias y aerobias que poseen nitrorreductasas (Foster y Crosby, 1987; Orna y Mason, 1989; Roldan *et al.*, 2008). Estos compuestos, principalmente los derivados hidroxilamino, suelen ser mutagénicos y citotóxicos (Roldan *et al.*, 2008).

Las nitrorreductasas (NR) son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en bacterias, archaea y algunos organismos eucariotas (Marques de Oliveira *et al.*, 2007). Son flavoproteínas dependientes de NAD(P)H, que es utilizado como donador fisiológico de electrones para la reducción del grupo nitro presente en una gran variedad de sustratos,

produciendo los derivados hidroxilamino o amino correspondientes, así como también para la reducción de quinonas y flavinas (Zenno *et al.*, 1996b; Choi *et al.*, 2008). El cofactor flavínico de las nitrorreductasas es el FMN (Bryant *et al.*, 1981; Choi *et al.*, 2008; Roldan *et al.*, 2008). La actividad nitrorreductasa también se asocia a una diversidad de enzimas, incluyendo la xantina oxidasa, la aldehído oxidasa, varias flavoproteínas, la NADPH–citocromo P450 reductasa y el citocromo P450. Las isoenzimas principales del citocromo P450 (CYP) que exhiben actividad nitrorreductasa son las isoenzimas CYP1A2, CYP3A4 y CYP2B10 (Zbaida, 2002).

3.1. Tipos y mecanismos de reducción

Se han descrito dos tipos de nitrorreductasas según su respuesta al oxígeno (Asnis, 1957; Bryant *et al.*, 1981; Spain, 1995a; Roldan *et al.*, 2008) (Fig. 10).

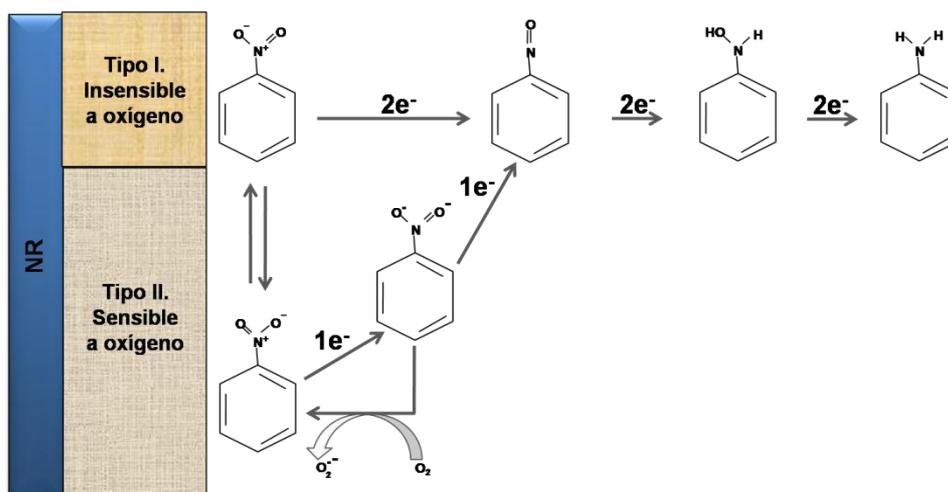


Figura 10. Tipos de nitrorreductasas. La reducción mediante adición de pares de electrones es realizada por nitrorreductasas insensibles a oxígeno (tipo I) y da lugar a los intermediarios nitroso, hidroxilamino y amino. La reducción con un electrón mediante nitrorreductasas sensibles a oxígeno (tipo II) da lugar a un radical nitro anión que puede volver a reoxidarse en presencia de oxígeno, generando el radical anión superóxido.

Las nitrorreductasas tipo I, insensibles a oxígeno, catalizan la adición sucesiva de pares de electrones a los grupos nitro de una amplia variedad de sustratos. La caracterización bioquímica de las enzimas de enterobacterias se puede tomar como modelo para entender a este tipo de nitrorreductasas. Las nitrorreductasas insensibles a oxígeno son muy específicas para transferir dos electrones debido a que los potenciales del cofactor flavínico en estas enzimas tienden a suprimir la formación de la semiquinona tanto en la enzima libre como en el complejo enzima-sustrato (Koder *et al.*, 2002), pero según la enzima y el sustrato utilizado, en algunas nitrorreducciones el derivado hidroxilamino es el producto final en lugar del correspondiente amino. Entre estas enzimas insensibles a O₂ están la mayoría de las nitrorreductasas bacterianas (Bryant *et al.*, 1981; Spain, 1995a; Roldan *et al.*, 2008), la DT-diaforasa o NAD(P)H quinona reductasa (Horie *et al.*, 1982; Kutcher y McCalla, 1984; Riley y Workman, 1992) y la xantina oxidasa de mamíferos (Kutcher y McCalla, 1984; Ueda *et al.*, 2003).

Las nitrorreductasas tipo II son sensibles a oxígeno ya que catalizan la reducción del grupo nitro mediante la adición inicial de un electrón, formando un radical nitro anión que en presencia de oxígeno puede formar el radical anión superóxido, regenerándose el compuesto nitroaromático de partida (Koder *et al.*, 2002). Así, la sensibilidad a oxígeno de las nitrorreductasas tipo II es el resultado de la oxidación aeróbica del anión nitroaromático formado (Mason y Holzman, 1975a,b; Spain, 1995a). Además de algunas nitrorreductasas bacterianas, ciertas enzimas de mamíferos catalizan este tipo de reducción, como la NADPH:citocromo P450 reductasa (Holzman *et al.*, 1981; Moreno *et al.*, 1984; Orna y Mason, 1989), la ferredoxina:NADP⁺ reductasa (Yarlett *et al.*, 1985; Orna y Mason, 1989; Anusevičius *et al.*, 1997; Miskiniene *et al.*, 1998) y la NADH:ubiquinona reductasa (Smyth y

Orsi, 1989; Bironaitè *et al.*, 1991). Estas nitrorreductasas de mamíferos pueden reducir compuestos polinitroaromáticos a radical nitroanión, como primer intermediario, y se ha descrito que pueden activar a varios profármacos biorreducibles (Fouts y Brodie, 1957; McCalla *et al.*, 1971; Mason y Holtzman, 1975b; Aiub *et al.*, 2006). Así, la ferredoxina:NADP⁺ oxidorreductasa y la NADPH–citocromo P450 reductasa reducen compuestos nitroheterocíclicos a radical nitroanión, y subsecuentemente se produce el radical anión superóxido y la regeneración del grupo nitro (Wardman y Clarke, 1976; Orna y Mason, 1989).

Aunque las bacterias pueden poseer nitrorreductasas de ambos tipos, las más estudiadas son las de tipo I, insensibles a oxígeno, que catalizan la reducción de una gran variedad de compuestos nitroaromáticos mediante la adición pares de electrones formando intermediarios nitroso (–NO) e hidroxilamino (–NHOH) y, finalmente, el producto amino–derivado (–NH₂) (Nishino y Spain, 1993; Roldan *et al.*, 2008). Así, por ejemplo, la reducción aeróbica del nitrobenceno por la enzima nitrobenceno reductasa de la estirpe *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 se lleva a cabo mediante la adición de pares de electrones formando los intermediarios nitrosobenceno e hidroxilaminobenceno (Nishino y Spain, 1993; Johnson y Spain, 2003) (Fig. 11). Sin embargo, a diferencia de otras nitrorreductasas, la nitrobenceno reductasa purificada de la estirpe JS45 forma el derivado hidroxilamino como producto mayoritario, en lugar del amino correspondiente (Sommerville *et al.*, 1995).

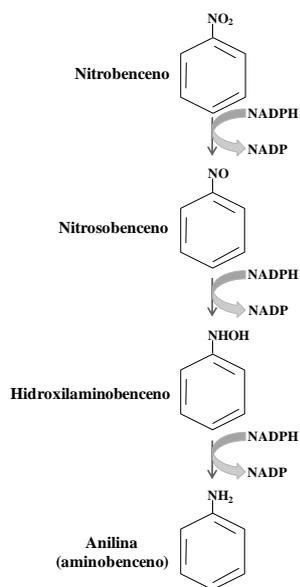


Figura 11. Reducción del nitrobenceno catalizada por la nitrobenceno reductasa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. El proceso se realiza mediante la adición secuencial de pares de electrones del NADPH (Nishino y Spain, 1993; Johnson y Spain, 2003).

3.2. Distribución biológica y propiedades bioquímicas

Las nitrorreductasas fueron descritas por primera vez en bacterias capaces de reducir el cloramfenicol y el ácido *p*-nitrobenzoico a sus respectivos aminoderivados (Saz y Martínez, 1956). Posteriormente, se caracterizó parcialmente la actividad nitrorreductasa de la bacteria *Nocardia erythropolis* CA2 cultivada con *p*-nitrobenzoato (Cartwright y Cain, 1959a, b). Esta actividad presente en extractos acelulares también catalizaba la reducción del *p*-nitrofenol usando como reductor NADH. La nitrorreductasa fue purificada hasta homogeneidad por primera vez a partir de la estirpe V de *Nocardia* (Villanueva, 1964). La enzima era muy inestable, tenía una masa molecular de 24 kDa, utilizaba NADH como donador de electrones y también catalizaba la reducción de *p*-dinitrobenceno a *p*-nitroanilina.

Las nitrorreductasas de las bacterias entéricas *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Enterobacter cloacae*, conocidas como nitrorreductasas “clásicas” también han sido purificadas y sus genes han sido clonados (Bryant *et al.*, 1981; Watanabe *et al.*, 1990; Bryant y Deluca, 1991; Bryant *et al.*, 1991; Zenno *et al.*, 1996a, b, c; Watanabe *et al.*, 1998). Además, se han descrito las nitrorreductasas de otras bacterias como *Synechocystis* (Elanskaya *et al.*, 1998), *Vibrio fischeri* (Zenno *et al.*, 1994), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Sommerville *et al.*, 1995) o *Rhodobacter capsulatus* (Blasco y Castillo, 1993; Pérez-Reinado *et al.*, 2005, 2008), entre otras (Tabla 1).

Tabla 1. Nitrorreductasas bacterianas tipo I o insensibles a oxígeno más relevantes. Adaptado de Roldán *et al.*, 2008.

Nombre de la bacteria y la NR	Monómero (kDa)	Especificidad de sustrato	Donador de electrones	Referencias
<i>Escherichia coli</i> NfsA	27	Nitrofurazona y otros compuestos nitroderivados	NADPH	Bryan <i>et al.</i> , 1981 Zenno <i>et al.</i> , 1996a Zenno <i>et al.</i> , 1998a
<i>Escherichia coli</i> NfsB	24	Nitrofurazona y diferentes compuestos nitroderivados (incluyendo CB1954 y CL20), cromato	NAD(P)H	Bryan <i>et al.</i> , 1981 Zenno <i>et al.</i> , 1996b Zenno <i>et al.</i> , 1996c
<i>Escherichia coli</i> K12 YdjA	20	Desconocido	NAD(P)H	Choi <i>et al.</i> , 2008
<i>Salmonella enterica</i> Cnr	24	Diferentes compuestos nitroderivados (<i>p</i> -nitrofenol, <i>p</i> -nitrobenzoato, 1-nitropireno), 2-aminofluoreno, menadiona, flavinas	NAD(P)H	Watanabe <i>et al.</i> , 1990 Watanabe <i>et al.</i> , 1998
<i>Salmonella enterica</i> SnrA	28	Diferentes compuestos nitroderivados nitrofuranos, nitrobenzenos, quinonas, nitroimidazoles, TNT	NADPH	Nokhbeh <i>et al.</i> , 2002
<i>Enterobacter cloacae</i> NR	27	Nitrofuranos, nitrobenzenos, quinonas, nitroimidazoles, TNT	NAD(P)H	Bryan y DeLuca, 1991 Koder y Miller, 1998
<i>Klebsiella</i> sp. NTR I	27	TNT, 2,4-dinitrotolueno	NAD(P)H	Kim <i>et al.</i> , 2003 Kim y Song, 2005
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> NbzA	30	Nitrobenzeno, TNT, 4-nitrobifenil éter	NADPH	Sommerville <i>et al.</i> , 1995 Fiorella y Spain, 1997 Nadeau y Spain, 2000
<i>Pseudomonas putida</i> PnrA	28	TNT, 2,4-dinitrotolueno, 4-nitrotolueno, 4-nitrobenzoato, 3,5-dinitroanilina	NADPH	Caballero <i>et al.</i> , 2005
<i>Vibrio fischeri</i> FRaseI	25	FMN, quinonas, diferentes compuestos nitroderivados	NAD(P)H	Zenno <i>et al.</i> , 1994
<i>Vibrio harveyi</i> FRP	26	FMN, diferentes compuestos nitroderivados, cromato	NADPH	Lei <i>et al.</i> , 1994
<i>Synechocystis</i> sp. DrgA	26	Flavinas, quinonas, ion férrico, nitrofurazona, dinoseb	NAD(P)H	Matsuo <i>et al.</i> , 1998 Takeda <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhodobacter capsulatus</i> NprA	27	2,4-dinitrofenol y varios compuestos nitroderivados	NAD(P)H	Blasco y Castillo, 1993 Pérez-Reinado <i>et al.</i> , 2005 Pérez-Reinado <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus subtilis</i> YwrO	22	CB 1954	NAD(P)H	Anlezark <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus subtilis</i> NfrA1(YwcG)	29	Flavinas, nitrofurazona, nitrofurantoína	NADPH	Zenno <i>et al.</i> , 1998b
<i>Staphylococcus aureus</i> NfrA	29	Flavinas, nitrofurazona, nitrofurantoína	NADPH	Streker <i>et al.</i> , 2005
<i>Clostridium acetobutylicum</i> NitA	31	TNT, 2,4-dinitrotolueno	NADH	Kutty y Bennett, 2005
<i>Clostridium acetobutylicum</i> NitB	23	TNT, 2,4-dinitrotolueno	NAD(P)H	Kutty y Bennett, 2005

La existencia de más de una proteína con actividad nitrorreductasa en un mismo organismo es algo habitual. *E. coli* presenta al menos tres nitrorreductasas tipo I (Bryant *et al.*, 1981), como NfsA (Zenno *et al.*, 1996a), NfnB/NfsB (Zenno *et al.*, 1996b) y la proteína YdjA (Choi *et al.*, 2008), además de otras nitrorreductasas tipo II (Asnis, 1957). En *Salmonella enterica* se han caracterizado dos nitrorreductasas: SnrA, homóloga a NfsA (Nokhbeh *et al.*, 2002) y Cnr, homóloga a NfsB (Watanabe *et al.*, 1998). En *Bacteroides fragilis*, una bacteria de la flora intestinal, se han aislado, purificado y caracterizado parcialmente cuatro nitrorreductasas (Kinouchi y Ohnishi, 1983). Estas nitrorreductasas presentes en la microflora intestinal humana son de especial interés ya que juegan un papel fundamental en el metabolismo de los compuestos extraños a los que está expuesto el hospedador.

Las nitrorreductasas de tipo I se engloban en dos grandes familias: la familia A, a la que pertenecen entre otras NfsA y SnrA de *E. coli* y *S. enterica* (*typhimurium*), respectivamente, y la familia B, que incluye a su vez a tres subfamilias. Una de estas subfamilias (B1) englobaría a las nitrorreductasas clásicas de bacterias entéricas homólogas a NfsB de *E. coli*, otra (B2) comprendería la nitrorreductasa NprA de *R. capsulatus* y las de *A. tumefaciens* y *C. crescentus*, que presentan un alto porcentaje de identidad entre sí, y una tercera (B3) incluiría a la nitrorreductasa NprB de *R. capsulatus* y sus homólogos, como YdjA de *Salmonella* y *E. coli* (Fig. 12). Sin embargo, estas proteínas homólogas a NprA o a NprB no han sido caracterizadas y su posible función como nitrorreductasas sólo se ha propuesto por la similitud de sus secuencias (Pérez–Reinado, 2005; Roldán *et al.*, 2008).

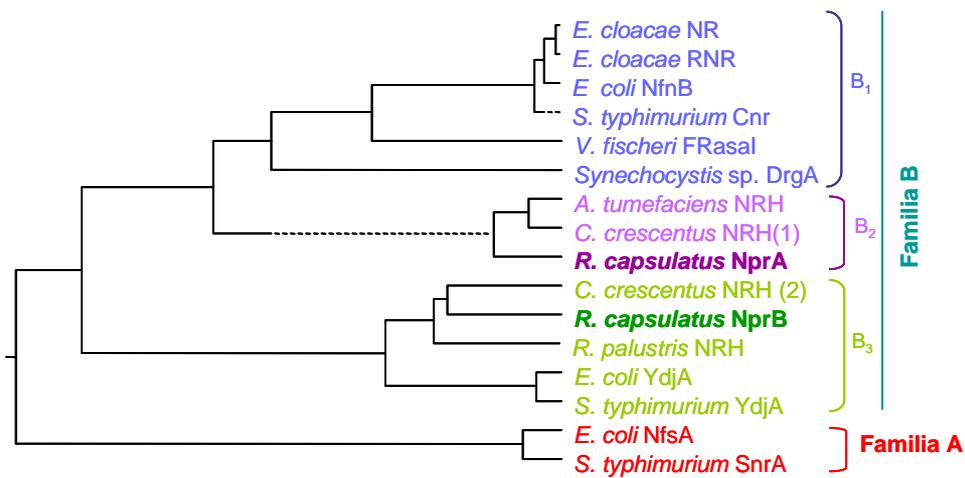


Figura 12. Árbol filogenético de las nitrorreductasas. Las nitrorreductasas bacterianas insensibles a oxígeno se encuentran divididas principalmente en dos familias, en base a la homología que presentan con NfnB y NfsA de *E. coli*. Según se representa en este árbol, la familia B podría estar a su vez subdividida en otras subfamilias (Pérez–Reinado, 2005; Roldán *et al.*, 2008).

Las nitrorreductasas bacterianas pueden estar implicadas en la reducción de diferentes compuestos nitroderivados. Las bacterias de los géneros *Clostridium* y *Desulfovibrio* pueden reducir TNT a triaminotolueno en anaerobiosis (Ahmad y Hughes, 2000). También se ha sugerido que algunas estirpes de *Clostridium* reducen TNT a hidroxilaminodinitrotoluenos para producir aminofenoles, mediante reagrupamiento Bamberger (Hughes *et al.*, 1998), que es un mecanismo por medio del cual una hidroxilamina de arilo sufre la rotura del enlace NH–OH para convertirse en un compuesto fenólico a través de un reagrupamiento intramolecular, donde el grupo –OH del derivado hidroxilamino pasa a la posición *orto* del anillo aromático catalizado por una mutasa (Sommerville *et al.*, 1995). La reducción biológica del TNT a 2-amino-4,6-dinitrotolueno (2-ADNT) y 4-amino-2,6-dinitrotolueno (4-ADNT), tanto en aerobiosis como anaerobiosis, es la ruta más común para la biotransformación del TNT, y varias enzimas con actividad

nitrorreductasa son las que catalizan estas reacciones (Leung *et al.*, 1995; Sims y Steevens, 2008) (Fig. 13).

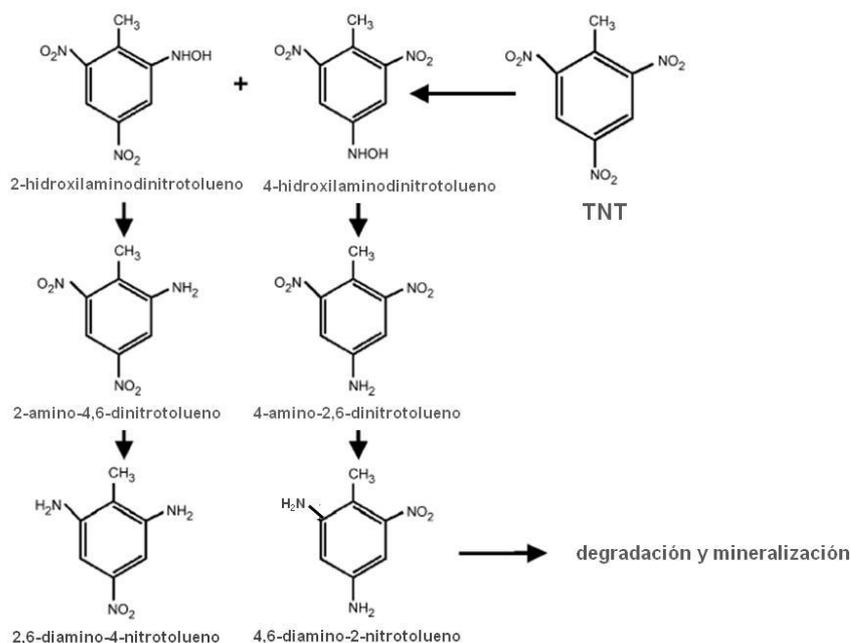


Figura 13. Rutas reductivas de degradación del TNT. Tomado de Sims y Steevens, 2008.

La reducción del cloramfenicol por *Haemophilus influenzae* en aerobiosis produce derivados anilínicos, a través de los intermediarios nitroso e hidroxilamino. Esta ruta de reducción difiere de las otras que ya han sido estudiadas en estirpes como *Pseudomonas*, *Ralstonia* spp. y *Rhodobacter capsulatus* porque en estos organismos la reducción del grupo nitro a hidroxilamino es seguida por la catálisis de la enzima mutasa que produce un derivado *o*-aminofenólico. Aunque las enzimas responsables todavía no han sido caracterizadas, se sugiere que el primer paso de la ruta reductiva del cloramfenicol podría ser catalizada por una nitrorreductasa tolerante a oxígeno similar a la enzima FrxA de *Helicobacter pylori* o a las enzimas de *Escherichia coli* (Smith *et al.*, 2007) (Fig. 14).

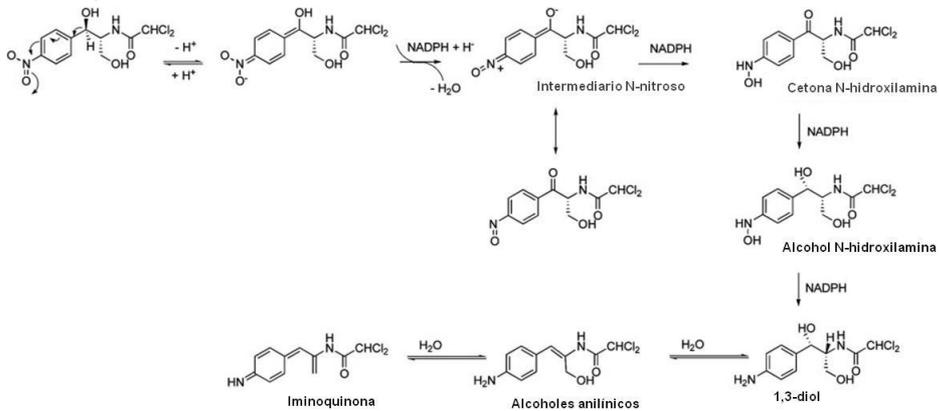


Figura 14. Ruta de reducción del cloramfenicol por nitrorreductasas de *Haemophilus influenzae*. Tomado de Smith *et al.*, 2007.

3.3. Estructuras cristalográficas

En los últimos años se han obtenido grandes avances en el conocimiento de la relación estructura–función de algunas flavoenzimas. Por lo general, esto ha sido posible gracias al análisis de sus estructuras cristalográficas (Fraaije y Mattevi, 2000), a los estudios por mutagénesis dirigida y a simulaciones moleculares con sustratos e inhibidores (Friesner y Beachy, 1998).

En la actualidad, se dispone de la estructura cristalográfica de unas 200 flavoproteínas que poseen FAD o FMN como cofactor (Ferreira, 2004). Entre otras, se conocen las estructuras cristalográficas de complejos enzima–sustrato o enzima–inhibidor de algunas oxidasas, tales como *p*–hidroxibenzoato hidroxilasa/*p*–hidroxibenzoato (Schreuder *et al.*, 1989, 1990), colesterol oxidasa/D–hidroisoandrosterona (Li *et al.*, 1993), D–aminoácido oxidasa/D–aminobenzoato (Mattevi *et al.*, 1996) y vainillil–alcohol oxidasa/4–(1–heptenil)fenol (Mattevi *et al.*, 1997). Para la glucosa oxidasa se ha modelado el sustrato en su centro activo (Meyer *et al.*, 1998). Sin embargo, no existe una clara relación entre la estructura general y la función de estas proteínas. Así, flavoproteínas con

topologías similares presentan propiedades funcionales distintas. Por ejemplo, oxidasas de tipo D-aminoácido oxidasa y colesterol oxidasa (Mattevi *et al.*, 1996; Mizutani *et al.*, 1996; Mattevi, 2006) poseen una topología similar en su dominio de unión al FAD (Mattevi, 1998) con hidroxilasas (*p*-hidroxibenzoato hidroxilasa) y oxidorreductasas como la fumarato reductasa (Schreuder *et al.*, 1989; Mattevi *et al.*, 1999). Por el contrario, flavoenzimas funcionalmente relacionadas pueden llegar a tener topologías generales muy distintas como la vainillil-alcohol oxidasa y la aminoácido oxidasa (Mattevi *et al.*, 1997; Varela *et al.*, 2000). De todas formas, y a pesar de su amplia diversidad catalítica, se puede hablar de una serie de propiedades estructura-función comunes en las flavoenzimas de tipo deshidrogenasas (Fraaije y Mattevi, 2000).

Los modelos cristalográficos muestran como el sustrato se sitúa en frente del anillo de flavina a una distancia de unos 3,5 Å del N5, definiendo un ángulo con N5-N10 de 96–117°. Otra característica común es la existencia de un canal o cavidad por la que se accede al centro activo desde su superficie, permitiendo así la entrada de los sustratos. El centro activo suele estar protegido de la exposición al solvente por distintos mecanismos (Mattevi *et al.*, 1997). En D-aminoácido oxidasa, colesterol oxidasa y glicolato oxidasa (Stenberg y Lindqvist, 1997) existen lazos flexibles que actúan a modo de tapadera permitiendo la entrada de sustratos y la salida de los productos, o bloqueando el acceso al centro activo cuando su conformación esta cerrada. En otras enzimas, como la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa, el mismo anillo de flavina adopta una conformación “abierta” o “cerrada” que permite la unión del sustrato y la liberación del producto, respectivamente (Moran *et al.*, 1996).

El análisis cristalográfico de la estructura tridimensional del centro activo de la proteína Frp, una flavín reductasa de *Vibrio harveyi*,

ha revelado que es un dímero de subunidades que se interconectan con el cofactor de FMN unido en medio del dímero. El centro activo, incluyendo el cofactor FMN, está formado o rodeado por 18 residuos de aminoácidos, seis de los cuales son de una subunidad diferente a la de los 12 restantes. Los residuos Arg²²⁵ y Arg¹³³, que forman puentes de hidrógeno con el residuo Glu⁹⁹, probablemente desempeñan un papel importante en la orientación del sustrato en el sitio activo y podrían ser invariantes tanto en la nitrorreductasa NfsA de *E. coli* como en esta proteína Frp. La pérdida de estos puentes de hidrógeno podría permitir el acomodo correcto de moléculas grandes como el FMN en el centro activo. Sin embargo, esto no significa necesariamente que Glu⁹⁹, Arg¹³³ y Arg²²⁵ sean los únicos residuos que determinen la especificidad del sustrato ya que 16 de los 17 aminoácidos que rodean el cofactor de FMN son invariantes entre las proteínas Frp y NfsA. Por lo tanto, todo esto hace suponer que el centro activo de la proteína NfsA posee un patrón de puentes de hidrógeno muy parecido al de la proteína Frp (Fig. 15) (Zenno *et al.*, 1998a).

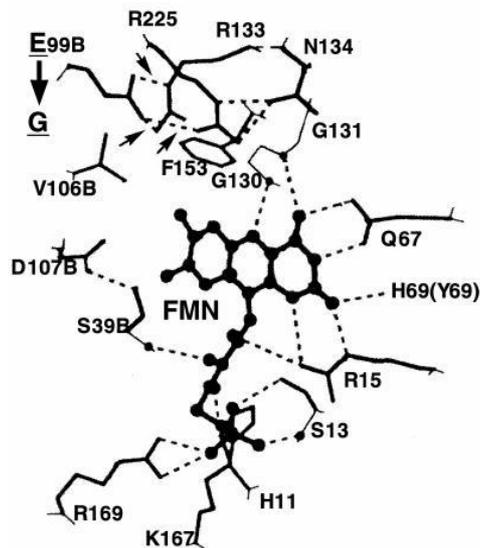


Figura 15. Centro activo de la flavín reductasa (Frp) de *Vibrio harveyi*. Tomado de Zenno *et al.*, 1998a.

Cuando se determinó la estructura cristalográfica de las enzimas NfsB de *E. coli* y NR de *Enterobacter cloacae* se comprobó que el sitio activo de estas enzimas permite alojar a un amplio número de sustratos, aunque su verdadero sustrato fisiológico no es conocido (Haynes *et al.*, 2002). La proteína NR también es un dímero que contiene el grupo prostético FMN situado entre ambas subunidades (Fig. 16).

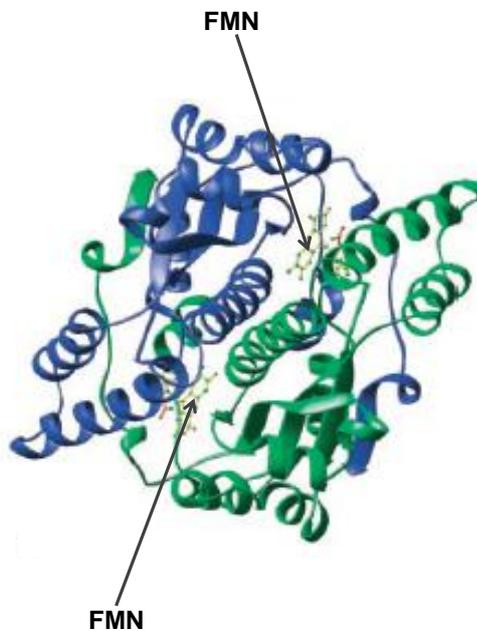


Figura 16. Estructura de la nitrorreductasa (NR) de *Enterobacter cloacae*. La figura muestra la organización dimérica de la nitrorreductasa con el grupo prostético (FMN) situado entre ambos monómeros (Haynes *et al.*, 2002).

El gen *ydjA* de *Escherichia coli* K12 codifica una posible nitrorreductasa, YdjA, con menos de 190 residuos de aminoácidos. Puesto que la mayoría de las nitrorreductasas se componen de unos 210 aminoácidos y forman un dominio globular $\alpha+\beta$ con regiones extendidas en ambos términos, la proteína YdjA de *E. coli* se puede considerar como una de las nitrorreductasas más pequeñas descritas hasta la fecha. La estructura de la nitrorreductasa YdjA de *E. coli* se ha publicado

recientemente y se asemeja a la nitrorreductasa NR de *Enterobacter cloacae* y a la NAD(P)H–flavín oxidorreductasa de *Helicobacter pylori* (Fig. 17). Su estructura dimérica activa proporciona un punto de enlace con el cofactor FMN y el sustrato en la interfase dimérica, donde el sitio activo está rodeado por estructuras secundarias rígidas (Choi *et al.*, 2008).

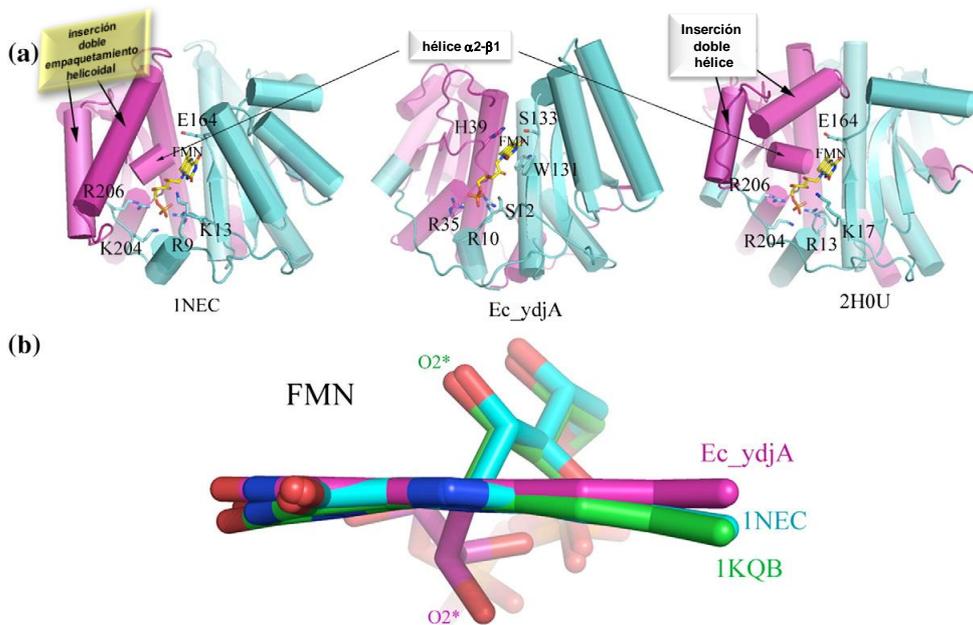


Figura 17. Estructuras cristalográficas de las nitrorreductasas NR de *Enterobacter cloacae* (1NEC), YdjA de *Escherichia coli* (Ec_ydjA) y NAD(P)H–flavín oxidorreductasa de *Helicobacter pylori* (2H0U). (a) Comparación de las estructuras de las tres proteínas y (b) de los anillos flavínicos de las nitrorreductasas YdjA de *Escherichia coli* (Ec_ydjA) y 1NEC y 1KQB (inhibidor benzoato) de *Enterobacter cloacae*. El anillo flavínico de la nitrorreductasa YdjA de *E. coli* conserva una conformación casi plana (Choi *et al.*, 2008).

Por otra parte, la familia de proteínas OYE (Old Yellow Enzyme) constituye un grupo de NADPH–oxidorreductasas flavín–dependientes que incluye reductasas que catalizan la degradación de ésteres de nitrato, como la trinitroglicerina (GTN) o el pentaeritritol

tetranitrato (PETN), que son transformados en nitrito y el correspondiente alcohol (Snape *et al.*, 1997; Williams y Bruce, 2002; Marshall *et al.*, 2004). La proteína OYE de *Saccharomyces carlsbergensis* fue la primera flavoenzima perteneciente a esta familia que se identificó (Warburg y Christian, 1933). Mucho más recientemente se ha estudiado el primer homólogo OYE (YqjM) de la bacteria gram-positiva *Bacillus subtilis* (Fitzpatrick *et al.*, 2003). La primera descripción de una enzima OYE capaz de metabolizar el TNT la realizaron Binks y colaboradores (1996), los cuales observaron que la enzima PETN reductasa de *Enterobacter cloacae* PB2 utilizaba TNT como sustrato, reduciéndolo hasta el complejo de Meisenheimer H^- -TNT, utilizando NADPH como donador de iones hidruro y liberando nitrito (Binks *et al.*, 1996; French *et al.*, 1998; Smets *et al.*, 2007). La proteína XenB (xenobiotic reductase B) de *Pseudomonas fluorescens* I-C, aislada por ser capaz de metabolizar la nitroglicerina (Bleher *et al.*, 1999), puede llevar a cabo un ataque reductivo del anillo del TNT similar al realizado por la PETN reductasa, con la consiguiente formación del complejo Meisenheimer (Pak *et al.*, 2000; Smets *et al.*, 2007). Algunas de estas enzimas de la familia OYE también poseen actividad nitrorreductasa y reducen los grupos nitro formando 2,4-dihidroxilamino-nitrotolueno (2,4-DHANT) como compuesto mayoritario, y en menor proporción, los isómeros 2- y 4-amino-2,6-dinitrotolueno (2- y 4-ADNT) (Williams *et al.*, 2004; Van Dillewijn *et al.*, 2008). El interés de las enzimas de la familia OYE en relación al metabolismo del TNT ha dado lugar a que se hayan resuelto las estructuras cristalográficas de seis miembros de la familia OYE: la trimetilamina deshidrogenasa de la bacteria metilotrófica W₃A₁ (Lim *et al.*, 1986), la proteína OYE de *Saccharomyces carlsbergensis* (Fox y Karplus, 1994), la PETN reductasa de *Enterobacter cloacae* (Barna *et*

al., 2001), la 12-oxofitodienoato reductasa del tomate (Breithaupt *et al.*, 2001), la morfina reductasa de *Pseudomonas* sp. (Barna *et al.*, 2002) y la proteína YqjM de *Bacillus subtilis* (Kitzing *et al.*, 2005). Con solamente un sitio activo accesible que contiene el cofactor FMN unido de forma no covalente, las enzimas OYE (Fig. 18) actúan a través de un mecanismo bi-bi ping-pong en el cual la coenzima NAD(P)H y el sustrato utilizan el mismo punto de enlace. El reductor fisiológico de la enzima es el NADPH (Williams y Bruce, 2002). Solamente la trinitroglicerina (GTN) reductasa y la metahemoglobina reductasa (MR) muestran una fuerte preferencia por el NADH (French y Bruce, 1995; Snape *et al.*, 1997).

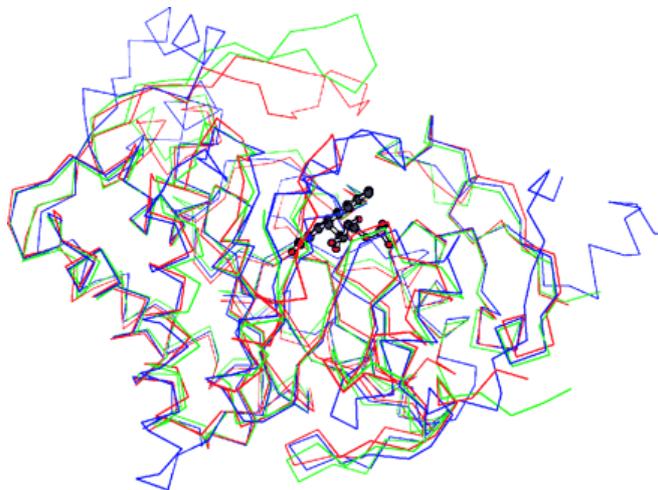


Figura 18. Estructuras de las proteínas OYE. Se muestran los esqueletos carbonados superpuestos de la proteína OYE, la 12-oxofitodienoato reductasa y la PETN reductasa, en azul, verde y rojo, respectivamente. El cofactor FMN se muestra en forma de bolas (Williams y Bruce, 2002).

3.4. Las nitrorreductasas de *Rhodobacter capsulatus*

Rhodobacter capsulatus es la única bacteria fotosintética en la que se han descrito varias nitrorreductasas (Pérez-Reinado *et al.*, 2005). El 2,4-DNP es reducido a 2-amino-4-nitrofenol (ANP) mediante una

nitrofenol reductasa que fue inicialmente caracterizada en la estirpe E1F1 (Blasco y Castillo, 1992; 1993). Esta nitrorreductasa de *R. capsulatus* E1F1 es un homodímero de 54 kDa, que contiene FMN como grupo prostético y utiliza tanto NADPH como NADH como donador de electrones, aunque muestra preferencia por el NADPH. Además, la enzima se inhibe por quelantes de metales como salicilhidroxamato y *p*-hidroximercuribenzoato, y por iones Cu^{2+} , lo que podría indicar la posible presencia de grupos sulfhidrilos en el sitio activo y la existencia de hierro no hemínico (Blasco y Castillo, 1992; 1993). Esta actividad nitrorreductasa se induce por diversos nitrofenoles y disminuye en presencia de amonio, y la purificación de la enzima revela además una actividad diaforasa que puede utilizar azul de nitrotetrazolio como aceptor de electrones (Blasco y Castillo, 1992; 1993).

Se han identificado al menos dos genes de *Rhodobacter capsulatus* B10 que codifican posibles nitrorreductasas. Uno de ellos, denominado *nprA*, codifica un polipéptido de 210 residuos de aminoácidos (unos 25 kDa), que constituye la principal nitrorreductasa dependiente de NADPH de *R. capsulatus*. La proteína NprA es un homodímero, con un FMN por subunidad, que utiliza NAD(P)H como donador de electrones. Esta enzima se puede englobar como un miembro de la familia B de las nitrorreductasas clásicas insensibles a oxígeno (homólogo a NfnB de *E. coli*). La expresión del gen *nprA* se induce por diversos compuestos aromáticos y heterocíclicos, entre ellos 2,4-DNP, TNP, salicilato y paraquat, y se regula negativamente por amonio y glutamina. El análisis de la secuencia del promotor de *nprA* presentó posibles elementos que se asemejan bastante a la secuencia consenso *mar/sox/rob* (Pérez-Reinado *et al.*, 2005), lo que indica que *nprA* podría pertenecer al regulón *mar/sox/rob*. La función fisiológica de esta proteína NprA parece ser la de actuar como una dihidropteridina

reductasa (Pérez–Reinado *et al.*, 2008), una enzima clave en el metabolismo de aminoácidos aromáticos, que en *R. capsulatus* se encuentra también bajo el control del regulón del amonio, a diferencia de otros aminoácidos cuya asimilación no es inhibida por el amonio.

R. capsulatus posee otra posible nitrorreductasa codificada por el gen *nprB* cuya expresión parece ser constitutiva (Pérez–Reinado *et al.*, 2005). Estudios de mutagénesis dirigida han permitido establecer que ambas nitrorreductasas, NprA y NprB, son necesarias para el proceso de reducción de los compuestos nitroaromáticos hasta compuestos aminoaromáticos en *R. capsulatus* (Pérez–Reinado *et al.*, 2005).

3.5. Importancia biotecnológica de las nitrorreductasas

El aumento de la contaminación del ambiente con los compuestos xenobióticos ha provocado la necesidad de entender el impacto de los compuestos tóxicos en las poblaciones microbianas, el camino catabólico de la degradación de estos xenobióticos y la mejora de los procesos de biorremediación. La adaptación de la comunidad microbiana nativa a los sustratos xenobióticos es de esta manera crucial para los procesos de mineralización en ambientes contaminados (Esteve–Núñez *et al.*, 2001). Las enzimas que catalizan la biodegradación de xenobióticos son producidas a menudo por procesos inducidos y éstos determinan posteriormente el tiempo de aclimatación a los sustratos xenobióticos. Los degradadores microbianos se adaptan a los sustratos xenobióticos mediante los mecanismos genéticos que determinan posteriormente la evolución de las rutas degradativas funcionales y la creación de nuevas combinaciones genéticas que facilitan la mineralización de xenobióticos (Black, 1999). El desarrollo reciente de las técnicas moleculares de alto rendimiento, tales como PCR, microarrays y bibliotecas metagenómicas, ha ayudado a desarrollar

aplicaciones de la diversidad genética entre microorganismos ambientalmente relevantes así como la identificación de nuevos genes funcionales que podrían aumentar el control de la disminución de la contaminación (Abayomi, 2007).

En el caso de las nitrorreductasas, han levantado un enorme interés no sólo por su uso potencial en biorremediación (Rieger y Knackmuss, 1995; Spain, 1995a; Rieger *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2005; Roldan *et al.*, 2008) y biocatálisis (Kadiyala *et al.*, 2003), sino también por su papel central en la mediación de la toxicidad, mutagenicidad y carcinogénesis de muchos compuestos nitroderivados (Beland y Kadlubar, 1990; Rafii *et al.*, 1991; Whiteway *et al.*, 1998; Padda *et al.*, 2003; Šarlauskas *et al.*, 2004) y por su capacidad de activación de varios profármacos (Fig. 19) utilizados en las terapias antitumorales dirigidas como las técnicas ADEPT, GDEPT y VDEPT (Knox *et al.*, 1993; Knox y Connors, 1997; Xu y McLeod, 2001; Denny, 2002; Knox *et al.*, 2003; Rooseboom *et al.*, 2004; Searle *et al.*, 2004; Roldan *et al.*, 2008).

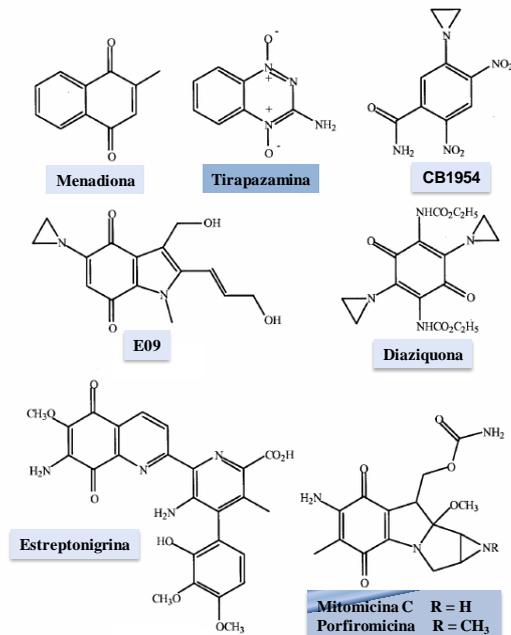


Figura 19. Profármacos bioreducibles que son activados por nitrorreductasas bacterianas. Tomado de Rooseboom *et al.*, 2004.

Estas técnicas son de dos tipos: las que introducen los genes bacterianos que codifican las enzimas que activan al profármaco en los tejidos del tumor (GDEPT y VDEPT) y las que dirigen las enzimas activas hacia los tejidos del tumor mediante su conjugación a anticuerpos específicos para células tumorales (ADEPT) (Fig. 20).

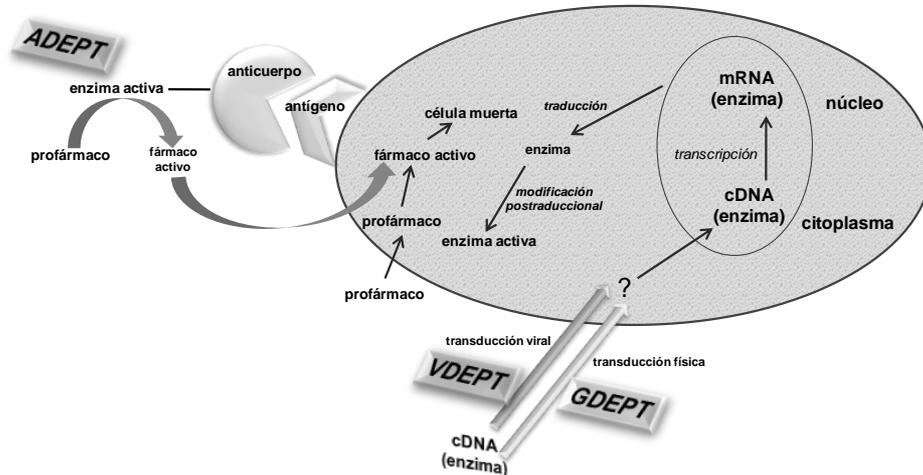


Figura 20. Esquema general de las terapias enzima/profármaco para determinados tipos de cáncer. Según Xu y McLeod, 2001.

Por otro lado, también es importante citar que las nitrorreductasas son las principales responsables de la resistencia a metronidazol desarrollada por *Helicobacter pylori*, el principal causante de úlcera gástrica y un factor de riesgo frente al adenocarcinoma y al linfoma gástrico (Gerrits *et al.*, 2004), así como de la resistencia desarrollada frente a algunos fármacos como los nitrofuranos y otros antibióticos (Whiteway *et al.*, 1998).

4. LAS BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS

Las eubacterias (dominio Bacteria) constituyen la mayoría de los organismos procariontes conocidos. Un aspecto importante de las

eubacterias es el hecho de que en este grupo se sitúa el origen de la fotosíntesis, un proceso clave del metabolismo energético, por el que las plantas, algas y ciertas bacterias utilizan la energía luminosa del sol y la convierten en energía libre útil para los procesos metabólicos. En Archaea, sólo las halobacterias pueden utilizar la energía solar para obtener ATP, pero por un proceso diferente a la fotosíntesis en el que no se realiza transporte electrónico (Madigan *et al.*, 2003).

Uno de los grupos principales de las bacterias es el de las proteobacterias, que se divide en cinco subgrupos: α -, β -, ϵ -, γ - y δ -proteobacterias. Las bacterias fototróficas que pueden usar la luz como fuente de energía constituyen un grupo amplio y heterogéneo de microorganismos integrados en los grupos α y β de proteobacterias, que se caracterizan principalmente porque poseen uno o más pigmentos clorofílicos y porque pueden llevar a cabo la formación de ATP mediada por luz, proceso conocido como fotofosforilación. Existen cinco grupos principales de procariotas fotosintéticos: las bacterias púrpuras o rojas azufradas, las bacterias púrpuras o rojas no azufradas, las bacterias verdes azufradas, las bacterias verdes no azufradas y las cianobacterias. Excepto las cianobacterias, que realizan una fotosíntesis oxigénica como la de algas y plantas, las bacterias fotosintéticas llevan a cabo una fotosíntesis anoxigénica ya que carecen de fotosistema II, por lo que no pueden utilizar el agua como donador de electrones, empleando en su lugar otros donadores como H_2S o compuestos orgánicos. Como consecuencia del flujo cíclico de electrones se crea un gradiente electroquímico de protones, que está acoplado a la síntesis de ATP. La reducción del NAD^+ a partir del donador de electrones se realiza mediante un flujo inverso de electrones desde las quinonas, con consumo de parte del ATP sintetizado en la fotofosforilación cíclica (Madigan *et al.*, 2003).

Las bacterias fototróficas colonizan numerosos ambientes naturales, como estanques eutrofizados, lagos litorales y aguas residuales (Pfennig, 1978) y exhiben una alta flexibilidad metabólica ya que pueden ser fotoorganótrofos, fotolitoautótrofos o quimioorganótrofos. Los pigmentos fotosintéticos son las bacterioclorofilas *a* o *b* y una variedad de carotenoides. Los complejos captadores de luz, los centros de reacción y los componentes de la cadena de transporte de electrones se establecen en sistemas intracelulares de membrana con una arquitectura propia de cada especie.

Entre las bacterias no azufradas destaca la familia *Rhodobacteraceae*, que incluye a las bacterias rojas, que poseen unas membranas intracitoplasmáticas características producidas por invaginaciones de la membrana plasmática (Pfennig, 1978; Trüper y Pfennig, 1978; Garrity *et al.*, 2005). Tres complejos proteicos de membrana son necesarios para recoger y convertir la energía luminosa en energía química: los complejos captadores de luz, el centro de reacción y el citocromo *bc*₁, cuya síntesis se modula por varios factores, como la intensidad de la luz y la tensión de oxígeno (Sener *et al.*, 2007). En la familia *Rhodobacteraceae* se encuentra el género *Rhodobacter* (Garrity *et al.*, 2006), un grupo de α -proteobacterias con una gran versatilidad metabólica que les permite adaptarse fácilmente al medio en que viven. Estos organismos crecen fotoheterotróficamente, en condiciones anaeróbicas e iluminación, utilizando como donadores de electrones varios sustratos orgánicos como succinato, malato o acetato, aunque algunas estirpes también son capaces de crecer fotoautotróficamente con CO₂ como única fuente de carbono utilizando hidrógeno molecular, o sulfuro de hidrógeno produciendo azufre elemental (Hansen y van Gemerden, 1972).

Las especies de *Rhodobacter* asimilan el nitrógeno orgánico fundamentalmente a través de la glutamato deshidrogenasa, mientras que el amonio se incorpora a los esqueletos carbonados mediante la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) (Brown y Herbert, 1977; Moreno–Vivián *et al.*, 1983; Caballero *et al.*, 1985). También crecen diazotróficamente ya que poseen nitrogenasa, y algunas especies poseen nitrato y nitrito reductasas por lo que pueden utilizar estos compuestos como fuente de nitrógeno (Castillo y Cárdenas, 1982; Moreno–Vivián *et al.*, 1983). La mayoría de las especies pueden, además, crecer en microaerobiosis y en aerobiosis y oscuridad como quimioheterótrofos, existiendo también estirpes quimiolitotróficas. En condiciones fototróficas de crecimiento (anaerobiosis/luz) muchas de estas especies presentan una considerable capacidad respiradora, lo que permite a algunas de estas bacterias (*Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodocyclus gelatinosus* y *Rhodospirillum rubrum*) cambiar rápidamente de un metabolismo fototrófico a uno respiratorio cuando fluctúan las condiciones ambientales (Pfennig, 1978; Trüper y Pfennig, 1978).

4.1. *Rhodobacter capsulatus*

Rhodobacter capsulatus es quizás la especie mejor caracterizada entre las bacterias rojas fotosintéticas ya que además de su crecimiento fototrófico, presenta diversas capacidades respiratorias que le permiten crecer en una amplia variedad de condiciones ambientales. Así, las rutas respiratorias ramificadas del transporte de electrones permiten que *R. capsulatus* crezca en aerobiosis y oscuridad, quimioautotrófica o quimioheterotróficamente, usando O₂ como el aceptor terminal de electrones. De hecho, su alta capacidad para el crecimiento quimioautotrófico aerobio la distingue de otras bacterias

púrpuras no azufradas que han sido estudiadas, tales como *R. sphaeroides* y *Rhodospirillum rubrum* (Madigan y Gest, 1979). Como otros organismos de este grupo, *R. capsulatus* puede crecer también anaeróbicamente en la luz usando el transporte fotosintético cíclico de electrones para generar un gradiente electroquímico de protones que permite la síntesis de ATP. Además, estos organismos también pueden crecer con metabolismo fermentativo. Debido a tal flexibilidad metabólica, *R. capsulatus* proporciona un sistema excelente para el control de la homeostasis redox (Unden y Bongaerts, 1997).

Nutricionalmente, *Rhodobacter capsulatus* es quizás la más versátil de todas las bacterias púrpuras (Madigan *et al.*, 2001). En cuanto a la capacidad de degradar compuestos nitroaromáticos *R. capsulatus* puede atacar mononitrofenoles con la rotura del anillo aromático y la liberación del nitrito (Blasco y Castillo 1992; Roldán *et al.*, 1998; Pérez–Reinado *et al.*, 2005), pero dicha rotura del anillo aromático requiere luz y oxígeno y el crecimiento requiere una fuente de carbono auxiliar como el acetato (Roldán *et al.*, 1998). Sin embargo, *R. capsulatus* no puede crecer en benzoato (Imhoff y Trüper, 1989), un sustrato usado universalmente por las bacterias púrpuras que degradan compuestos aromáticos (Gibson y Harwood, 1995).

El genoma de *R. capsulatus* está constituido por un cromosoma circular de 3.6 Mb y varios plásmidos (Fonstein *et al.*, 1992), y recientemente ha sido secuenciado completamente (Haselkorn *et al.*, 2001).

4.2. *Rhodobacter sphaeroides*

Es una α -proteobacteria metabólicamente versátil y fácil de manipular genéticamente. En el caso de la estirpe *R. sphaeroides* 2.4.1 se ha demostrado que puede reducir óxidos y oxianiones de metales

pesados tóxicos a compuestos volátiles; por ejemplo, oxianiones de selenio a dimetilseleniuro y dimetildiseleniuro (Callister *et al.*, 2006). La estirpe *R. sphaeroides* 2.4.1 es la primera α -proteobacteria que se ha utilizado en los sistemas reguladores asociados con la señalización de quórum, que es un mecanismo de control de expresión genética dependiente de la densidad celular. Otros resultados recientes revelan que los métodos de movilidad y de detección ambiental en lo referente a los movimientos bacterianos y al movimiento en *R. sphaeroides* (taxis) son únicos genética y fisiológicamente (Porter *et al.*, 2006). Este organismo también posee un número de rasgos y de características que demuestran semejanzas interesantes a las de las mitocondrias de eucariotas.

En las estirpes de *R. sphaeroides* las transiciones a partir de un modo de crecimiento a otro están afectadas por diversos factores ambientales. La tensión de oxígeno está entre los factores más influyentes que dictan el modo de generación de la energía. En alta tensión de oxígeno, *R. sphaeroides* carece de aparato fotosintético ya que la síntesis del fotosistema está controlada por los niveles de oxígeno. Una disminución de la tensión de oxígeno resulta en la expresión de los genes que codifican las proteínas del fotosistema, lo que da lugar a la nueva formación del sistema intracitoplásmico de membranas (Pappas *et al.*, 2004).

El genoma de *R. sphaeroides* 2.4.1 consiste en dos cromosomas circulares, uno 3.0 Mb y el otro de 0.9 Mb, y cinco plásmidos, y ha sido secuenciado completamente (<http://utmmg.med.uth.tmc.edu/sphaeroides>). El advenimiento de técnicas genéticas moleculares y de sus aplicaciones para estudiar este organismo ha facilitado el análisis complejo y detallado de la regulación y expresión genética, y ha permitido el análisis del genoma de esta estirpe (Choudhary *et al.*, 2004).

5. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se han identificado al menos dos genes de *Rhodobacter capsulatus* que codifican posibles nitrorreductasas (Pérez–Reinado, 2005; Pérez–Reinado *et al.*, 2005, 2008; Roldán *et al.*, 2008). Uno de ellos (*nprA*) codifica la nitrorreductasa principal dependiente de NADPH, que es inducible por diversos compuestos nitroaromáticos y nitroheterocíclicos y se regula negativamente por amonio. El segundo gen (*nprB*) codifica una nitrorreductasa diferente cuya expresión parece ser constitutiva. Estudios de mutagénesis dirigida han permitido establecer que ambos genes, *nprA* y *nprB*, son necesarios para el proceso de reducción de DNP a ANP en *R. capsulatus* (Pérez–Reinado *et al.*, 2005). La purificación de la nitrorreductasa NprA de *R. capsulatus* ha permitido caracterizar bioquímicamente esta enzima y determinar su papel fisiológico como una dihidropteridina reductasa que participa en el metabolismo de los aminoácidos aromáticos, que también se regula negativamente por amonio (Pérez–Reinado *et al.*, 2008). En este trabajo se ha hiperexpresado y purificado la nitrorreductasa codificada por el gen *nprB* con vista a su caracterización bioquímica y a su comparación con la nitrorreductasa NprA previamente purificada y caracterizada. Por otro lado, y para dar seguimiento a otros trabajos realizado por nuestro grupo de investigación en cuanto a la capacidad de la estirpe *Rhodobacter sphaeroides* DSM158S para reducir el DNP, se ha realizado la mutagénesis con el transposón Tn5 esta estirpe para identificar posibles genes implicados en la ruta de transformación del 2,4–dinitrofenol por esta bacteria fototrófica. Por lo tanto, los objetivos propuestos para este trabajo han sido:

- 1) Clonación del gen *nprB* de *R. capsulatus* en el vector de expresión pQE32 para expresar la proteína recombinante NprB fusionada a una cola de polihistidinas en el extremo N-terminal.
- 2) Expresión heteróloga de la proteína His₆-NprB en *E. coli* y optimización de las condiciones de expresión.
- 3) Purificación de la proteína His₆-NprB mediante cromatografía de afinidad en columnas con geles de NTA-Ni.
- 4) Determinación y caracterización de la actividad nitrorreductasa de la proteína His₆-NprB purificada.
- 5) Obtención de mutantes por inserción al azar del transposón Tn5 afectados en el proceso de reducción del DNP en *R. sphaeroides* DSM158S.
- 6) Caracterización de la capacidad de dichos mutantes para transformar el DNP y el ANP.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS

En este trabajo se han empleado estirpes de *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Escherichia coli*. La cepa *E. coli* JM109 se empleó para hiperexpresar la proteína recombinante His₆-NprB de *R. capsulatus* B10S y la estirpe DH5 α se utilizó como portadora de los plásmidos. *E. coli* S17-1 se usó como cepa donadora para transferir por conjugación el plásmido pSUP2021, que contiene el transposón Tn5, a *R. sphaeroides* DSM158S como estirpe receptora. En la Tabla 2 se muestran las estirpes utilizadas en este trabajo, con el genotipo o las características fenotípicas más relevantes de cada una de ellas, así como los plásmidos empleados y sus características más importantes.

Tabla 2. Estirpes bacterianas y plásmidos utilizados

	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
ESTIRPES		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Δ 80 <i>lacZ</i> AM15) <i>hsdR17</i> (r _k m _k ⁺) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> (NalR) <i>thi1</i> <i>relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> (1989)
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR 17</i> (r _k m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)/ F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacR</i> , <i>lacZ</i> AM15]	Sambrook <i>et al.</i> (1989)
<i>E. coli</i> S17-1	C600:: <i>recA</i> <i>thi pro hsdR-hsdM</i> 'RP4-2-Tc::Mu-Km ^R ::Tn7	Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>R. capsulatus</i> B10S	Mutante espontáneo de B10 Sm ^R	Moreno-Vivián <i>et al.</i> (1994)
<i>R. sphaeroides</i> DSM158S	Mutante espontáneo de DSM158 Sm ^R	Moreno-Vivián <i>et al.</i> (1994)
PLÁSMIDOS		
pGEM-T	Vector de clonación para fragmentos de PCR <i>lacZ</i> , Ap ^R	Promega (ref. A-3600)
pQE32	Vector de expresión con el motivo His ₆ , <i>plac</i> , Ap ^R	Qiagen (ref. 33323)
pSUP2021	Vector movilizable para mutagénesis con Tn5 pSUP202::Tn5.Ap ^R , Cm ^R , Km ^R	Simon <i>et al.</i> (1983)
pBluescript SK/KS	Vector de clonación <i>lacZ</i> , <i>flori</i> , promotor t7 Ap ^R	Short <i>et al.</i> (1988) (Stratagene)
pMO2-AH (pQE32/ <i>nprA</i>)	gen <i>nprA</i> de pMO1-AH clonado en los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Sph</i> I de pQE32.	Pérez-Reinado <i>et al.</i> (2005)
pVE1 (pGEM-T/ <i>nprB</i>)	gen <i>nprB</i> clonado en pGEM-T amplificado con los cebadores HISNPRB1 y HISNPRB2	Este trabajo
pVE2 (pQE32/ <i>nprB</i>)	gen <i>nprB</i> de pVE1 clonado en los sitios <i>Bam</i> HI - <i>Hind</i> III de pQE32	Este trabajo

2. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 126 °C durante 20 min. Cuando fue necesario, los medios líquidos o sólidos se suplementaron con ampicilina, estreptomycin, kanamicina o cloramfenicol, a la concentración que se indica en el apartado 2.3.

2.1. Medios líquidos

2.1.1. *Medio LB* (Sambrook *et al.*, 1989). El medio Luria–Bertani (LB) fue el medio rico utilizado para el crecimiento de *E. coli*. Antes de esterilizar, el pH del medio se ajustó a 7,5 con una solución concentrada de NaOH.

MEDIO LB	
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
H₂O	hasta 1 L

2.1.2. *Medio PY* (Klipp *et al.*, 1988). Fue el medio rico empleado para el cultivo de las estirpes de *Rhodobacter*.

MEDIO PY	
Bactopeptona	10 g
Extracto de levadura	0,5 g
MgCl · 2H₂O	0,4 g
CaCl₂ · 6H₂O	0,3 g
FeSO₄ · 7H₂O	1,2 mg
H₂O	hasta 1 L

2.1.3. *Medio RCV* (Weaver *et al.*, 1975). Este fue el medio mínimo que se utilizó para cultivar las estirpes de *Rhodobacter*.

MEDIO RCV	
MgSO₄ · 7H₂O	200 mg
CaCl₂ · 27H₂O	75 mg
FeSO₄ · 7H₂O	12 mg
Na₂EDTA	20 mg
Clorhidrato de pirofosfato de tiamina	1 mg
Tampón fosfato potásico (pH 6,8)	10 mmol
Solución de trazas	1 mL
Extracto de levadura*	50 mg
H₂O	Hasta 1 L

*En el caso de *Rhodobacter capsulatus* el medio RCV carecía de extracto de levadura.

La solución de trazas para cultivar *Rhodobacter* se preparó de la siguiente forma:

SOLUCIÓN DE TRAZAS	
MnSO₄ · H₂O	400 mg
H₃BO₃	700 mg
Cu(NO₃)₂ · 3H₂O	10 mg
ZnSO₄ · 7H₂O	60 mg
Na₂MoO₄ · 7H₂O	190 mg
H₂O	Hasta 250 mL

Asimismo, se usó como fuente de carbono el D,L–malato (a una concentración final de 33 mM) y como fuente de nitrógeno se empleó glutamato sódico 5,9 mM. Cuando fue necesario al medio de cultivo se añadió DNP 0,15 mM o ANP 50 – 100 μM. Cuando se cultivaron las

estirpes silvestres y mutantes de *R. sphaeroides*, los antibióticos se añadieron a los medios RCV o PY una vez esterilizados.

2.1.4. Ensayos de bioactivación del profármaco CB1954. El profármaco CB1954 se preparó a una concentración 250 mM en 90% (v/v) dimetilsulfóxido (DMSO) tamponado con 10% Tris-HCl 100 mM (pH 7,0), según Race *et al.* (2005). Esta solución concentrada se utilizó para añadir el CB1954, a una concentración final entre 5 y 100 μ M, a cada uno de los cultivos cuando estos alcanzaron una absorbancia a 600 nm de 0,2 – 0,3. En este momento también se añadió isopropil- β -tiogalactósido (IPTG) 1 mM para inducir la expresión heteróloga de los genes *nprA* o *nprB*. En los cultivos que fueron utilizados como controles no se añadió el profármaco, pero sí el IPTG. Para seguir el crecimiento, se midió la absorbancia a 600 nm cada hora durante las primeras cuatro horas y posteriormente cada 30 min hasta completar el experimento.

2.2. Medios sólidos

Para la preparación de los medios sólidos se añadió bacto-agar (Biolife 411030) a los medios líquidos a una concentración final del 1,5% (p/v). En este caso, los antibióticos previamente filtrados se añadían una vez autoclavados los medios y antes de que solidificaran, a una temperatura aproximada de 50 °C. Para cultivar estirpes seleccionables mediante complementación- α , a las placas de LB se añadieron 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal) (Sigma, ref. B4252) y 55 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de IPTG (USB, ref. 17886).

2.3. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en agua destilada a la concentración indicada a continuación, menos el cloramfenicol, que se disolvió en etanol. Se prepararon soluciones 1.000 veces más

concentradas que las utilizadas en los medios, que se esterilizaron mediante filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,22 μm de tamaño de poro.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN EN EL MEDIO ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DISOLVENTE
Ampicilina (Ap)	150	H ₂ O
Estreptomicina (Sm)	200	H ₂ O
Kanamicina (Km)	25	H ₂ O
Cloramfenicol (Cm)	50	CH ₃ CH ₂ OH

3. CONDICIONES DE CULTIVO

Las bacterias fototróficas *R. capsulatus* B10S y *R. sphaeroides* DSM158S se cultivaron a 30 °C en condiciones fototróficas (luz y anaerobiosis o microaerobiosis). Se usaron frascos de cristal Pyrex® de volumen adecuado, completamente llenos y cerrados herméticamente, que se iluminaron de forma continua con lámparas de tungsteno para obtener condiciones saturantes de luz (240 W·m⁻²).

Para el análisis de los transconjugantes, las placas de microtitulación se mantuvieron en contenedores anaeróbicos con el sistema Gas-Pak (BBL, USA) que genera una atmósfera de H₂ y CO₂.

Para el cultivo de *E. coli* a pequeña escala se utilizaron tubos de ensayo de 15 mL con 3 mL de medio LB, cerrados con tapones metálicos. Cuando se necesitó un mayor volumen de cultivo se utilizaron frascos Erlenmeyers de volumen adecuado (100 – 2000 mL) rellenos sólo con un cuarto de su capacidad con medio de cultivo y cerrados con algodón hidrófobo estéril. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en oscuridad con agitación de 220 rpm en un incubador orbital HT (Bottmingen). En el caso de los cultivos utilizados para la hiperexpresión de la proteína recombinante NprB, se añadió IPTG 2 mM para inducir la

expresión de dicha proteína cuando la absorbancia de los cultivos a 600 nm fue de 0,4 – 0,6.

Los inóculos para los cultivos se prepararon partiendo de células almacenadas en punciones de medio sólido PY o de células congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medios con un 20% de glicerol.

4. PUREZA Y MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS

La pureza de los cultivos se siguió rutinariamente extendiendo con un asa de platino sobre medio sólido en una placa de Petri una pequeña cantidad extraída del cultivo en condiciones axénicas. La conservación de cepas a corto plazo se hizo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en cultivos en estría en placas con medios selectivos. La conservación a largo plazo se hizo por congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de cultivos líquidos con un 20% de glicerol.

5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACELULARES

Las células de *E. coli* JM109 se recogieron por centrifugación a 8.000 rpm durante 15 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en una centrífuga Beckman Avanti J-25. Se desechó el sobrenadante y las células se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su uso posterior. A continuación se resuspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8. Cuando se midió la actividad nitrorreductasa, las células se resuspendieron en el mismo tampón suplementado con 0,2 mM de 2,4-DNP.

Los extractos acelulares se obtuvieron mediante sonicación de las suspensiones celulares a 90 W en tres períodos de 5 s utilizando un sonicador Vibracell. Durante el procedimiento las células se mantuvieron en hielo.

Tras este tratamiento, la suspensión obtenida se centrifugó en viales de 1 mL hasta obtener el color traslúcido del extracto: primero

durante 20 min y luego durante 15 min, a 12.000 rpm y 4 °C. El extracto acelular (sobrenadante) se utilizó directamente como fuente de la proteína His₆-NprB.

6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

6.1. Medida del crecimiento celular

El crecimiento de las estirpes de *Rhodobacter* se siguió midiendo la absorbancia a 680 nm de los cultivos, mientras que el crecimiento de las estirpes de *E. coli* se siguió a 600 nm. Estas determinaciones se realizaron en un colorímetro Turner (modelo 350) o un espectrofotómetro UV-vis ThermoSpectronic, Helios Epsilon.

6.2. Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de proteínas se ha utilizado el método de Bradford (1976). A 0,8 mL de muestra se le añadieron 0,2 mL de reactivo “Bio-Rad Dye reagent concentrate”, ref. 500-0006 (Bio-Rad). Transcurridos 10 min se determinó la absorbancia a 595 nm y el valor obtenido se interpoló en una recta patrón obtenida con distintas concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA).

6.3. Detección de compuestos nitroaromáticos por UV/vis y HPLC

El compuesto nitroaromático 2,4-DNP se determinó espectrofotométricamente a la longitud de onda correspondiente a su máximo de absorción a pH neutro (360 nm) y el 2-amino-4-nitrofenol (ANP) se midió a 436 nm.

El ácido pícrico (TNP), el TNT, el 2,4-DNP y el ANP también se determinaron mediante HPLC, para lo cual se empleó un equipo System Gold equipado con un detector de diodos en batería (diode array), modelo 168 (Beckman Instruments Inc). La cromatografía se

realizó utilizando una columna Extrasil ODS2 5 μM 15 x 0,4 (Teknokroma, Barcelona) o Spherisorb ODS–2 (TRACER Analítica) de 15 x 0,4 cm y 5 μm de tamaño de partícula. El procedimiento se llevó a cabo a un flujo de 0,8 – 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a temperatura ambiente. Las fases móviles empleadas fueron:

COMPUESTO	TR (min)	λ (nm)	FASE MÓVIL	
			FASE ORGÁNICA	FASE ACUOSA
2,4–DNP	5,4	360	45% metanol	55% (100 mM ácido acético y 0,8 mM trietilamina en agua MilliQ, Millipore, Bedford, MA)
TNP	2,9			
ANP	3,2	436		
TNT	2,6	360	65% acetonitrilo	35% (agua MilliQ, Millipore, Bedford, MA)

Asimismo, los compuestos nitroaromáticos se prepararon según Race *et al.* (2005), como se indica en el apartado 2.1.4. de Materiales y Métodos.

7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITRORREDUCTASA DE NprB

Se determinó cuantificando por HPLC el TNP o el TNT desaparecido. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 mL, los componentes que se indican en la tabla:

ENSAYO NITRORREDUCTASA	
Mezcla de tampones, pH 6,9	250 μmoles
Sustrato	0,2 μmoles
NADH	0,6 μmoles
Extracto o enzima	cantidad adecuada (5 – 25 μL)
H ₂ O destilada	hasta 1 mL

Para tamponar la mezcla de reacción se uso siempre una mezcla de tampones 250 mM, pH 6,9 que contenía (a una concentración 50 mM cada uno): MES, MOPS, HEPES, Tris-HCl y CHES. Tras añadir el NADH, la reacción se dejó transcurrir durante 20 min a 34 °C. Pasado este tiempo, para parar el ensayo se calentó durante 5 min a 95 °C. La mezcla se centrifugó y el TNP o el TNT se determinaron mediante HPLC para cuantificar la concentración de sustrato consumida. Como referencia se utilizó la misma mezcla de reacción, pero con extracto celular o enzima His₆-NprB hervidos.

También se determinó la actividad de NprB con otros compuestos nitroderivados y quinoides midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm como consecuencia de la oxidación del NADH, en un espectrofotómetro Beckman DU 7500. Todos los compuestos se utilizaron a una concentración 0,2 mM por ensayo, menos las quinonas que se utilizaron a una concentración 0,034 ó 0,06 mM.

Los compuestos nitroderivados utilizados en la determinación de la actividad nitrorreductasa de NprB fueron: aroclor 1254, 2-amino-4-nitrofenol (ANP), 4-amino-2-nitrofenol, CB1954, 2,4-dihidroxibenzoilo, 1,3-dinitrobenceno, 2,4-dinitrobenzoato (2,4-DNB), 2,5-dinitrobenzoato (2,5-DNB), 3,5-dinitrobenzoato (3,5-DNB), 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP), 2,5-dinitrofenol (2,5-DNP), 3,4-dinitrofenol (3,4-DNP), 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT), 2-nitrobenzoato, 4-nitrobenzoato, nitrosobenceno, 2,4,6-trinitrofenol (ácido pícrico o TNP), 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), furazolidona, nitrofurantoína y nitrofurazona. Además se utilizaron las quinonas lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) y *p*-benzoquinona (1,4-benzoquinona).

Todos los compuestos nitroderivados se prepararon en DMSO, menos el aroclor 1254 que se preparó en metanol 100%, a una concentración 20 mM, según Race *et al.* (2005) (ver apartado 2.1.4. de Materiales y Métodos).

8. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL DNA

8.1. Aislamiento y purificación de DNA plasmídico

Para el aislamiento del DNA plasmídico se utilizó el método de purificación mediante un preparado comercial, a partir del sistema “High Pure Plasmid Isolation Kit” de Roche Mannheim (ref. 1754785) para obtener el DNA con la calidad y concentración necesarios para su secuenciación. Para ello se utilizaron 3 mL de cultivo y se siguieron las instrucciones del fabricante.

8.2. Aislamiento de DNA total

Dependiendo de la cantidad y grado de pureza requerida se emplearon dos métodos.

8.2.1. Mediante kit comercial

La extracción de DNA se realizó a partir de células de *Rhodobacter capsulatus* B10S. Para ello las células se cultivaron en el medio PY suplementado con estreptomicina. El cultivo se recogió cuando presentaba una absorbancia a 680 nm de aproximadamente 0,5. El sistema de aislamiento del DNA que se utilizó fue el preparado comercial “Wizard® Genomic DNA Purification” de Promega (ref. A1120). El protocolo de extracción y los tampones utilizados fueron los recomendados por la casa comercial.

8.2.2. Método del fenol/cloroformo

Para ello se empleó el método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Se partió de 100 mL de células de *R. sphaeroides* DSM158S cultivadas en medio RCV con D,L-malato y glutamato como fuentes de carbono y de nitrógeno, respectivamente. Las células se recogieron por centrifugación y posteriormente se lavaron y se resuspendieron en 10 mL de un tampón TE que contenía: Tris-HCl 75 mM (pH 8,0), EDTA 20 mM y NaCl 100 mM. Se añadieron 50 mg de lisozima y se incubó a 37 °C durante 30 min con ligera agitación. A continuación se añadieron 200 mg de *N*-laurilsarcosina y 10 mg de proteinasa K, y se incubó en las mismas condiciones durante otros 30 min. Para eliminar las proteínas se realizaron tres extracciones sucesivas. La primera de ellas con una solución 1:1 de fenol:Tris-HCl 1 M (pH 8) preparado a partir de una solución comercial de Sigma (ref. P-4557) neutralizando con el tampón comercial mediante agitación durante toda la noche, la segunda con 10 mL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 y la tercera con 10 mL de cloroformo saturado en TE.

La fase acuosa se precipitó añadiendo el mismo volumen de isopropanol y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2). Las muestras se mantuvieron a -20 °C durante aproximadamente 12 h para facilitar la precipitación. Posteriormente las muestras se centrifugaron 30 min a 12.000 g. El precipitado se lavó finalmente con 1 mL de etanol al 70% (v/v), se secó en una estufa a 65 °C. El DNA precipitado se resuspendió en 0,5 mL de H₂O estéril.

8.3. Digestión del DNA total con endonucleasas de restricción

8.3.1. DNA genómico de *Rhodobacter*

Las reacciones de digestión del DNA genómico de *R. capsulatus* y *R. sphaeroides* se realizaron en las condiciones óptimas fijadas por el fabricante para cada enzima de restricción. Las reacciones contenían habitualmente 0,5 – 5 µg de DNA; 0,1 volúmenes del tampón de restricción suministrado diez veces concentrado por la casa comercial; 0,5 – 5 unidades de la enzima de restricción, en un volumen final de 30 µL complementados con agua estéril. Además, se añadió RNasa 0,1 mg·mL⁻¹. Las digestiones se incubaron a la temperatura que indicaba el fabricante durante 12 – 24 horas.

8.3.2. Digestión del DNA plasmídico

Las digestiones del DNA plasmídico con endonucleasas de restricción se realizaron en las condiciones recomendadas por las diferentes casas comerciales (Promega, Pharmacia o Boehringer). Las digestiones contenían aproximadamente unos 0,5 – 3 µg de DNA, 0,1 volúmenes del tampón de restricción, suministrado por la casa comercial diez veces concentrado, 0,5 – 1 unidades de enzima de restricción, en volúmenes finales de 15 µL completados con H₂O.

8.4. Ligación

Se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. Estas moléculas se mezclaron en una proporción vector:inserto de 1:3, según la fórmula siguiente:

$$\frac{50 \text{ ng vector} \times \text{kb inserto}}{\text{kb vector}} \times \frac{3}{1} = \text{ng de inserto}$$

La reacción se llevó a cabo añadiendo, además de la proporción adecuada de DNA vector y DNA inserto, 0,1 volúmenes de tampón de ligación y 1 U de DNA ligasa del fago T4 (Roche, ref. 481220) en un volumen final de 15 μL completado con agua estéril. Las reacciones se mantuvieron a 15 $^{\circ}\text{C}$, durante 12 – 24 h.

8.5. Electroforesis de DNA

La electroforesis de fragmentos de DNA se llevó a cabo según el método de Sambrook *et al.* (1989). Se utilizaron para ello geles de agarosa preparados en tampón TAE, cuya composición se indica al final de este apartado. El porcentaje de agarosa utilizado fue de 0,8% para las muestras de DNA total y 1% para las muestras de DNA plasmídico. A cada 5 μL de muestra de DNA se añadió 1 μL de tampón de carga. La mezcla se depositó en un pocillo del gel sumergido en una cubeta con tampón TAE. La separación se realizó por electroforesis horizontal a un voltaje de 5 – 10 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ durante aproximadamente dos horas. Para visualizar el DNA en el tampón de electroforesis se añadió bromuro de etidio, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, y el DNA se visualizó mediante exposición del gel a radiación ultravioleta (254 nm) en un transiluminador. El tamaño de los fragmentos se estimó por interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando como patrón los fragmentos de DNA del marcador comercial de Roche (DNA Molecular Marker X, ref. 1498037), que se muestra en la Figura 21.

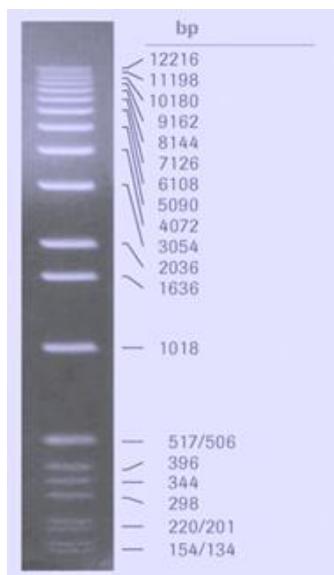


Figura 21. Marcadores de tamaño para electroforesis de DNA (DNA Molecular Marker X, Roche).

La composición de los tampones y soluciones empleados en la electroforesis fue la siguiente:

Tampón TAE: 4,84 g de Tris–Base, 1,14 mL de ácido acético glacial, 0,5 M EDTA, pH 8,2 y hasta 1 L de H₂O. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en el autoclave.

Tampón de carga: glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,3% p/v y azul de xilencianol 0,3% p/v.

8.6. Secuenciación del DNA

Se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer, USA), que separa los distintos polinucleótidos mediante electroforesis capilar. Este secuenciador se

encuentra en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

8.7. Transformación por tratamiento con cloruro de calcio en frío

La transformación de las estirpes *E. coli* DH5 α y JM109 se llevó a cabo según el método descrito por Mandel y Higa (1970), basado en la capacidad que adquieren estas células para captar DNA exógeno cuando se tratan con una disolución de cloruro de calcio en frío.

8.7.1. Obtención de células competentes

Las células de *E. coli* se cultivaron en el medio LB durante aproximadamente 12 h. A continuación el cultivo se diluyó 50 veces en medio LB, incubándose durante unas 2 h, hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de aproximadamente 0,5. En este punto, las células se centrifugaron a 5.000 g durante 5 min y el precipitado se resuspendió en la mitad del volumen de partida con una solución fría de CaCl₂ 50 mM. Se incubaron en hielo durante 30 min y se volvió a centrifugar. Las células competentes obtenidas se resuspendieron en una décima parte del volumen inicial en una solución fría de CaCl₂ 50 mM.

8.7.2. Transformación de células competentes

Por cada 200 μ L de células competentes obtenidas como se indica en el apartado anterior se mezclaron de 1 a 10 μ L de la preparación de DNA plasmídico (50 – 500 ng de DNA) y 100 μ L de tampón TCM. La mezcla se incubó 30 min en hielo y posteriormente se realizó un choque térmico durante 90 s a 42 °C. A continuación se añadieron 700 μ L de medio LB, y los viales se incubaron a 37 °C durante 30 – 45 min. Posteriormente, se sembraron partes alícuotas de 100 μ L en medio LB sólido con los antibióticos correspondientes. En

caso de llevar a cabo selección mediante complementación α se añadió IPTG y X-Gal, como se ha mencionado en el apartado 2.2. de Materiales y Métodos.

TAMPÓN TCM	
Tris-HCl	10 mM; pH 7,5
CaCl ₂	10 mM
MgCl ₂	20 mM

8.7.3. Selección de los transformantes

Generalmente el vector en el que se inserta el DNA suele presentar uno o varios marcadores de resistencia a antibióticos, de forma que sólo las células que han incorporado dicho vector (con o sin inserto) serán capaces de crecer en un medio selectivo suplementado con dicho antibiótico. Para diferenciar entre los transformantes con y sin inserto se utilizó la capacidad de las células transformadas para utilizar o no un sustrato cromogénico (complementación α).

Los vectores empleados en el método cromogénico clásico (tipo pUC) tienen el DNA que codifica los primeros 146 aminoácidos de la β -galactosidasa. Insertada en esta secuencia *lacZ* se encuentra otra, denominada “sitio de clonación múltiple” (“polycloning site” o “polylinker”), que no altera la fase de lectura, aunque genera un extremo amino terminal de la β -galactosidasa con unos cuantos aminoácidos adicionales. Generalmente, cuando se clona un inserto en el sitio de clonación múltiple se produce el cambio de la fase de lectura y/o la generación de un extremo amino de la β -galactosidasa no funcional. Estos vectores se emplean con células hospedadoras que codifican la porción carboxiterminal de la β -galactosidasa. Aunque por separado ninguno de los productos de la expresión génica de los extremos amino o

carboxilo de la β -galactosidasa son activos enzimáticamente, pueden asociarse para generar una β -galactosidasa completa y funcional. A este tipo de fenómeno se le denomina complementación α . Las bacterias con fenotipo Lac^+ que resultan de la complementación α se pueden reconocer fácilmente porque forman colonias azules en presencia del sustrato cromogénico X-Gal y de un inductor del gen de la β -galactosidasa, como el IPTG. Sin embargo, la introducción de un inserto en el sitio de clonación múltiple del vector, produce un extremo amino terminal de β -galactosidasa que no es capaz de conseguir la complementación α . Estas bacterias recombinantes con DNA inserto ligado en el vector generan colonias blancas en dicho medio.

8.8 Mutagénesis por inserción al azar del transposón Tn5 en el genoma de *R. sphaeroides* DSM158S

La mutagénesis por inserción al azar del transposón Tn5 en el genoma de *R. sphaeroides* DSM158S se realizó según el método de Simon *et al.* (1983), basado en la transferencia por conjugación de plásmidos movilizables (con genes *mob*) portadores del transposón Tn5 desde estirpes donadoras de *E. coli* hasta estirpes receptoras de bacterias Gram negativas. Las estirpes donadoras poseen integrado en el cromosoma los genes *tra* del plásmido RP4 requeridos para la transferencia de material genético. Los vectores suicidas portadores de Tn5 no pueden mantenerse como tales en las bacterias fototróficas y, por lo tanto, la selección en medios con el antibiótico kanamicina (Km), cuya resistencia está codificada por Tn5, indica la integración al azar del transposón en el genoma de dichas bacterias (Fig. 22).

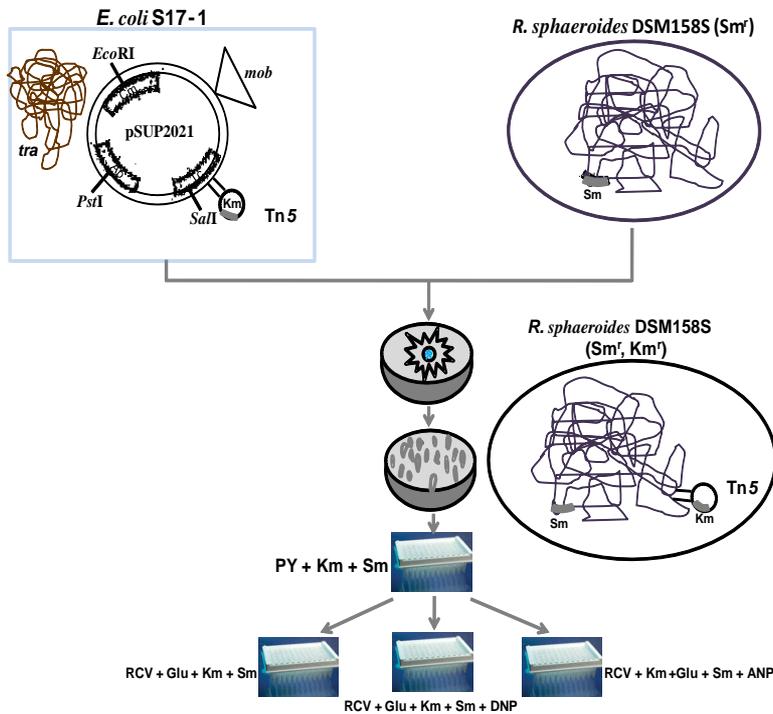


Figura 22. Esquema de la mutagénesis con Tn5 y posterior selección de mutantes afectados en la degradación de DNP.

8.8.1. Transferencia por conjugación de plásmidos movilizables desde *E. coli* S17-1 a *R. sphaeroides* DSM158S

En estudios previos a este trabajo se ha comprobado que la estirpe DSM158S de *R. sphaeroides* muestra una frecuencia de mutagénesis con el vector PSUP2021 portador de Tn5 de aproximadamente 10^{-5} , similar a la observada en otras bacterias Gram negativas (Roldán, 1992; Moreno-Vivián *et al.*, 1994).

Las células de la estirpe S17-1 de *E. coli*, previamente transformadas con el plásmido pSUP2021 que contiene el transposón Tn5, se cultivaron en placas con medio sólido LB y el antibiótico kanamicina (Km). De estas placas se tomaron células con un asa de platino estéril y se resuspendieron en 1 mL de medio PY sin hierro. Por

otro lado, las células receptoras de la estirpe DSM158S de *R. sphaeroides* se cultivaron en condiciones de luz-anaerobiosis en el medio RCV con estreptomicina (Sm) hasta alcanzar una absorbancia a 680 nm de 0,8 – 1,0. Se mezclaron 0,5 mL de ambas suspensiones celulares en un tubo de centrifuga de 1,5 mL, eliminándose los medios de cultivo por centrifugación a 5.000 x g durante 10 min. Las células se resuspendieron cuidadosamente en 0,1 mL de medio PY carente de hierro y, a continuación, se transfirieron a filtros de acetato de celulosa (tamaño de poro de 0,2 µm y 25 nm de diámetro) colocados en placas de Petri conteniendo medio sólido PY. Se incubaron durante toda la noche a 30 °C en la oscuridad. Los filtros se colocaron en viales que contenían 1 mL de medio RCV sin fuente de nitrógeno y se agitaron para detener el proceso de conjugación y poner las células en suspensión. Finalmente, se sembraron las células en placas con medio sólido PY suplementado con los antibióticos Sm (200 µg·mL⁻¹) y Km (25 µg·mL⁻¹). Esto permitió la selección de los transconjugantes de *R. sphaeroides*.

8.8.2. Selección de mutantes de *R. sphaeroides* DSM158S afectados en la ruta de degradación de DNP

Para seleccionar los posibles mutantes de *R. sphaeroides* DSM158S afectados en la ruta de degradación de DNP, las colonias resistentes a los dos antibióticos, kanamicina y estreptomicina, se transfirieron en condiciones de esterilidad a placas de microtitulación, colocando una en cada pocillo. Cada pocillo contenía 200 µL de medio PY. A partir de este medio se hacían tres réplicas: una a medio RCV con D,L-malato y glutamato y las otras dos a medios que contenían DNP (0,1 mM) o ANP (50 µM), respectivamente. Las placas se incubaron a 30 °C en condiciones de luz-anaerobiosis.

Se seleccionaron aquellas colonias que no habían crecido en presencia de DNP o ANP, pero que sí habían crecido en la réplica con RCV y glutamato, lo que permitía descartar a los mutantes auxótrofos.

8.9. Hibridación del DNA genómico del mutante D1-2 de *R. sphaeroides* DSM158S (Southern blotting)

La hibridación de ácidos nucleicos se hizo siguiendo el método basado en el marcaje de la sonda con digoxigenina (Feinberg y Vogelstein, 1983).

8.9.1. *Transferencia del DNA genómico del mutante D1-2 de R. sphaeroides DSM158S a membranas de nailon*

El DNA genómico del mutante D1-2 de *R. sphaeroides* DSM158S se digirió mediante las enzimas de restricción *EcoRI*, *SalI*, *BamHI* y *EcoRI/SalI*. A continuación, se fraccionó por medio de una electroforesis en gel de agarosa 0,8%, en tampón 1 X TAE de 10 cm de longitud, cargándose en cada pocillo 5 µg por aproximadamente 5 horas para obtener una mayor resolución de las bandas. Seguidamente, se lavó el gel manteniéndolo con agitación continua durante 30 min en una solución despurinizadora de HCl 0,2 M. Transcurrido ese tiempo el gel se pasó a una bandeja que contenía una solución desnaturalizante de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 N y se mantuvo con agitación continua durante 45 min. Posteriormente, se pasó por una bandeja con agua destilada y de ésta a otra con una solución neutralizante compuesta de Tris-HCl 1 M (pH 8,0) y NaCl 1,5 M. Con esta solución se agitó durante 15 min. Pasado este tiempo se renovó la solución de neutralización y se agitó de nuevo durante otros 15 min.

Una vez finalizado el proceso de lavado el DNA genómico se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Boehringer Mannheim, ref. 1417240) siguiendo el

protocolo de transferencia alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989). Transcurridas 12 h se lavó la membrana en el tampón anterior diluido 10 veces para eliminar los posibles restos de agarosa. A continuación el DNA se fijó a la membrana mediante radiación ultravioleta (260 nm) durante 3 min.

8.9.2. Condiciones de hibridación del DNA genómico del mutante D1-2 de *R. sphaeroides*

La prehibridación se llevó a cabo en la solución de prehibridación a 65 °C durante 48 h. La hibridación se llevó a cabo en la solución de prehibridación más la sonda, que contenía un fragmento de DNA perteneciente al transposón Tn5 (fragmento *Pst*I de 1,1 kb) marcado con digoxigenina, a 65 °C durante 24 h.

SOLUCIÓN DE PREHIBRIDACIÓN (volumen ~ 30 mL/membrana)	
20 X SSC	30 mL
agente de bloqueo	1,2 g
<i>N</i>-lauril-sarcosina	0,12 g
SDS 20%	0,12 mL
H₂O	89,88 mL
volumen total	120 mL
disolver 1 h en baño maría a 65 °C antes de usarlo	

Para el lavado de la membrana se utilizaron:

- (a) 2 x SSC + 0,1% SDS, dos lavados durante 15 min a temperatura ambiente, cada uno y
- (b) 0,1 x SSC + 0,1% SDS, dos lavados durante 15 min a 65 °C.

9. HIPEREXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB EN *E. coli*

Para la expresión de la proteína recombinante His₆-NprB, se amplificó el gen *nprB* utilizando el DNA genómico de *R. capsulatus* B10S como molde. Para ello se diseñaron los oligonucleótidos HISNPRB1 y HISNPRB2, que permiten la clonación del fragmento resultante de la PCR en los sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III del vector pQE32, de forma que se produzca la fusión en la fase de lectura correcta entre la secuencia His₆ codificada por pQE32 y la secuencia de NprB a partir del segundo codón.

9.1. Amplificación del gen *nprB* de *R. capsulatus* B10S mediante PCR

La secuencia del gen *nprB* para el diseño de los cebadores se obtuvo de la base de datos correspondiente a la secuencia completa del genoma de *Rhodobacter capsulatus* SB1003 (www.integratedgenomics.com).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el sistema Mastercycler–personal 5332 Eppendorf. Se utilizó para ello el preparado comercial ExpandTM High Fidelity PCR System de Roche (ref. 1440000) que suministraba la DNA polimerasa, el tampón de reacción y el cloruro de magnesio. Los desoxirribonucleótidos (dNTPs) utilizados fueron los de Amersham Biosciencie (ref. 27–2035–01).

REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN (PCR)		
	Volumen	Concentración
PCR Buffer (10 x)	5 µL	1X
Solución de dNTPs 10 mM	1 µL	100 µM (cada uno)
Oligonucleótidos	1 µL (cada uno)	0,2 pmol/µL
DNA molde	0,5 – 5 µL	0,05 – 1 µg
DNA polimerasa (3,5 U·µL ⁻¹)	1 µL	0,07 U·µL ⁻¹
H ₂ O destilada estéril	Hasta 50 µL	

Los cebadores utilizados para amplificar el gen *nprB* de *R. capsulatus* fueron los siguientes:

HISNPRB1: 5' – secuencia – 3' (sitio *Bam*HI subrayado)

5'- TAGGATCCATGAGAATCTGTATTTCCAAGGCGATATTCCTCCCGGCACCGTCA - 3'

*Bam*HI

HISNPRB2: 5' – secuencia – 3' (sitio *Hind*III subrayado).

5'- AGAAGCTTAGCAGCAGAAGGATGGCGAGGCC - 3'

*Hind*III

El programa de PCR utilizado se representa en la Fig. 23.

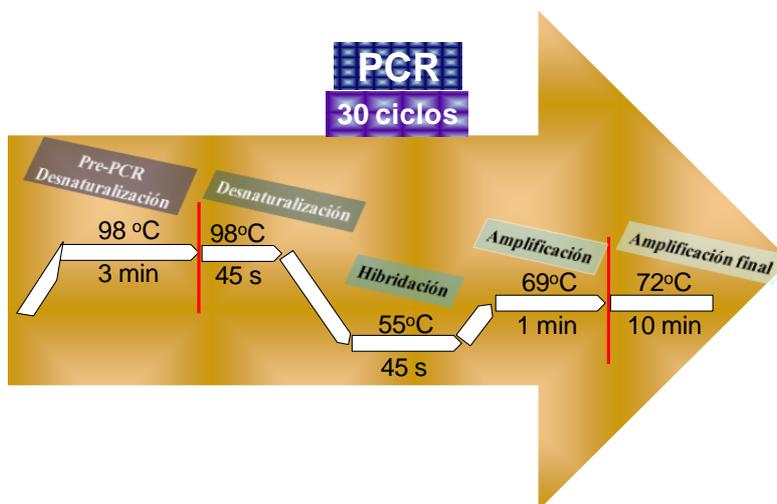


Figura 23. Esquema del programa de PCR para la amplificación del gen *nprB* de *R. capsulatus* B10S.

9.2. Clonación del gen *nprB* en el vector de expresión pQE32

Una vez amplificado, el fragmento de DNA de unos 700 pb conteniendo el gen *nprB* se introdujo en el plásmido pGEM-T, denominándose a esta construcción pVE1. Posteriormente, se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III y se clonó en el plásmido pQE32. A continuación se transformó la estirpe JM109 de *E. coli* con dicha construcción, a la que se ha denominado pVE2 (Fig. 24).

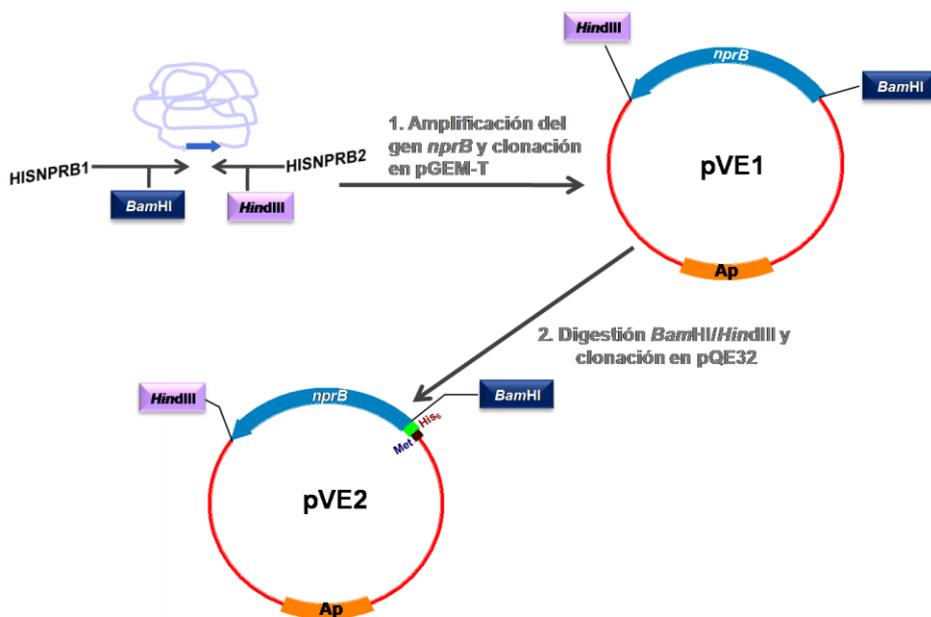


Figura 24. Construcción de un vector para la expresión de la proteína recombinante His₆-NprB.

En el plásmido pVE2, la expresión del gen *nprB* está basada en el promotor *lac*, de forma que la producción de la proteína recombinante His₆-NprB es rápidamente inducida por la adición de IPTG.

10. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO DE SODIO (SDS–PAGE)

La electroforesis SDS–PAGE se llevó a cabo según el método de Laemmli (1970) con algunas modificaciones. Se utilizó un sistema Mini–Protean II Electroforesis Cell de BioRad. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida formados por el gel separador (*resolving*) con una concentración final de acrilamida del 15% (p/v), siendo su función la separación de las proteínas en función de su masa molecular, mientras que el gel concentrador (*stacking*) con una concentración final de acrilamida del 4% (p/v), para enfocar las proteínas. Las muestras antes de ser cargadas en el gel, se mezclaron con un volumen de tampón de carga, preparado al 4X, y posteriormente se incubaron a 95 °C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente se cargaron en el gel y la electroforesis se desarrolló según las instrucciones de la casa comercial (BioRad), durante 30 min a 15 mA por gel hasta que las muestras entraron en el gel separador, y a partir de este momento la corriente se incrementó a 25 mA por gel hasta conseguir una separación adecuada de las proteínas. El patrón de proteínas utilizado para el gel teñido con Coomassie fue SDS–PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range de BioRad (ref. 161–0317). Los marcadores “Kaleidoscope Prestained Standards” de BioRad (ref. 161–0324) se utilizaron para el gel que se transfería a membrana (Fig. 25).

Composición del gel concentrador (4%): 520 μ L de acrilamida/*bis*acrilamida (37,5:1); 830 μ L de Tris–HCl 0,5 M (pH 6,8); 20 μ L de SDS 20% (p/v); 20 μ L de persulfato amónico 10% (p/v); 5 μ L de *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 2,65 mL de H₂O.

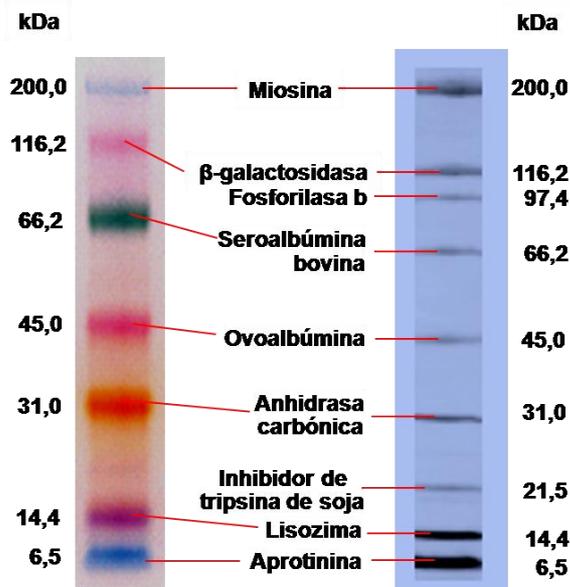


Figura 25. Marcadores de masa molecular para electroforesis de proteínas.

Composición del gel separador (15%): 5 mL de acrilamida/*bis*acrilamida (37,5:1); 2,47 mL de Tris-HCl 1,5 M (pH 8); 50 μ L de SDS 20% (p/v); 50 μ L de persulfato amónico 10% (p/v); 5 μ L de *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 2,43 mL de H₂O.

Las cantidades mostradas están ajustadas para la preparación de dos geles y corresponden a los componentes utilizados en la preparación del gel concentrador al 4% y del gel separador al 15%. La disolución de acrilamida/*bis*acrilamida fue suministrada por Bio-Rad (ref. 161-0158).

Composición del tampón de carga (4X): 1,2 mL de Tris-HCl 1 M (pH 6,8); 2 mL de SDS al 20% (p/v); 4 mL de glicerol; 2 mL de β -mercaptoetanol; 400 μ L de azul de bromofenol 0,1 % (p/v) y ajustar volumen hasta 10 mL de H₂O.

Composición del tampón de electroforesis: 3 g de Tris-base; 14,4 g de glicina; 4,8 mL de SDS al 20% (p/v); y 990 mL de H₂O (pH 8,5).

10.1. Tinción de proteínas con azul de Coomassie

Las proteínas previamente separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se tiñeron con una disolución acuosa de azul de Coomassie. Tras 1 h de tinción se lavó varias veces el gel con una disolución de desteñido. De esta forma se mantuvo el gel en agitación suave durante unas 12 h hasta que se visualizaron bien las bandas correspondientes a las proteínas.

Solución de tinción Coomassie: 0,1% (p/v) de azul de Coomassie; 50% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético glacial.

Solución de desteñido: 10% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético glacial.

10.2. Análisis inmunológico

10.2.1. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Una vez finalizada la electroforesis en gel de poliacrilamida, las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando para ello un sistema Novoblot semi-seco (BioRad). La transferencia se llevó a cabo a una intensidad de 60 mA por gel durante 30 min. Para ello se usaron dos filtros de papel Whatman “Extra Thick Blot Paper” de BioRad, ref. 1703967. Uno de los filtros se colocaba en contacto con el sistema de transferencia, previamente equilibrado en tampón de transferencia. A continuación se colocaba la membrana de PVDF previamente hidratada durante 1 min en metanol al 100%, y posteriormente equilibrada en el mismo tampón de transferencia. A continuación se colocó el gel, con la precaución de que no se formasen burbujas de aire entre la membrana y

el gel, y por último se colocó otro papel Whatman también equilibrado en la misma solución.

Composición del tampón de transferencia: Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% y ajustar volumen hasta 2 L de H₂O.

10.2.2. Inmunodetección de la proteína His₆-NprB

La membrana de PVDF con las proteínas transferidas se bloqueó durante 1 h con agente de bloqueo (BioRad, ref. 170-6404) disuelto al 5% en tampón PBS. Después del bloqueo, la membrana se incubó durante 1 h con anticuerpo primario monoclonal anti-poli-histidina (Sigma) clon his-1 de ratón (ref. H-1029), con una dilución 1:10.000 en solución de bloqueo. Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó dos veces con 10 mL de disolución de bloqueo y una vez con 10 mL de PBS y se incubó durante 1 h con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón obtenido en cabra (Sigma, ref. A-3566), con una dilución 1:1.000 en solución de bloqueo, conjugado con fosfatasa alcalina. La detección se llevó a cabo por incubación de la membrana en oscuridad con los reactivos de detección para la fosfatasa alcalina en la solución de revelado. Una vez que se desarrolló el color, la reacción se paró mediante lavados con agua y la membrana se secó mediante su almacenamiento entre filtros de papel.

Composición del tampón PBS: 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 1,4 mM de KH₂PO₄ y 4,3 mM de Na₂HPO₄.

Composición de la solución de revelado: 1,5 mL de Tris-HCl 1 M pH 9,5; 300 µL de NaCl (5 M); 75 µL de Mg₂Cl (1 M); 150 µL de NBT/BCIP y 13,125 mL de H₂O.

El reactivo NBT/BCIP utilizado se obtuvo de una mezcla comercial de Roche (ref. 1681451) y se utilizó a una concentración final

en la solución de revelado de $0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de NBT y $0,15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BCIP.

11. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB MEDIANTE CROMATOLOGRAFÍA DE AFINIDAD

La purificación de proteínas marcadas con colas de polihistidina está basada en la alta afinidad y selectividad que presentan las matrices con níquel, como el ácido nitrilotriacético (NTA) – Ni, hacia moléculas que contienen residuos consecutivos de histidinas (6xHis). Las cromatografías se llevaron a cabo en columnas de afinidad con NTA, que es un quelante tetradentado. El NTA ocupa cuatro de los seis sitios de enlace a ligandos en la esfera de coordinación del ión níquel, dejando dos sitios libres para la interacción con la cola de polihistidinas.

Las dimensiones de la columna de purificación fueron 16 mm/20 cm (Pharmacia Biotech, ref. 19–5101–01) con 20 mL de matriz, empaquetada según las instrucciones de la casa comercial, a un flujo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La columna se cargó con 0,1 M de sulfato de níquel y se equilibró con dos volúmenes de columna del tampón A a un flujo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Para la purificación de la proteína recombinante His₆-NprB, las células de la estirpe JM109 *E. coli* portadora de la construcción pQE32-*nprB* (pVE2) se cultivaron durante 24 h y se diluyeron 1:50 en 4 L de medio LB–ampicilina. Posteriormente, se cultivaron a 37 °C en un agitador a 200 rpm hasta que la absorbancia de los cultivos a 600 nm fue aproximadamente 0,5 – 0,7, llevándose a cabo la inducción de la proteína recombinante con IPTG 2 mM durante 3 h. Las células se recogieron por centrifugación a 8.000 rpm durante 15 min y a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado conteniendo las células se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a –80 °C hasta su uso.

Una vez descongeladas las células, se resuspendieron en tampón TIDC, se añadió DNasa y RNasa y se rompieron por sonicación. La composición del tampón TIDC fue: Tris-HCl 50 mM (pH 8); imidazol 5 mM; 2,4-DNP 0,2 mM y media tableta de mezclas de inhibidores de proteasas (Roche, ref. 1873580) en 50 mL. El 2,4-DNP se añadió para proteger a la enzima de inactivación por la luz (Blasco *et al.*, 1995) y la mezcla comercial de inhibidores de proteasas se utilizó para evitar la degradación de la proteína His₆-NprB recombinante por la acción de proteasas celulares. Las fracciones de membrana se eliminaron por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min, y al sobrenadante conteniendo las fracciones solubles con la proteína His₆-NprB se le añadió NaCl 1,5 M, imidazol 5 mM y glicerol al 5%.

Posteriormente, esta fracción soluble se cargó en la columna a un flujo de 1 mL·min⁻¹. Para llevar a cabo la purificación de la proteína His₆-NprB, una vez cargada la muestra, se lavó la columna con tres volúmenes de tampón A y con tres volúmenes de tampón B, para eliminar las interacciones inespecíficas, de tipo hidrofóbico o de baja afinidad entre los residuos de histidina y el níquel cargado. Para eluir la proteína His₆-NprB retenida en la columna se empleó en primer lugar un gradiente de imidazol, variando la concentración de 5 a 250 mM (creado con los tampones B y C colocados en un mezclador de gradientes) y a continuación se lavó la columna con el tampón C para despegar las proteínas que se habían retenido más fuertemente en la columna.

Tampón A: Tris-HCl 50 mM (pH 8); imidazol 5 mM; 2,4-DNP 0,2 mM; NaCl 1,5 M y glicerol al 5%.

Tampón B: Tris-HCl 50 mM (pH 8); imidazol 5 mM; 2,4-DNP 0,2 mM; NaCl 0,15 M y glicerol al 5%.

Tampón C: Tris-HCl 50 mM (pH 8); imidazol 0,25 M; 2,4-DNP 0,2 mM; NaCl 0,15 M y glicerol al 1%.

Se recogieron fracciones de 1 mL a partir del gradiente de B y C y durante el lavado con el tampón C. A continuación, se procedió a analizar las distintas fracciones cromatográficas. En estas fracciones se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford. Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con las fracciones que presentaron mayor concentración de proteína durante la elución. Uno de los geles se empleó para la tinción con Coomassie, y de esta forma comprobar la pureza de la proteína His₆-NprB purificada, y con otro gel se llevó a cabo la transferencia a membrana e inmunodetección de la proteína recombinante para comprobar la identidad de la misma.

12. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB PURIFICADA

12.1. Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad nitrorreductasa de la proteína His₆-NprB se determinó utilizando 2,4,6-trinitrofenol (TNP o ácido pícrico) como sustrato en un intervalo de pH entre 5,5 y 10,0 (ver apartado 7). La mezcla de reacción fue la siguiente:

MEZCLA DE REACCIÓN	
H ₂ O (d)	740 µL
Tampón*	100 µL
Preparación de la proteína NprB	50 µL
NADH 2 mM	100 µL
2,4,6-trinitrofenol (TNP) 20 mM	10 µL

*Mezcla de tampones (ver apartado 7)

Asimismo, los ensayos se realizaron a 30 °C, durante 5 min y la actividad nitrorreductasa de la proteína recombinante His₆-NprB purificada se determinó midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm como consecuencia de la oxidación del NADH, en un espectrofotómetro Beckman DU 7500.

12.2. Efecto de la temperatura

Las reacciones enzimáticas se ensayaron con la misma mezcla de reacción del apartado 12.1., con mezcla de tampones a pH 6,9 durante 5 min, en un intervalo de temperatura entre 25 y 40 °C.

12.3. Espectro de absorción UV/vis

El FMN en su forma oxidada presenta color amarillo dado que absorbe a 450 nm. Cuando se reduce, la forma reducida FMNH₂ no presenta color. La reducción se hizo empleando un potente reductor, el ditionito sódico (Na₂S₂O₄).

Para eliminar el DNP (200 μM) del tampón de elución de la proteína NprB se dializó un volumen de 145 μL (2,4 mg) de enzima His₆-NprB purificada en un filtro Millipore Uf U5 BCC25 BIOMAX – 5 K NMWL Membrane de 0,5 mL de volumen, con mezcla de tampones 250 mM (pH 6,9), 12.000 rpm, 5 °C, durante 4 – 5 h.

Por otra parte, el agente reductor (ditionito sódico 100 mM) se preparó en la mezcla de tampones 250 mM, pH 6,9 y se solubilizó muy lentamente.

Todas las muestras se colocaron en hielo y fueron previamente gaseadas con N₂ para realizar la anaerobiosis antes de la adición del ditionito. La presencia del cofactor FMN se determinó mediante la absorbancia entre 300 y 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 7500.

12.4. Determinación de la actividad dihidropterina reductasa de His₆-NprB

La determinación de la actividad dihidropterina reductasa (*q*DPR) de NprB se realizó a 34 °C utilizando la forma quinonoide de la 6,7-dimetil-7,8-dihidropterina (*q*DMPH₂), según Lye *et al.* (2002). Debido a que las pteridinas son muy inestables, deben ser continuamente proporcionadas por la oxidación de la 6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidropterina (DMPH₄) (Sigma, ref. D-0387) catalizada por la peroxidasa de rábano (Sigma, ref. P-8415). Los componentes de la reacción fueron:

ENSAYO ACTIVIDAD <i>q</i> DPR		
Tampón	Tris-HCl pH 7,2 ó	50 mM
	mezcla de tampones pH 6,9	250 mM
Peroxidasa de rábano		20 µg
H ₂ O ₂ (Sigma, ref. H-1009)		0,9 mM
DMPH ₄		200 µM
NADH		100 µM
Enzima purificada NprB		30 µg

Todos los componentes, excepto la DMPH₄, se incubaron durante 1 min antes de comenzar la reacción con DMPH₄. El consumo de NADH se determinó mediante la disminución de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 7500.

12.5. Efecto de inhibidores sobre la actividad nitrorreductasa de NprB

Los posibles inhibidores de la actividad nitrorreductasa de la enzima purificada His₆-NprB se examinaron a las siguientes concentraciones: *o*-fenantrolina (FNT) 1 mM, sulfato de cobre (CuSO₄)

0,2 mM, capsaicina (CAP) 0,2 mM, cianuro sódico (NaCN) 0,1 mM y dicumarol (DCM) 0,1 mM. Además se utilizaron 0,2 μ moles de sustrato (TNT, TNP) y los ensayos se incubaron a 34 °C.

12.6. Caracterización cinética de las enzimas NprA y NprB

La actividad nitrorreductasa de las enzimas His₆-NprA y His₆-NprB se determinó siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADH en presencia de TNT o de TNP, o midiendo la desaparición de los sustratos por HPLC. La mezcla de reacción (1 mL) fue preincubada a 34°C durante 20 minutos. Las K_M de las proteínas His₆-NprA y His₆-NprB para el TNP y el TNT se determinaron utilizando diferentes concentraciones de sustrato (0, 50, 250, 500, 750 y 1000 μ M), aunque para la proteína His₆-NprA, que no presenta actividad nitrorreductasa con TNT (Pérez-Reinado, 2005), sólo se utilizó TNP. Además, se utilizaron diferentes concentraciones (0, 10 y 100 μ M) de capsaicina (*trans*-8-metil-*N*-vanillil-6-nonenamida), un análogo natural de las quinonas que inhibe la actividad de algunas nitrorreductasas bacterianas (Satoh *et al.*, 1996; Schuler *et al.*, 1999). Todos los experimentos se realizaron en condiciones aeróbicas y por duplicado, y las mediciones se hicieron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CLONACIÓN DEL GEN *nprB* DE *Rhodobacter capsulatus* B10S

La secuenciación del genoma de la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* SB1003 (<http://www.ergo-light.com/ERGO/>) ha revelado la presencia de al menos tres genes que podrían codificar posibles nitrorreductasas. La secuencia de dos de estos posibles genes (RRC01791 y RRC03929) se ha utilizado para clonar los correspondientes genes *nprA* y *nprB* de la estirpe B10S, que es muy parecida desde el punto de vista genético a la estirpe SB1003 (Pérez-Reinado *et al.*, 2005). El tercer gen (*bluB*) codifica una posible proteína implicada en la síntesis de cobalamina que también podría presentar actividad nitrorreductasa (Pollich *et al.*, 1996; McGoldrick *et al.*, 2005). El gen *nprA* de la estirpe B10S de *Rhodobacter capsulatus* (homólogo al RRC01791 de la estirpe SB1003) codifica la principal nitrorreductasa requerida para la reducción del DNP. Esta proteína NprA ha sido purificada y caracterizada bioquímicamente (Pérez-Reinado *et al.*, 2005; 2008). Una nitrorreductasa homóloga a NprA en la estirpe EIF1 también ha sido previamente purificada y caracterizada (Blasco y Castillo, 1993).

El gen *nprB* de *R. capsulatus* B10S se aisló mediante PCR usando oligonucleótidos sintetizados a partir de la secuencia nucleotídica del gen homólogo RRC03929 de la estirpe SB1003 (Fig. 26). El producto de este gen *nprB* también está implicado en la reducción del DNP y su purificación y caracterización se aborda en este trabajo.

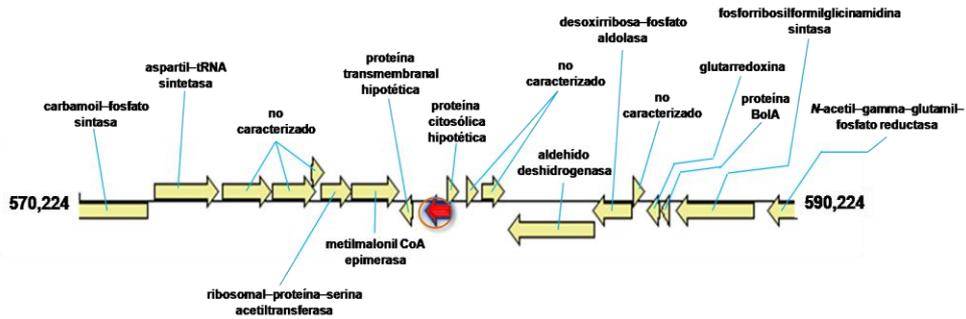


Figura 26. Regiones de DNA flanqueantes al gen RRC03929 de *Rhodobacter capsulatus* SB1003 (<http://www.ergo-light.com/ERGO/>). El gen en color rojo representa a RRC03929 (*nprB*).

Para la clonación y secuenciación del gen *nprB* de *R. capsulatus* B10S (Fig. 27) se sintetizaron los oligonucleótidos B1 y B4 con la información de la secuencia de los posibles genes RRC03927 y RRC03930, y se amplificó por PCR el fragmento de unos 1,6 kb que incluye el gen *nprB* (RRC03929) y sus regiones flanqueantes (Pérez-Reinado, 2005). La secuencia de este fragmento de aproximadamente 1,6 kb se muestra en la Fig. 28.

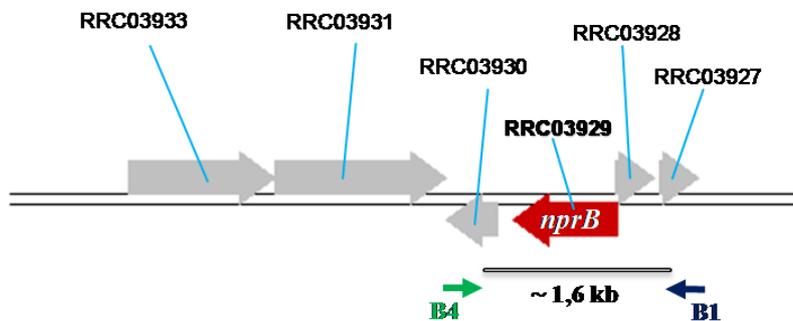


Figura 27. Gen *nprB* y regiones adyacentes. Esquema de la disposición del gen *nprB* (RRC03929) en el genoma de *R. capsulatus*. Los oligonucleótidos B1 y B4 se utilizaron para la amplificación por PCR del fragmento de ~1,6 kb que contiene el gen *nprB*.

Existen dos posibles tripletes ATG para el inicio del gen RRC03929 (*nprB*). En la anotación del genoma de la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* SB1003 (<http://www.ergo-light.com/ERGO/>) el gen RRC03929 (*nprB*) comienza en el primero de ellos, por lo que codificaría una proteína de 242 residuos de aminoácidos (Fig. 28). Sin embargo, este inicio carece de sitio de unión de los ribosomas, daría lugar a una proteína con un extremo N-terminal más largo que en otras nitrorreductasas homólogas, y presentaría un amplio solapamiento con la secuencia del gen RRC03928 que se transcribe en dirección contraria (Fig. 28). Por todo ello, es mucho más probable que el gen *nprB* comience en el segundo ATG, que sí está precedido por una secuencia Shine–Dalgarno típica de unión a ribosomas, y que daría un tamaño de 201 residuos de aminoácidos a la proteína NprB, similar al de otras nitrorreductasas (Fig. 29), eliminando además el solapamiento con el gen divergente RRC03928 (Fig. 28).

Tras el codón de terminación del gen *nprB* existe una secuencia que podría actuar como un terminador de la transcripción independiente de Rho (Fig. 28). Aunque se ha demostrado que el gen *nprB* tiene una expresión constitutiva (Pérez–Reinado *et al.*, 2005), en la secuencia promotora del gen *nprB* no se han identificado posibles cajas –35 y –10 que se asemejen a la secuencia consenso descrita para los promotores dependientes de σ^{70} de *Rhodobacter*. Tampoco aparecen elementos similares a las cajas *mar/sox/rob* encontrados en la secuencia promotora del gen *nprA* (no mostrado).

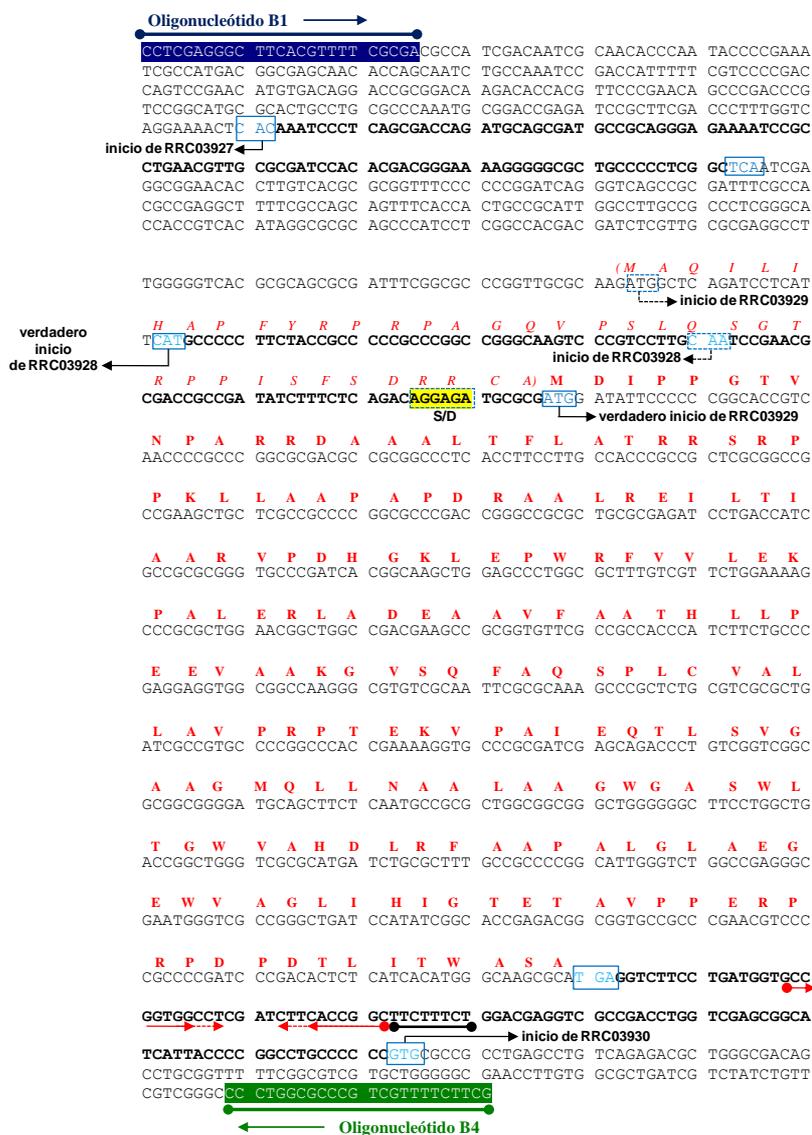


Figura 28. Secuencia del fragmento de aproximadamente 1,6 kb que contiene el gen *nprB* de *Rhodobacter capsulatus* B10S y sus regiones flanqueantes. La secuencia Shine-Dalgarno (S/D) está marcada en color amarillo. Asimismo se representan los posibles sitios de inicio de los genes (flechas continuas para los más probables y discontinuas para los menos probables). La secuencia del extremo N-terminal del producto del gen RRC03929 (*nprB*) correspondiente al inicio menos probable se indica entre paréntesis y en cursiva. La secuencia de la proteína NprB con el inicio más probable precedido por la secuencia Shine-Dalgarno se muestra con letras normales en negrita. Las regiones intergénicas se representan en negritas. Con flechas divergentes se muestra una posible estructura de horquilla que precede a una secuencia rica en T (subrayada) que podría actuar como terminador independiente de Rho.

El gen *nprB* de *R. capsulatus* B10S codifica un polipéptido de 201 residuos de aminoácidos, con una masa molecular y un pI teóricos de 21.265 Da y 6,1, respectivamente. La secuencia de esta proteína se comparó con las secuencias existentes en las bases de datos y presentaba homología con otras posibles nitrorreductasas. La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida se realizó mediante el método Clustal W utilizado por el programa BioEdit (Fig. 29).

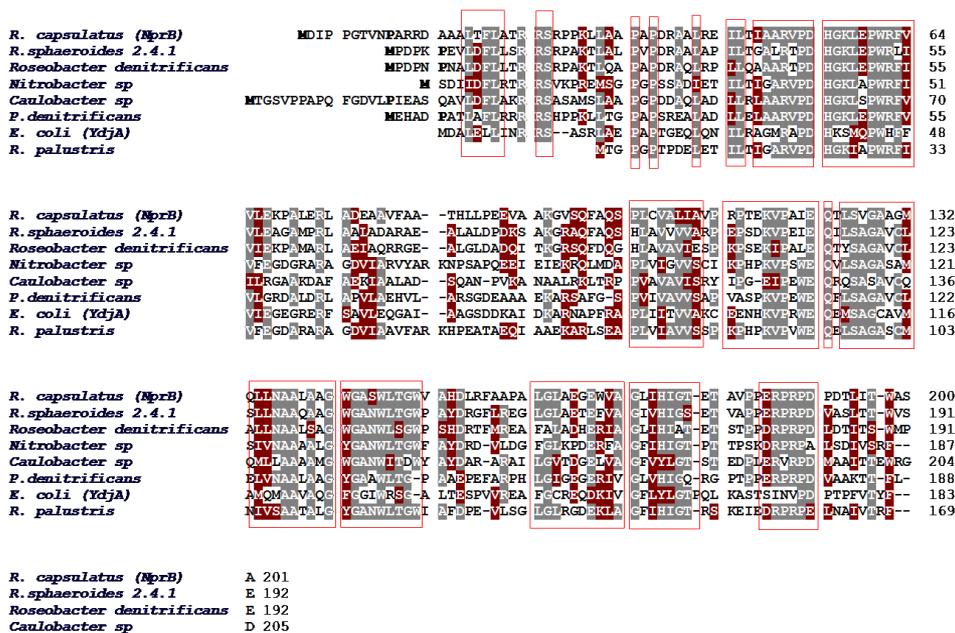


Figura 29. Alineamiento múltiple de la proteína NprB de *Rhodobacter capsulatus* B10S con diferentes nitrorreductasas. El alineamiento de secuencias se realizó utilizando el método Clustal W del programa de alineamiento múltiple de secuencias BioEdit. Los aminoácidos idénticos se muestran sombreados en gris, mientras que los que son similares están sombreados en rojo. La proteína NprB de *R. capsulatus* B10S, de 201 aminoácidos, presenta el dominio de unión del FMN muy conservado, al igual que otras nitrorreductasas (marcado con recuadros rojos).

Las proteínas NprA y NprB de *R. capsulatus* presentan poca similitud entre sí (no mostrado). NprA presenta homología con otras nitrorreductasas insensibles a oxígeno, entre las que se encuentra la proteína NfnB de *E. coli*, mientras que la comparación de la secuencia de

aminoácidos del producto del gen *nprB* de *R. capsulatus* B10S con las secuencias disponibles en las bases de datos muestra que solamente presenta similitud con nitrorreductasas que todavía no han sido caracterizadas bioquímicamente (Fig. 29, Tabla 3). Así, NprB presentó una identidad del 60% y una similitud del 68 – 70% con posibles nitrorreductasas de varias estirpes de *Rhodobacter sphaeroides* y una identidad del 44 – 59% y una similitud del 57 – 71% con otras nitrorreductasas hipotéticas no caracterizadas de otros organismos como *Caulobacter*, *Nitrobacter*, *Roseobacter* y *Paracoccus denitrificans*. Además, NprB también presentó cierta similitud con la nitrorreductasa YdjA de *E. coli* (Fig. 29, Tabla 3).

Tabla 3. Proteínas con las que presenta homología NprB

Organismo	AA	%		Nº acceso
		Identidad	Similitud	
<i>Roseobacter</i> sp. AzwK-3b	192	60	69	ZP_01904412
<i>R. sphaeroides</i> ATCC17025	192	60	68	YP_001166582
<i>R. sphaeroides</i> ATH2.4.1	192	60	70	YP_353888
<i>R. sphaeroides</i> ATCC17029	192	60	70	YP_001044340.1
<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh 114	192	59	71	YP_681519.1
<i>R. palustris</i> BisB5	191	45	62	YP_570387.1
<i>Nitrobacter</i> sp. Nb-311A	187	45	58	ZP_01047350.1
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	188	49	61	ZP_00631078.1
<i>Caulobacter</i> sp. K31	205	44	57	YP_001685379.1
<i>E. coli</i> P0ACY1 (YdjA)	183	24	41	NP_456216

AA = número de residuos de aminoácidos

La comparación de las secuencias de aminoácidos de estas nitrorreductasas que presentan homología con la proteína NprB de *Rhodobacter capsulatus* B10S revela la presencia de 13 residuos muy conservados de leucina (posiciones 18, 21, 32, 42, 46, 58, 104, 125, 148, 163 y 165 en la secuencia de B10S en la Fig. 29), la mayoría de los cuales se encuentran en bloques de secuencias muy conservados en todas estas nitrorreductasas (marcadas con un recuadro rojo en la Fig. 29), que podrían formar parte del dominio de unión del cofactor FMN en estas proteínas. Además, la proteína NprB de *R. capsulatus* B10S posee un único residuo de cisteína (Cys¹⁰⁵), pero este residuo aminoácido no se observa como conservado. No obstante, se ha demostrado que el residuo Cys⁶⁹ de la proteína *N*-acetiltransferasa de *Salmonella typhimurium* juega un papel crucial en el mecanismo catalítico de esta proteína (Watanabe *et al.*, 1994). Asimismo, es destacable la gran cantidad de residuos de Arg (14 residuos en las posiciones 40, 49, 50, 70, 75, 79, 107, 129, 137, 138, 140, 141, 145, 153 y 172), que están presentes y conservados en estas proteínas (Fig. 29).

2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB

En este trabajo se ha fusionado el gen *nprB* de *R. capsulatus* B10S a una cola de polihistidinas para purificar la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad. Los resultados obtenidos confirman que el gen *nprB* de la estirpe B10S codifica una nitrorreductasa con propiedades bioquímicas distintas a las mostradas por la nitrorreductasa NprA.

2.1. Amplificación mediante PCR del gen *nprB* de *R. capsulatus*

Para la clonación del gen *nprB* de *R. capsulatus* B10S en un vector de expresión con secuencia de polihistidinas se procedió en primer lugar a diseñar los cebadores HISNPRB1 y HISNPRB2 para realizar la amplificación por PCR de una región de aproximadamente 0,7 kb que contenía el gen *nprB* de la estirpe B10S (Fig. 30). Estos cebadores incluyen la secuencia de corte de las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente, para facilitar la clonación del fragmento amplificado.

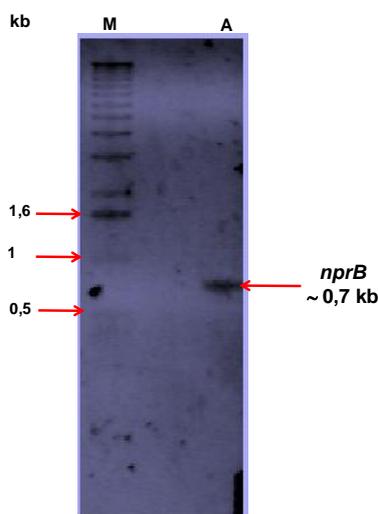


Figura 30. Amplificación de un fragmento de unos 0,7 kb que contiene el gen *nprB*. M) Marcador del tamaño del DNA (“DNA Molecular Marker X”) A) Fragmento amplificado mediante PCR con los oligonucleótidos HISNPRB1 y HISNPRB2, que contiene el gen *nprB*.

Dicho producto de PCR se clonó en el vector de clonación pGEM–T dando como resultado el plásmido pVE1, el cual se secuenció con los oligonucleótidos T7 y SP6 de pGEM–T, comprobándose que la secuencia del gen *nprB* de la estirpe B10S era idéntica a la descrita anteriormente (Pérez-Reinado *et al.*, 2005) (Fig. 31).

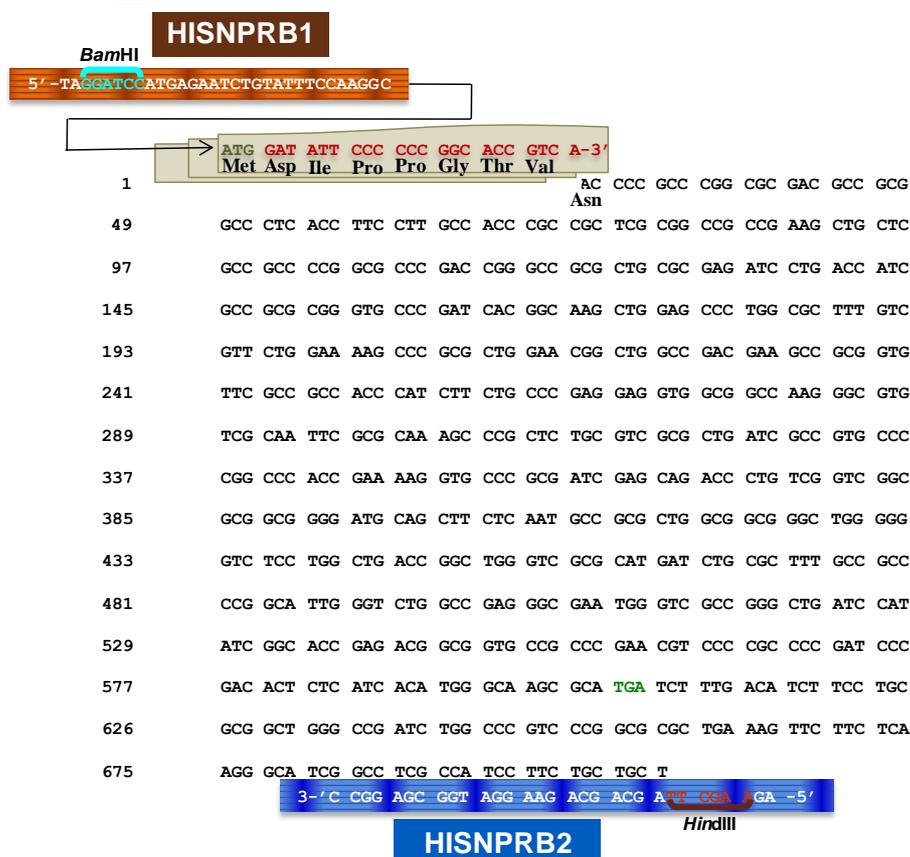


Figura 31. Secuencia nucleotídica del gen *nprB* de *R. capsulatus*. En la figura se muestran los dos oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen, que incluyen los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente. También se indica el codón de inicio ATG y el de terminación TGA del gen *nprB*.

2.2. Clonación del gen *nprB* en el vector de expresión pQE32

A continuación el fragmento *Bam*HI-*Hind*III de unos 0,7 kb se clonó en el vector de expresión pQE32, dando como resultado la construcción pVE2, en la que el gen *nprB* está clonado tras la secuencia del vector que codifica seis residuos consecutivos de His que quedan en el mismo marco de lectura de la proteína NprB, por lo que se obtendría la proteína recombinante His₆-NprB, con la cola de polihistidina fusionada en el extremo N-terminal.

La digestión del plásmido pVE2 (pQE32-*nprB*) con diferentes enzimas de restricción confirmó la presencia del gen *nprB* en la construcción. Además, la secuenciación del plásmido pVE2 corroboró que el gen *nprB* estaba fusionado en la fase de lectura correcta con la secuencia de polihistidinas codificada por el vector pQE32. Por lo tanto, la construcción pVE2 (pQE32-*nprB*) se introdujo en *E. coli* JM109 para la expresión y purificación de la proteína recombinante His₆-NprB.

2.3. Detección de la proteína His₆-NprB en geles de poliacrilamida mediante tinción por Coomassie e inmunodetección

A partir de las células de *E. coli* transformadas con pVE2 (pQE32-*nprB*), previamente inducidas por IPTG, se obtuvieron las fracciones solubles como se describe en Materiales y Métodos. Estos extractos se cargaron en un gel SDS-PAGE para analizar la presencia de la proteína recombinante His₆-NprB mediante inmunodetección. Dicha proteína se detectó en las fracciones solubles correspondientes a los tres tiempos de inducción, 1, 2 y 3 horas (Fig. 32). El tamaño esperado para

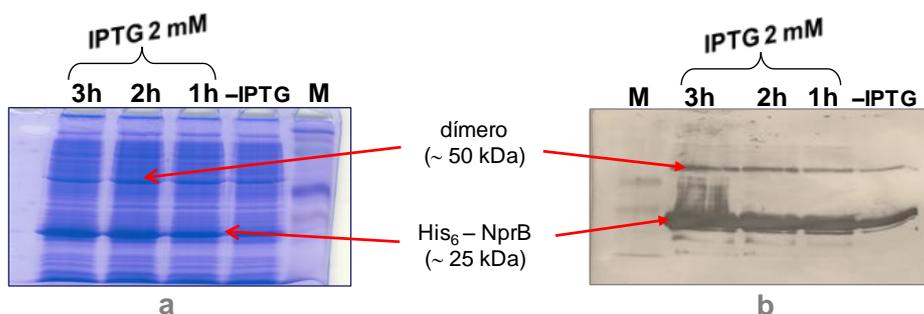


Figura 32. Tinción con Coomassie e inmunodetección de la proteína His₆-NprB. La inducción se llevó a cabo cuando los cultivos presentaban una absorbancia a 600 nm de 0,5 – 0,7. Se utilizaron tres tiempos de inducción, 1, 2, y 3 h, y una concentración de IPTG de 2 mM. Las fracciones solubles de células de *E. coli* (pQE32-*nprB*) en distintas condiciones de inducción se cargaron en geles para SDS-PAGE que se tiñeron con azul de Coomassie (a) o se sometieron a inmunodetección con anticuerpos frente al motivo de polihistidinas, como se indica en Materiales y Métodos (apartado 10) (b). La concentración de proteína total cargada en cada calle fue 2,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. M: SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range.

la proteína NprB, según se deduce del análisis de su secuencia de aminoácidos, es de aproximadamente 23 kDa. El tamaño de la proteína detectada fue muy similar al esperado (unos 25 kDa) y también se observó una banda tenue de un tamaño aproximado de 50 kDa, que podría corresponder a un dímero de la proteína NprB.

2.4. Expresión heteróloga de la proteína recombinante His₆-NprB en *Escherichia coli* y análisis de su capacidad de activar al profármaco CB1954

Para comprobar si la proteína NprB de *R. capsulatus* se expresa funcionalmente en *E. coli*, y además para conocer la capacidad que tiene para activar el profármaco CB1954 utilizado en las terapias antitumorales, se siguió el crecimiento aeróbico, tanto en ausencia como en presencia del profármaco CB1954, de las células de *E. coli* JM109 transformadas con la construcción pVE2 (pQE32-*nprB*), en comparación con células transformadas con el plásmido control pQE32 y con células portadoras del plásmido pMO2-AH (pQE32-*nprA*) que permite la expresión heteróloga de la nitrorreductasa NprA de *R. capsulatus* como proteína recombinante His₆-NprA (Pérez-Reinado *et al.*, 2008). Cuando los cultivos alcanzaron una absorbancia a 600 nm entre 0,2 y 0,3, se adicionó IPTG 1 mM a todos los cultivos para inducir la expresión de las proteínas NprB y NprA. Además, en los cultivos con CB1954, este compuesto se añadió a concentración 100, 500 ó 1000 μ M, realizándose también controles en los que no se adicionó CB1954 (Fig. 33).

En ausencia del profármaco CB1954, las células de *E. coli* JM109 transformadas con el plásmido pQE32 o con la construcción pVE2 portadora del gen *nprB* alcanzaron un crecimiento similar. Sorprendentemente, en presencia de CB1954 100 μ M el crecimiento fue mayor en las células transformadas con pVE2, que expresan el gen *nprB*

de *R. capsulatus*, que en las células control (pQE32), que sólo tienen las nitrorreductasas propias de *E. coli*. A mayores concentraciones de este profármaco (500 y 1000 μM) el crecimiento se redujo significativamente y fue similar en las células transformadas con pQE32 y con pVE2 (Fig. 33a). Sin embargo, las células transformadas con la construcción pMO2–

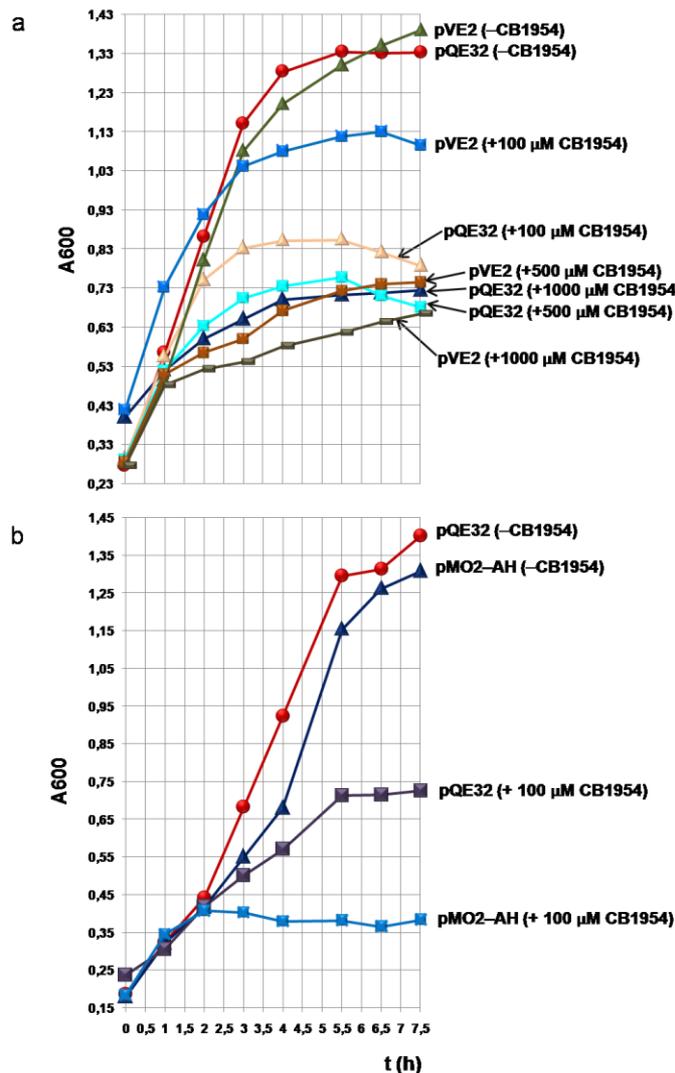


Figura 33. Efecto del profármaco CB1954 sobre el crecimiento aeróbico de células de *E. coli* JM109 que expresan los genes *nprB* o *nprA* de *R. capsulatus*. Las células de *E. coli* se transformaron con el plásmido pQE32 control o la construcción pVE2 con el gen *nprB* de *R. capsulatus* y se cultivaron con CB1954 0, 100, 500 y 1000 μM (a). Igualmente, las células de *E. coli* transformadas con el plásmido pQE32 o la construcción pMO2–AH con el gen *nprA* (Pérez–Reinado *et al.*, 2008) se cultivaron con o sin CB1954 100 μM (b).

AH, que expresan el gen *nprA* de *R. capsulatus* (Pérez-Reinado *et al.*, 2008), mostraron un crecimiento mucho menor en presencia de CB1954 100 μM que las células transformadas con el plásmido control pQE32, que no expresan el gen *nprA* y que por lo tanto sólo poseen las nitrorreductasas endógenas de *E. coli* (Fig. 33b).

Una característica importante de las técnicas antitumorales ADEPT, GDEPT y VDEPT para determinados tipos de cáncer es que la activación de un profármaco pueda producir metabolitos citotóxicos capaces de generar un efecto local en el tumor de un paciente. La reducción del profármaco CB1954 por enzimas con actividad DT-diaforasa o nitrorreductasa (Fig. 34) produce los derivados 4-hidroxilamino (principal metabolito y potente citotóxico) y 2-hidroxilamino, así como sus correspondientes derivados acetilados (Knox *et al.*, 1993). Aunque el derivado 4-hidroxilamino es el más citotóxico, el derivado 2-hidroxilamino es también efectivo en células

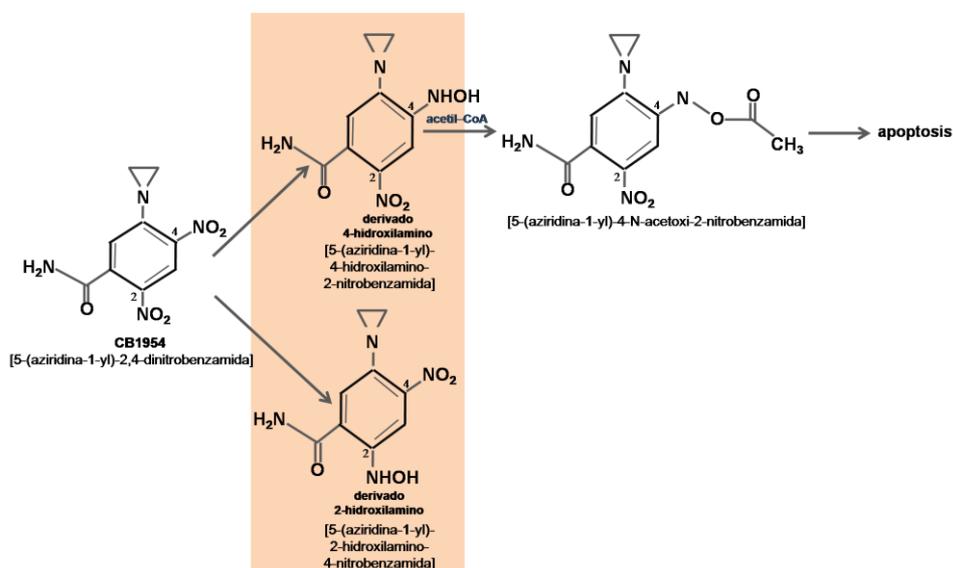


Figura 34. Reducción del profármaco CB1954 con enzimas DT-diaforasas o nitrorreductasas. Se muestra la formación de los derivados 4- o 2-hidroxilamino correspondientes, respectivamente, con la posterior activación con acetil-CoA del derivado 4-hidroxilamino causando apoptosis (adaptada de Race *et al.*, 2007).

tumorales humanas (Helsby *et al.*, 2004; Race *et al.*, 2007). Ciertas nitrorreductasas como la proteína NfsB de *Escherichia coli*, reducen cualquiera de los dos grupos nitro ($-\text{NO}_2$) del profármaco CB1954 a los derivados 4- o 2-hidroxilamino correspondientes, en cantidades iguales y a la misma velocidad; sin embargo, este compuesto xenobiótico es reducido mucho más rápidamente con esta clase de nitrorreductasas que con las enzimas con actividad DT-diaforasa (Knox *et al.*, 1993).

La nitrorreductasa NprA de *R. capsulatus* B10S es capaz de producir la bioactivación del profármaco CB1954 con gran rapidez, como se deduce de la mayor inhibición del crecimiento de las células de *E. coli* que expresan el gen *nprA* (Fig. 33b). Esto sugiere que NprA probablemente forma mayor concentración del compuesto derivado 4-hidroxilamino, por lo que también podría ser utilizada como bioactivador en las terapias antitumorales utilizando el profármaco CB1954. Sin embargo, la nitrorreductasa NprB de *R. capsulatus* no es tan efectiva en la activación de CB1954 (Fig. 33a), probablemente porque transforma este compuesto en un derivado de menor toxicidad que el 4-hidroxilamino, como el 2-hidroxilamino o los aminoderivados. Como tras la hiperexpresión de NprB las nitrorreductasas endógenas de *E. coli* tendrían menor concentración disponible de CB1954, no se formaría tanta cantidad del derivado 4-hidroxilamino altamente citotóxico como en ausencia de NprB, y esto explicaría el crecimiento ligeramente mayor en estas condiciones (Fig. 33a). No obstante, la nitrorreductasa NprB de *R. capsulatus* podría bioactivar otros profármacos diferentes a CB1954 que podrían ser utilizados con el mismo fin.

3. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La estrategia general que se adoptó para realizar estudios bioquímicos de la proteína recombinante His₆-NprB fue llevar a cabo su purificación en condiciones que permitieron alcanzar una cantidad suficiente de dicha proteína y con un alto grado de pureza.

La fracción soluble obtenida en el fraccionamiento subcelular a partir de 4 L de cultivo de la estirpe *E. coli* JM109 portadora del plásmido pVE2, tras la inducción con IPTG 2 mM durante 3 h, se sometió a una cromatografía de afinidad en columna con una resina de níquel-NTA agarosa. Dicha cromatografía se llevó a cabo en condiciones no desnaturalizantes. En estas condiciones la interacción de las proteínas no marcadas con histidinas con la resina Ni-NTA es más alta que en condiciones desnaturalizantes, por lo que es conveniente añadir bajas concentraciones de imidazol (5 mM) en los tampones de lisis y lavado. Para extraer la proteína recombinante His₆-NprB retenida en la columna se aplicó un gradiente de imidazol de 5 a 250 mM, y posteriormente se realizó un lavado con imidazol 250 mM (Fig. 35), como se indica en Materiales y Métodos. Las fracciones cromatográficas contenían un volumen final de 1 mL.

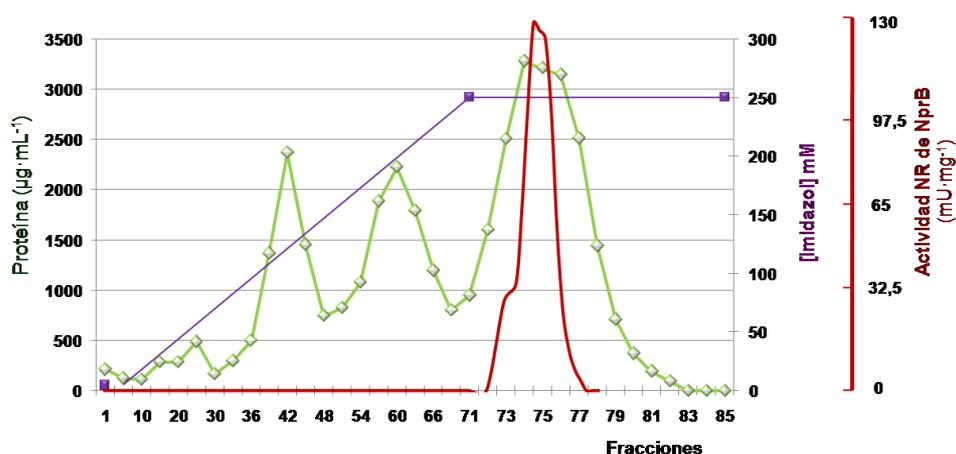


Figura 35. Perfil de elución de la proteína His₆-NprB en una columna de afinidad con níquel-NTA agarosa. Para separar la proteína recombinante se utilizó en primer lugar un gradiente de concentración de imidazol de entre 5 y 250 mM. Sin embargo, la proteína recombinante His₆-NprB se extrajo con una gran pureza al utilizar una concentración fija de imidazol a 250 mM. La actividad nitrorreductasa (NR) de NprB se midió con 2,4,6-trinitrofenol (TNP o ácido pícrico) como sustrato.

Durante la purificación se midió la concentración de proteínas de las distintas fracciones mediante el método de Bradford. Posteriormente, se sometieron las fracciones a SDS-PAGE y se analizaron los geles mediante la tinción con azul de Coomassie e inmunodetección con anticuerpos anti-histidina (Fig. 36). Además, se determinó la actividad nitrorreductasa en las fracciones que tuvieron mayor pureza.

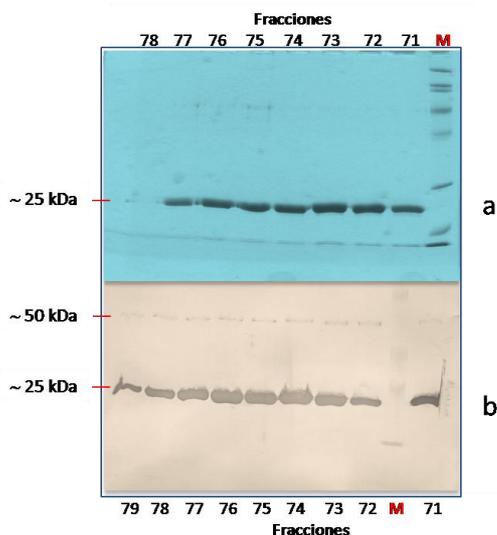


Figura 36. Tinción con Coomassie e inmunodetección de la proteína His₆-NprB en las fracciones cromatográficas. Las distintas fracciones cromatográficas eluidas de la columna Ni-NTA aparecen numeradas. **M**, marcador de peso molecular. a) Tinción con azul de Coomassie; b) inmunodetección con anticuerpos frente al motivo de polihistidinas.

El análisis de las fracciones cromatográficas mostró que la mayor parte de la proteína His₆-NprB se encontraba con gran pureza entre las fracciones 71 y 79, que corresponden a una concentración de 250 mM de imidazol (Fig. 35).

Las fracciones que presentaron mayor actividad nitrorreductasa (72 – 78) se agruparon, y mediante el método de Bradford se determinó la cantidad de proteína total, que fue de 19,3 mg·mL⁻¹. Como la masa molecular deducida de la secuencia de la proteína NprB recombinante con el motivo de histidinas es de 22.230 Da, la concentración de la proteína obtenida fue aproximadamente 868,2 μM. A partir de los 2982,5 mg de proteína del extracto crudo correspondiente a los 4 L de cultivo, se obtuvieron 135,1 mg totales de proteína purificada. El rendimiento de esta purificación fue aproximadamente de 33,7 mg·L⁻¹ de cultivo.

La proteína His₆-NprB presentó en SDS-PAGE una masa molecular de aproximadamente 25 kDa (Fig. 36), bastante parecida a la masa molecular teórica deducida de la secuencia. La masa molecular de los monómeros de otras nitrorreductasas purificadas oscilan entre 24 y 28 kDa. Así, la proteína NfsB de *E. coli* presenta una masa molecular de 24 kDa (Zenno *et al.*, 1996b), la proteína NR de *Enterobacter cloacae* de 27 kDa (Bryant y DeLuca, 1991) y la proteína Cnr de *Salmonella typhimurium* presenta una masa de 28 kDa (Watanabe *et al.*, 1998). La masa molecular del monómero de la nitrorreductasa de *R. capsulatus* E1F1 purificada por Blasco y Castillo (1993) es de unos 27 kDa y la nitrorreductasa NprA de *R. capsulatus* B10S es de 23 kDa (Pérez-Reinado *et al.*, 2005). Al igual que todas las nitrorreductasas descritas, excepto la nitrobenzeno reductasa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 (Sommerville *et al.*, 1995) que no muestra homología con las nitrorreductasas clásicas, NprB aparentemente es también activa como un homodímero. En el análisis mediante SDS-PAGE de la proteína NprB se observó una banda tenue de unos 50 kDa, aproximadamente el doble del tamaño de la banda mayoritaria, que podría corresponder a un dímero de la proteína (Figs. 32 y 36).

4. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆-NprB

4.1. Donadores fisiológicos de electrones y sustratos de la proteína His₆-NprB

La mayoría de las nitrorreductasas descritas presentan actividad con una amplia variedad de sustratos. El análisis filogenético de las secuencias de las nitrorreductasas de tipo I o insensibles a oxígeno indica que se pueden clasificar en dos superfamilias representadas por las nitrorreductasas de *Escherichia coli* NfsA (grupo A) y NfsB (grupo B),

respectivamente (Pérez-Reinado *et al.*, 2005; Roldán *et al.*, 2008) (Fig. 12). Las nitrorreductasas pertenecientes al grupo A son generalmente dependientes de NADPH, mientras que las nitrorreductasas del grupo B pueden utilizar indistintamente NADH o NADPH como dadores de electrones (Roldán *et al.*, 2008).

La estirpe *Rhodobacter capsulatus* B10S posee dos nitrorreductasas importantes, NprA y NprB, implicadas en la reducción del 2,4-DNP, ambas del grupo B (Fig. 12). La proteína NprA purificada de *Rhodobacter capsulatus* B10S presenta actividad con diversos compuestos aromáticos y heterocíclicos utilizados por otras nitrorreductasas, y esta actividad es ligeramente superior con NADPH como donador de electrones en comparación con el NADH (Pérez-Reinado *et al.*, 2005). Sin embargo, la proteína His₆-NprB de *Rhodobacter capsulatus* B10S mostró la máxima actividad con NADH como donador de electrones, aunque con NADPH se obtuvo cerca del 80% de la actividad que se observó con el NADH. La proteína NfnB de *E. coli* también utiliza ambos donadores (Zenno *et al.*, 1996b), al igual que la nitrorreductasa Cnr de *Salmonella typhimurium* (Watanabe *et al.*, 1998). La NR de *Enterobacter cloacae* utiliza ambos, aunque prefiere el NADH (Bryant y DeLuca, 1991), y también utiliza ambos cofactores la FRasaI de *Vibrio fischeri* (Zenno *et al.*, 1994). Por lo tanto, la proteína NprB comparte con sus homólogos pertenecientes al grupo B de las nitrorreductasas tipo I la capacidad de usar NADPH o NADH como dador de electrones, aunque con cierta preferencia por el NADH.

Para comprobar la especificidad de sustrato mostrada por la enzima His₆-NprB purificada se ensayaron diversos compuestos aromáticos y heterocíclicos en las condiciones especificadas en los Materiales y Métodos, utilizando siempre como control la enzima hervida. Todos los ensayos se llevaron a cabo con una concentración 0,2 mM de cada sustrato. Como aspectos interesantes en cuanto a

especificidad de sustrato se refiere, destacan que la enzima mostró mayor actividad nitrorreductasa con ácido pícrico o 2,4,6–trinitrofenol (TNP) y que se encontró actividad tanto con el antibiótico nitrofurantoína (NFN) como con el explosivo 2,4,6–trinitrotolueno (TNT), aproximadamente el 53% y el 35%, respectivamente, de la actividad obtenida con ácido pícrico (Fig. 37).

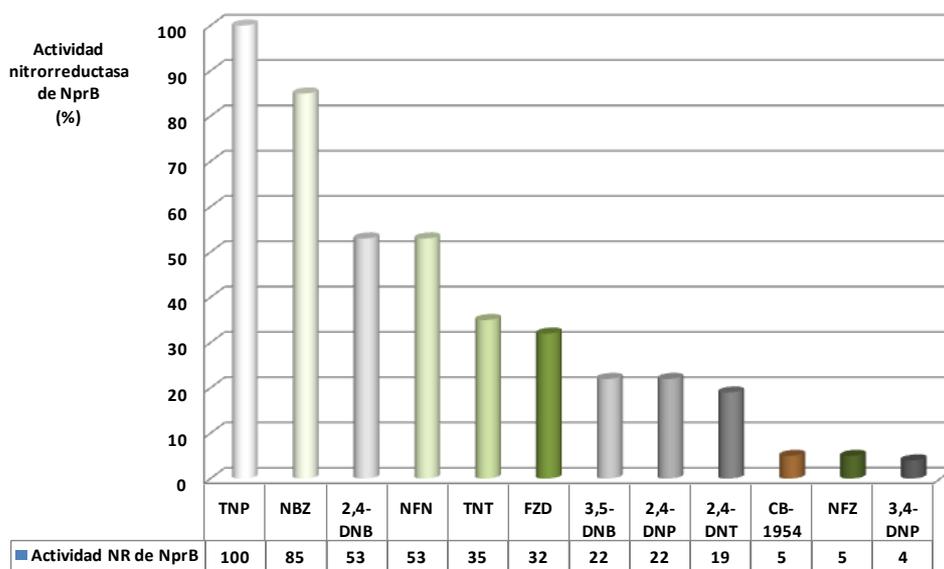


Figura 37. Actividad nitrorreductasa de la proteína His₆–NprB con diferentes sustratos. La máxima actividad se obtuvo con TNP (163,0 mU·mg⁻¹). Este valor se considera como 100% para la comparación con las actividades obtenidas de otros sustratos.

La nitrofurazona (NFZ) ha sido el sustrato universal utilizado para la medida de la actividad nitrorreductasa de varias enzimas estudiadas. La actividad de NprB con la nitrofurazona fue inferior a la descrita para las nitrorreductasas NfsA y NfnB de *E. coli*, Frp de *Vibrio harveyi*, Cnr de *Salmonella typhimurium*, NR de *Enterobacter cloacae* y NprA de *R. capsulatus*. Lo mismo ocurre con la furazolidona (FZD) y la nitrofurantoína (NFN), otros de los sustratos utilizados por las nitrorreductasas de *E. coli* (Zenno *et al.*, 1996a). Sin embargo, en el caso

de la nitrofurantoina, la actividad nitrorreductasa de NprB fue algo más elevada, aunque inferior a la de la proteína NfsB de *E. coli* (Zenno *et al.*, 1996b). La proteína NprB también presentó actividad con el 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT) y el ácido 3,5-dinitrobenzoico (3,5-DNB), aunque igualmente inferior a la mostrada por otras nitrorreductasas como la NR de *Enterobacter cloacae* (Bryant y DeLuca, 1991). Curiosamente, con el 2,4-DNP, el principal sustrato nitroaromático de la nitrorreductasa NprA de *R. capsulatus* (Pérez-Reinado *et al.*, 2005, 2008), sólo se obtuvo un 22% de actividad respecto a la del TNP (Fig. 37). Con el profármaco CB1954 se obtuvo una baja actividad en comparación con el TNP (5%). Sin embargo, esta actividad es suficiente para transformar al profármaco, según se muestra en la Figura 33.

Los compuestos polinitroaromáticos como el TNP y TNT son metabolizados por un número limitado de microorganismos (Esteve-Núñez *et al.*, 2001; Heiss *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2005). Asimismo, sólo unos pocos trabajos han demostrado que algunos microorganismos pueden utilizar el TNT como única fuente de nitrógeno (Esteve-Núñez y Ramos, 1998; French *et al.*, 1998; Popesku *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2004; Robertson y Jjemba, 2005). El TNT es utilizado como sustrato por la NR de *E. cloacae* (Bryant y DeLuca, 1991), la nitrorreductasa PnrB de *Pseudomonas* sp. HK-6 (Lee *et al.*, 2008), la nitrorreductasa PnrA de *Pseudomonas putida* JLR11 (Caballero *et al.*, 2005) y nitrorreductasas tipo I de *Clostridium acetobutylicum* (Kutty y Bennett, 2005) y de *Klebsiella* sp. C1 (Kim y Song, 2005). El TNT también fue utilizado como sustrato por la nitrorreductasa NprB de *Rhodobacter capsulatus* B10S (Fig. 37), aunque no por la proteína NprA de esta bacteria (Pérez-Reinado *et al.*, 2008). Así, la proteína NprB de *R. capsulatus*, en las condiciones de ensayo (medición del consumo de NADH), fue capaz de reducir el TNT mostrando hasta un 35% de actividad ($57,0 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$)

respecto de la actividad máxima con TNP. Sin embargo, al igual que con otros sustratos, la capacidad de la proteína NprB para reducir TNT también fue inferior a la que presentan otras nitrorreductasas tipo I que tienen capacidad reductora de TNT, como las proteínas PnrB de *Pseudomonas* sp. (Lee *et al.*, 2008), NitA y NitB de *Clostridium acetobutylicum* (Kutty y Bennett, 2005) y NRI de *Klebsiella* sp. (Kim y Song, 2005).

Los compuestos xenobióticos Aroclor 1254 o benzo(a)pireno han sido utilizados anteriormente en ensayos de mutagénesis (McCoy *et al.*, 1981), pero con estos compuestos no se observó actividad nitrorreductasa en la proteína NprB. De todos los compuestos aromáticos ensayados, la actividad máxima se encontró con el TNP, que fue cinco veces superior que las observadas en las proteínas nitrofenol reductasa y NprA, respectivamente (Blasco y Castillo, 1993; Pérez-Reinado *et al.*, 2008). Por lo tanto, la enzima NprB de *R. capsulatus* B10S posee una amplia especificidad de sustrato, al igual que la mayoría de las nitrorreductasas descritas, y aunque con algunos compuestos esta actividad es baja, es especialmente destacable la actividad observada con compuestos polinitroaromáticos como el TNP y el TNT.

4.2. Espectro UV/vis de la proteína recombinante His₆-NprB

La proteína purificada presentó un color amarillo característico de las flavoproteínas. Dicho color permaneció después de dializar la muestra. El espectro UV/vis de la proteína reveló la presencia de FMN (Fig. 38). El FMN libre en solución en su estado oxidado presenta máximos a 375 nm y 445 nm, pero en el espectro oxidado de la proteína recombinante His₆-NprB, estos máximos se encontraron ligeramente desplazados, con máximos de absorción a 384 nm y 449 nm, como ocurre en otras nitrorreductasas (Koder y Miller, 1998; Pérez-Reinado *et*

al., 2008). El espectro obtenido tras la adición de ditionito muestra la proteína parcialmente reducida. El cálculo estequiométrico de la flavina se determinó en función de la absorbancia a 450 nm ($\epsilon_{450} = 11,29 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Bryant y DeLuca, 1991; Somerville *et al.*, 1995) y la cantidad de FMN detectada correspondió a 0,84 moles de FMN por mol de proteína NprB. La concentración de FMN en la muestra, tras el análisis del espectro, resultó ser de 96 μM , para una concentración de proteína de 114,3 μM .

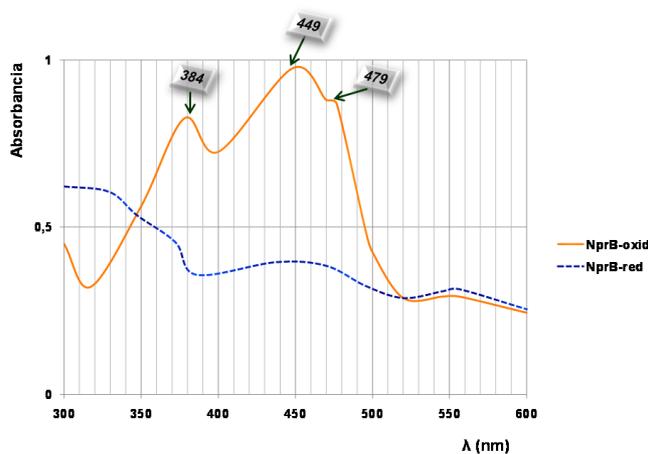


Figura 38. Espectro de absorción UV/visible de la proteína recombinante His₆-NprB. En línea naranja continua se representa el espectro de absorción de la proteína en estado oxidado y en línea azul discontinua el espectro de la proteína reducida con ditionito 780 μM . La concentración de proteína total en la muestra fue 2,4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (114,3 μM).

Las nitrorreductasas insensibles a oxígeno de enterobacterias y otros miembros de la familia B que comparten una elevada similitud en la secuencia de aminoácidos poseen FMN como cofactor (Bryant *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1992; Michael *et al.*, 1994; Zenno *et al.*, 1994; 1996a,b; Watanabe *et al.*, 1998; Roldán *et al.*, 2008). El análisis del espectro UV/vis de la proteína purificada sugiere que la proteína NprB de *R. capsulatus* también presenta FMN como cofactor y que este espectro es muy similar al de otras nitrorreductasas purificadas (Fig. 38).

La diferencia observada con respecto a los máximos de absorción del FMN unido a la enzima y libre, indican que el cofactor se encuentra unido en un ambiente hidrofóbico (Koder y Miller, 1998). La resistencia a la diálisis, sugiere que este cofactor se encuentra fuertemente unido a la enzima, como sucede con las proteínas NfsA (Zenno *et al.*, 1996a) y NfnB (Zenno *et al.*, 1996b) de *E. coli*, Cnr de *Salmonella typhimurium* (Watanabe *et al.*, 1998), nitrobenzeno reductasa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 (Sommerville *et al.*, 1995) y NprA de *R. capsulatus* SB10 (Pérez-Reinado *et al.*, 2005). Sin embargo, la NR de *Enterobacter cloacae* pierde el cofactor durante la purificación, siendo necesario su adición para obtener una actividad óptima (Bryant y DeLuca, 1991). En la proteína NprB de *R. capsulatus* SB10, la cantidad de FMN detectada espectrofotométricamente fue de 96 μM para una concentración de proteína aproximada de 114,3 μM , obteniéndose una relación FMN/proteína de 0,84, lo que sugiere una estequiometría aproximada de un mol de FMN por mol de proteína NprB. Esto mismo sucede con la mayoría de las nitrorreductasas descritas, aunque la nitrobenzeno reductasa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 (Sommerville *et al.*, 1995) y la nitrorreductasa purificada de *Selenomonas ruminantium* (Anderson *et al.*, 2002) aparentemente presentan dos moles de FMN por mol de enzima. Igualmente, los espectros de absorción UV/vis en estado oxidado de las proteínas WrbA de *Escherichia coli* y *Archaeoglobus fulgidus*, que son flavoenzimas dependientes de NAD(P)H y que reducen quinonas (Patridge y Ferry, 2006), también son similares al de la proteína NprB de *R. capsulatus*.

4.3. Temperatura y pH óptimos de la actividad nitrorreductasa de la proteína His₆-NprB

La actividad nitrorreductasa, utilizando TNP como sustrato y NADH como donador de electrones, fue máxima a una temperatura de 33 °C (Fig. 39), mientras que el pH óptimo fue de 7,0 (Fig. 40).

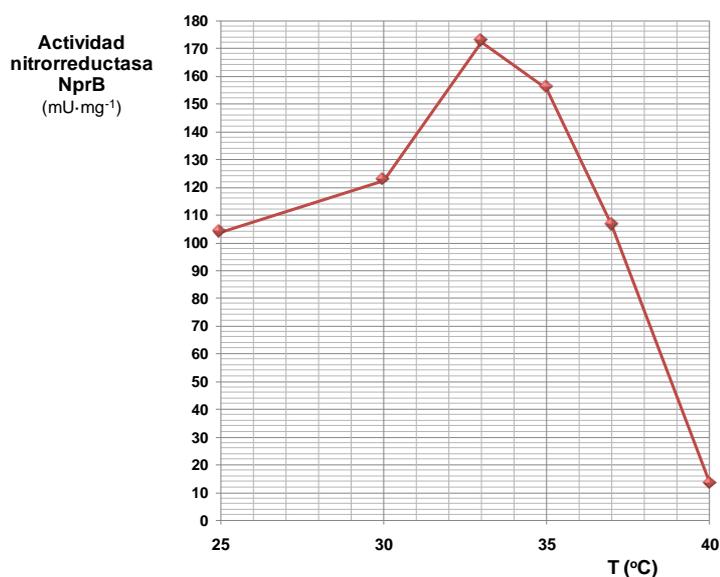


Figura 39. Efecto de la temperatura sobre la actividad nitrorreductasa de la proteína His₆-NprB.

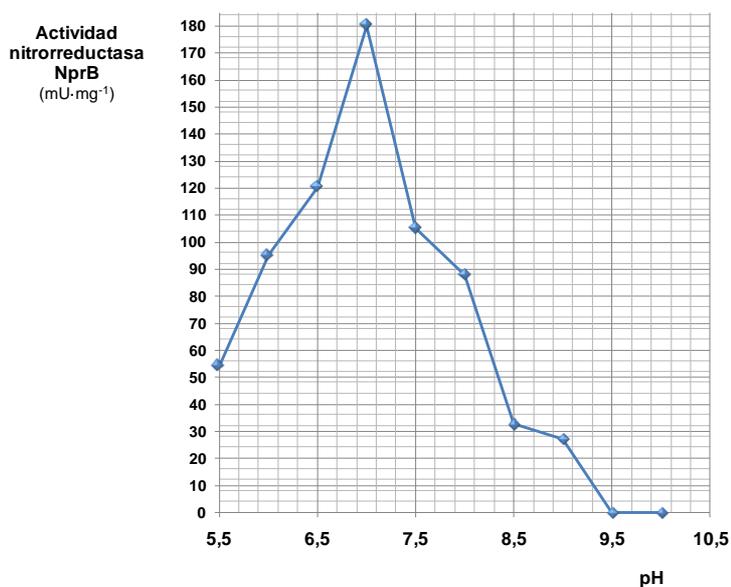


Figura 40. Efecto del pH sobre la actividad nitrorreductasa de la proteína His₆-NprB.

La caracterización de NprB revela que esta enzima muestra una temperatura óptima en las condiciones ensayadas de 33 °C (Fig. 39), valor que está en consonancia con la temperatura óptima de crecimiento de *R. capsulatus* B10S (30 °C) y con la temperatura óptima de la otra nitrorreductasa (NprA) de esta estirpe (37 °C). Sin embargo, la FRasaI de *Vibrio fischeri* muestra una temperatura óptima de 26 °C (Zenno *et al.*, 1994) y la NR de *Enterobacter cloacae* de 45 °C (Koder y Miller, 1998). La nitrorreductasa NprB de *Rhodobacter capsulatus* B10S también presentó una aceptable actividad en un amplio intervalo de temperaturas (25–37 °C). El pH óptimo de NprB en las condiciones ensayadas fue 7,0 (Fig. 40), similar al de otras nitrorreductasas descritas, que se sitúa en torno a 6,5–7,0 (Zenno *et al.*, 1994; 1996b; Pérez-Reinado *et al.*, 2008). Por lo tanto, los valores de pH y temperatura óptimos obtenidos son bastante similares a los descritos para otras nitrorreductasas bacterianas, y para la nitrorreductasa NprA purificada de *R. capsulatus* B10S (Pérez-Reinado *et al.*, 2008).

4.4. Efecto de posibles inhibidores sobre la actividad nitrorreductasa de la proteína His₆-NprB

Uno de los inhibidores más potentes que se conoce hasta la fecha para la mayoría de las nitrorreductasas es el dicumarol (Tatsumi *et al.*, 1982; Doi *et al.*, 1983; Kinouchi y Ohnishi, 1983; Anlezark *et al.*, 1992; Rooseboom *et al.*, 2004). El dicumarol es un inhibidor competitivo con respecto a NAD(P)H, ya que ocupa el sitio activo y se sitúa junto al FMN inhibiendo la transferencia de electrones (Koike *et al.*, 1998; Rafii *et al.*, 2001). En la FRasaI de *Vibrio fischeri*, la Phe¹²⁴ participa en la unión del dicumarol, apilándose contra uno de los anillos del inhibidor. En *E. coli*, la proteína NfnB se inhibe totalmente por dicumarol, pero la proteína NfsA, que no presenta una elevada homología con NfnB, se inhibe sólo un 40% (Zenno *et al.*, 1996a). Las

nitrorreductasas de *Bacteroides fragilis* presentan una inhibición por dicumarol mayor del 98% (Kinouchi y Ohnishi, 1983) y la nitrorreductasa de *P. pseudoalcaligenes* JS45 también se inhibe fuertemente por este compuesto (Sommerville *et al.*, 1995).

Entre los posibles inhibidores de la actividad nitrorreductasa de las proteínas recombinantes His₆-NprA (Pérez-Reinado *et al.*, 2008) y His₆-NprB, ensayados con TNP como sustrato y NADH como donador de electrones, el sulfato de cobre y el dicumarol fueron los más efectivos, ya que este último inhibió totalmente la actividad de ambas enzimas y el sulfato de cobre causó una inhibición del 60% de la actividad (Fig. 41). Como en *R. capsulatus* B10S ambas nitrorreductasas NprA y NprB se inhiben totalmente con dicumarol (Fig. 41), este compuesto debe unirse al sitio activo junto al FMN como en otras nitrorreductasas de la familia B.

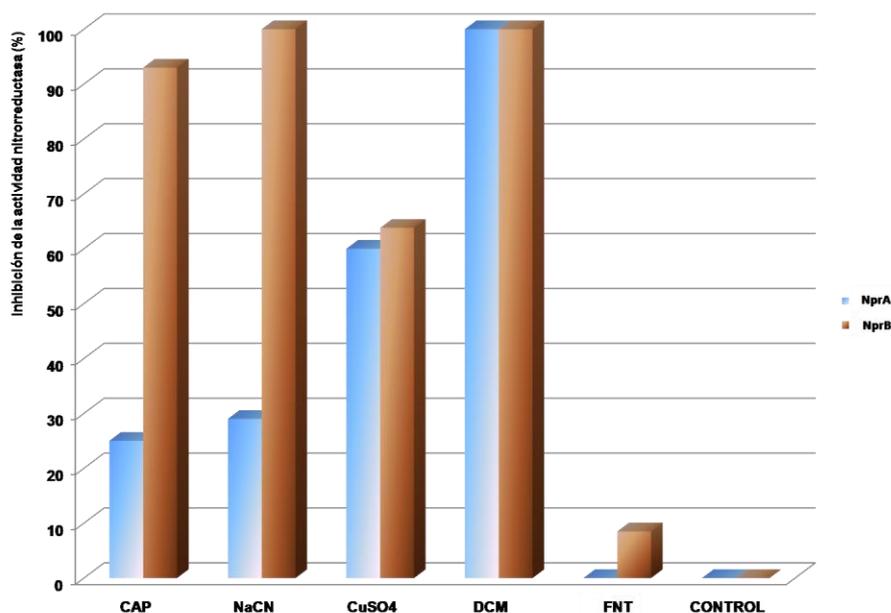


Figura 41. Efecto de posibles inhibidores sobre la actividad nitrorreductasa de las proteínas His₆-NprA y His₆-NprB. *o*-fenantrolina 1 mM (FNT), sulfato de cobre 0,2 mM (CuSO₄), capsaicina 0,1 mM (CAP), cianuro sódico 0,1 mM (NaCN), dicumarol 0,1 mM (DCM). El 100% de actividad con TNP fue: NprA 33,6 mU·mg⁻¹ y NprB 140,0 mU·mg⁻¹.

Es interesante que tanto la capsaicina como el cianuro sódico inhibieron casi completamente (más del 90%) la actividad nitrorreductasa de la proteína recombinante His₆-NprB, mientras que la actividad nitrorreductasa de la proteína recombinante His₆-NprA solamente se inhibió un 23–27% por estos compuestos.

La capsaicina es el principio activo más importante del fruto del género *Capsicum*. Además, es un compuesto análogo a varias quinonas que participan en la transferencia de electrones de las cadenas respiratoria y fotosintética en bacterias (Sato *et al.*, 1996; Yagi *et al.*, 1998; Spyridaki *et al.*, 2000; Kao *et al.*, 2004). Esta molécula posee actividad mitogénica, antioxidante, antibacteriana, anticancerígena e inmunomoduladora. Algunas flavoenzimas y quinona-reductasas se inhiben con capsaicina, compuesto que también es específico para el amortiguamiento de radicales libres y para la actividad de agentes quelantes metálicos (Anandakumar *et al.*, 2009).

Los agentes quelantes inhiben la actividad enzimática cuando las proteínas contienen centros sulfoferricos o cofactores metálicos esenciales. El cianuro es un agente quelante de hierro que inhibe la respiración y que también inhibe la actividad nitrorreductasa en células de hígado de rata, de manera total en la fracción soluble y parcialmente en la fracción microsomal (Carlson y Dubois, 1970; Gesinski, 1976). Curiosamente, al igual que ocurre con la capsaicina, la actividad nitrorreductasa de la proteína NprB se inhibió casi totalmente por cianuro mientras que la actividad de NprA sólo se inhibió parcialmente (un 27%).

Por lo tanto, aunque en otras nitrorreductasas no se ha descrito la presencia de metales y el análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína NprB tampoco predice la posible existencia de sitios de unión de metales, no se puede descartar la presencia de algún ión metálico en la proteína NprB. Sin embargo, parece más probable la existencia de

algún tipo de interacción entre la proteína y el cianuro que produzca la pérdida de la actividad enzimática.

La *o*-fenantrolina es otro agente quelante que inhibe el transporte de electrones por interacción con el hierro no-hemínico (Webster y Frenkel, 1953). Sin embargo, este compuesto no inhibió la actividad de NprA y sólo produjo una inhibición muy leve (8%) de la actividad nitrorreductasa de NprB (Fig. 41), lo que también parece descartar la presencia de hierro no hemínico en la proteína NprB.

4.5. Caracterización cinética de las nitrorreductasas NprA y NprB de *Rhodobacter capsulatus*

4.5.1. Determinación de la K_M aparente para los sustratos TNP y TNT

Los valores de K_M aparente se determinaron variando la concentración del sustrato, TNP o TNT, entre 0 y 1000 μM y realizando el ajuste de la ecuación cinética con el programa SigmaPlot 10.0 para Windows.

El TNP es el sustrato preferente de la proteína NprB de *R. capsulatus*, pero también es utilizado como sustrato por la proteína NprA. Sin embargo, la proteína recombinante His₆-NprA no presenta actividad nitrorreductasa con TNT (Pérez-Reinado *et al.*, 2008), por lo que este sustrato sólo se utilizó con la enzima NprB. Las Figuras 42 y 43 muestran las representaciones directa (velocidad frente a concentración de sustrato) y de dobles recíprocos ($1/V$ frente a $1/[S]$) para la enzima NprA de *R. capsulatus* con TNP como sustrato. De ellas se deduce un valor de $V_{\text{máx}}$ de 30 $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ y un valor de K_M aparente para el TNP de aproximadamente 0,9 mM (Fig. 43).

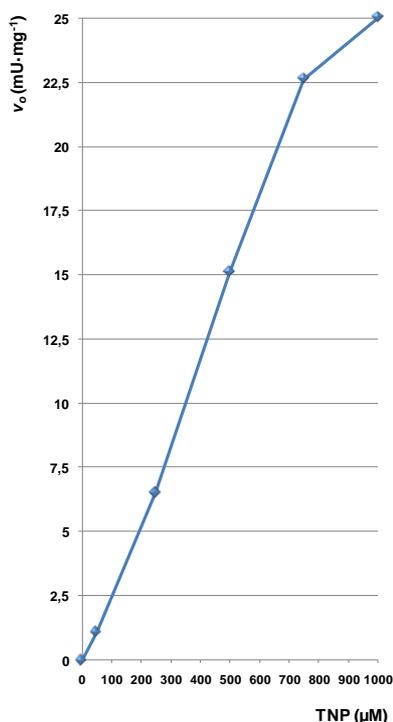


Figura 42. Velocidad de reacción frente a la concentración de TNP como sustrato para la proteína recombinante His₆-NprA. La concentración de enzima fue de 6 μg·mL⁻¹.

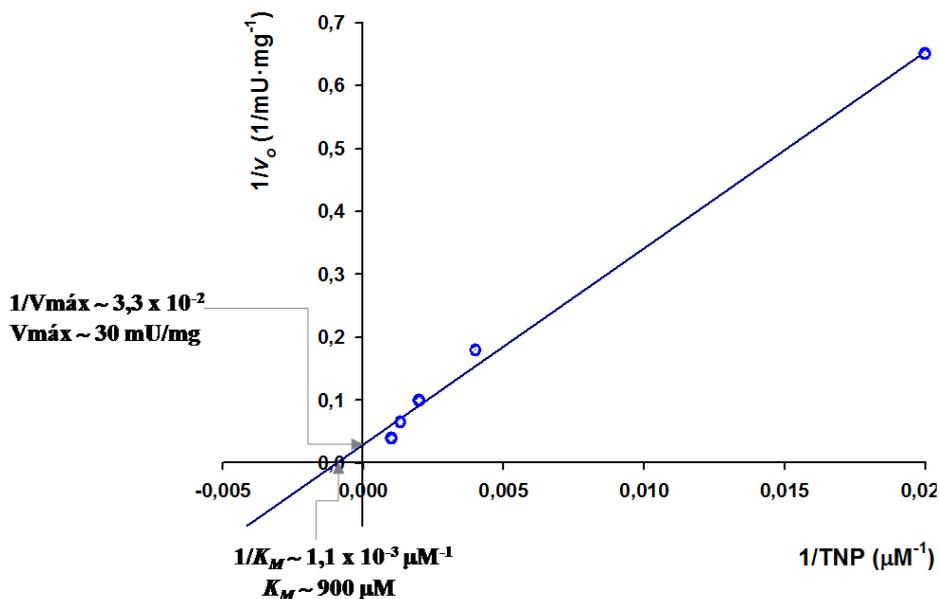


Figura 43. Representación de dobles recíprocos de Lineweaver–Burk para la actividad nitrorreductasa de la proteína recombinante His₆-NprA con TNP como sustrato.

De igual forma se determinó la V_{\max} y la constante Michaelis–Menten (K_M) para la proteína recombinante His₆–NprB utilizando TNP como sustrato (Figs. 44 y 45), obteniéndose un valor de V_{\max} de 150 $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ y un valor de K_M aparente de 800 μM . En comparación con la proteína NprA, la K_M es similar pero la V_{\max} es unas cinco veces superior.

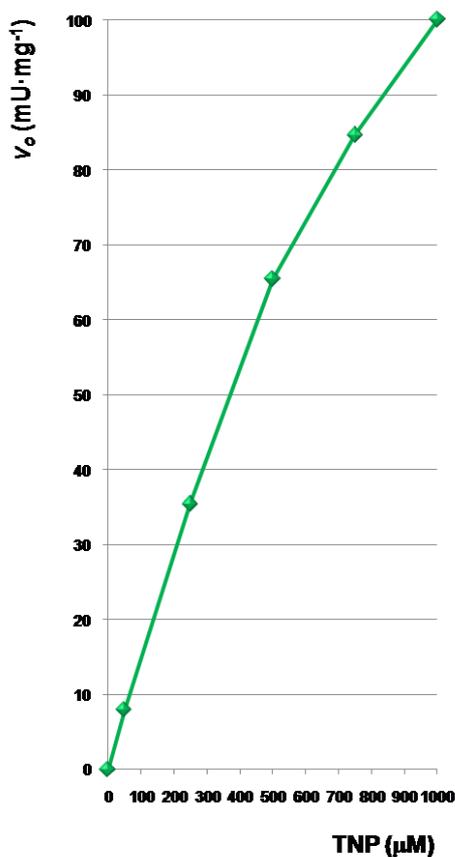


Figura 44. Velocidad de reacción frente a la concentración de TNP como sustrato para la proteína recombinante His₆–NprB. La concentración de enzima fue de $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

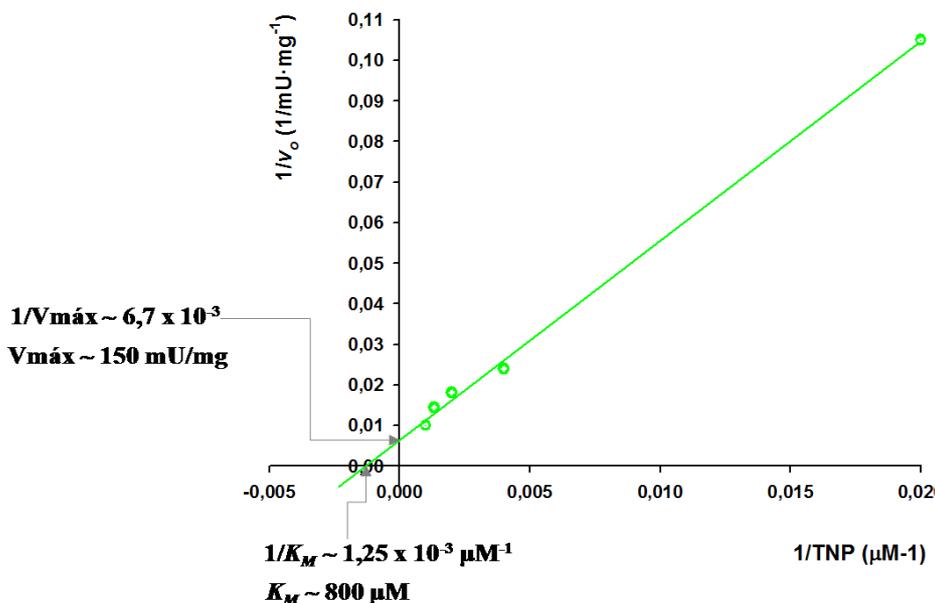


Figura 45. Representación de dobles recíprocos de Lineweaver–Burk para la actividad nitrorreductasa de la proteína recombinante His₆–NprB con TNT como sustrato.

Como la proteína NprB, a diferencia de NprA, puede utilizar TNT como sustrato (Fig. 37), también se procedió a determinar los parámetros cinéticos $V_{máx}$ y K_M de NprB utilizando concentraciones entre 0 y 5000 μM de TNT (Figs. 46 y 47), obteniéndose un valor de $V_{máx}$ de 100 mU·mg⁻¹ y un valor de K_M aparente para el TNT de aproximadamente 0,7 mM.

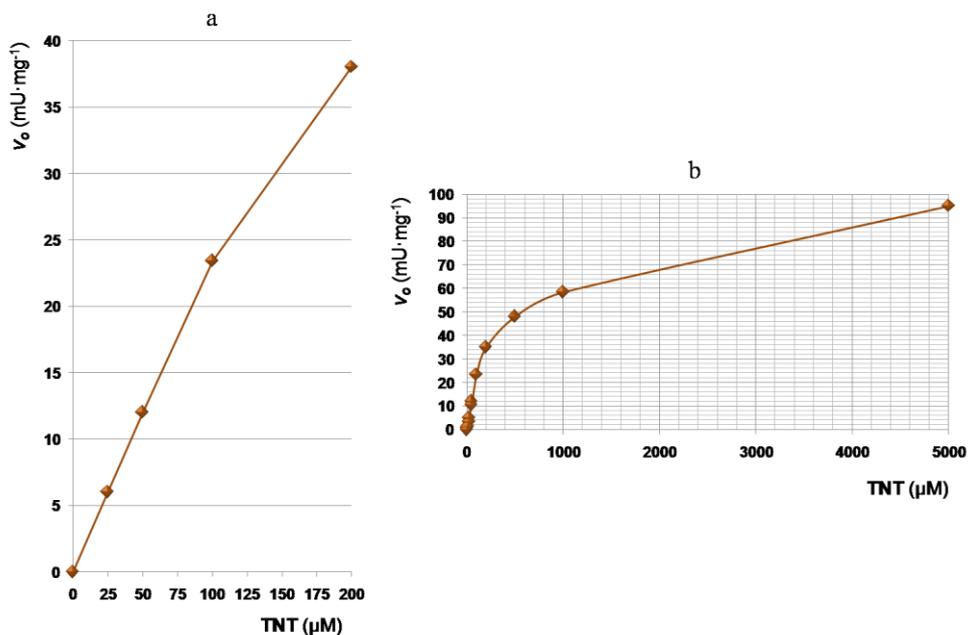


Figura 46. Velocidad de reacción frente a la concentración de TNT como sustrato para la proteína recombinante His₆-NprB. (a) 0 – 200 μM y (b) 0 – 5000 μM . La concentración de enzima fue 1,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ambos casos.

La $V_{\text{máx}}$ para esta enzima NprB con TNT como sustrato es menor que la observada con el sustrato TNP. Estos resultados sugieren que la nitrorreductasa NprB tiene cierta preferencia por el TNP como sustrato, respecto al TNT, ya que la reducción del grupo nitro se ve más favorecida por la presencia del grupo $-\text{OH}$ (TNP) que del grupo $-\text{CH}_3$ (TNT) (Roldan *et al.*, 2008). Sin embargo, la K_M aparente para el TNT es similar a la del TNP, que también tiene los grupos nitro situados en las mismas posiciones del anillo aromático.

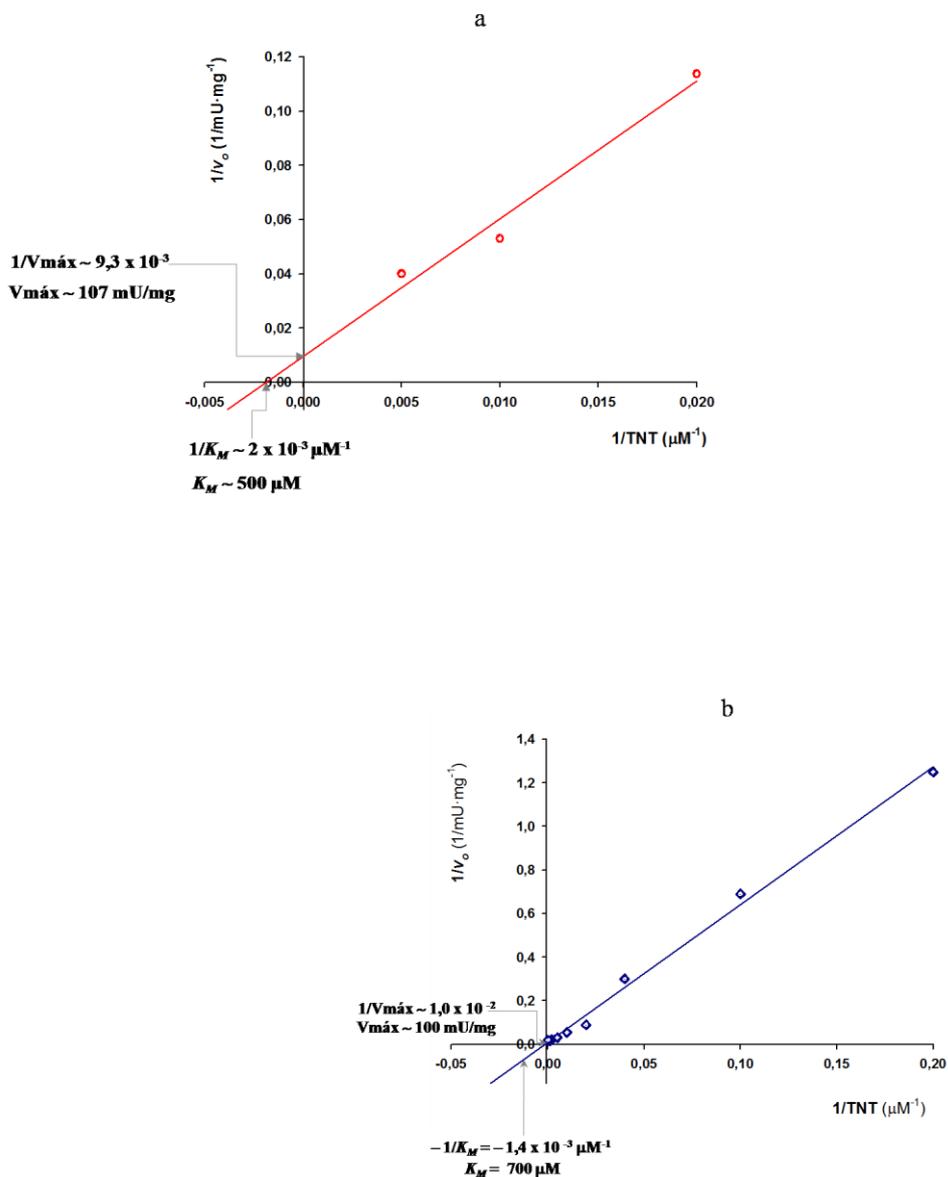


Figura 47. Representación de dobles recíprocos de Lineweaver–Burk para la actividad nitrorreductasa de la proteína recombinante His₆–NprB con TNT como sustrato. (a) 0 – 200 μM y (b) 0 – 5000 μM .

4.5.2. Inhibición de la actividad nitrorreductasa de las proteínas His₆-NprA y His₆-NprB en presencia de capsaicina. Determinación de la K_i

Las quinonas son componentes centrales de las cadenas fotosintéticas y respiratorias de transferencia de electrones. La capsaicina es un análogo natural de las quinonas que bloquea el transporte fotosintético de electrones de algunas bacterias púrpuras no azufradas, como *Rhodobacter sphaeroides* (Spyridaki *et al.*, 2000). El transporte de electrones desde el NADH a las quinonas también se inhibe específicamente con capsaicina en *R. capsulatus* (Dupuis *et al.*, 1998; Yagi *et al.*, 1998).

En este trabajo se probaron dos concentraciones distintas (10 y 100 μM) del inhibidor capsaicina en los ensayos de la actividad nitrorreductasa de las proteínas recombinantes His₆-NprA y His₆-NprB, utilizando como sustratos TNP o TNT.

En el caso de la proteína recombinante His₆-NprA, la capsaicina causó una disminución poco moderada de la velocidad de reducción del TNP (Figs. 48 y 49). A partir de los datos obtenidos se calculó un valor aproximado de K_i para la capsaicina de 0,4 mM. La representación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk sugiere que la capsaicina no compite con el TNP por el sitio activo de la proteína recombinante His₆-NprA, sino que posiblemente se una a otra parte de su estructura ya que presenta una inhibición de tipo no competitiva.

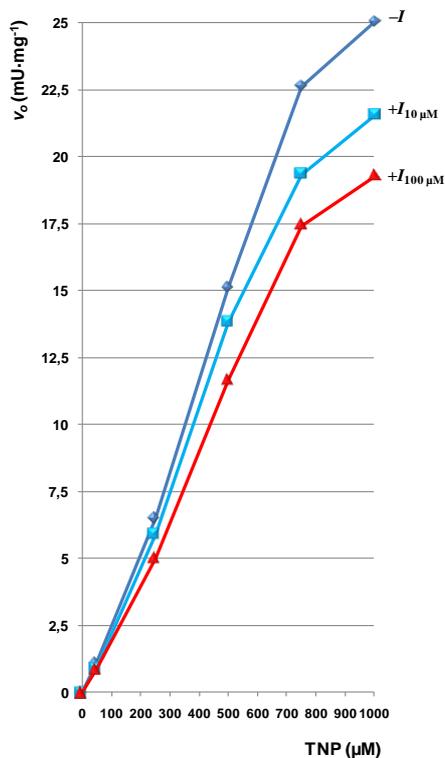


Figura 48. Velocidad de reacción frente a la concentración de TNP de la proteína recombinante His₆-NprA en presencia de capsaicina 10 y 100 μM . La concentración de enzima fue de 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

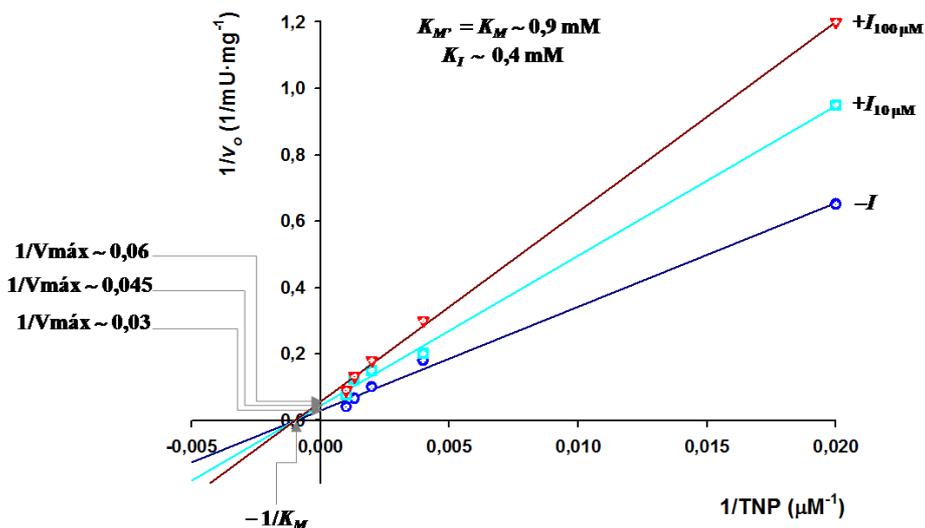


Figura 49. Representación de dobles recíprocos de Lineweaver–Burk para la actividad de la proteína recombinante His₆-NprA con TNP como sustrato en presencia de capsaicina 10 y 100 μM .

Por otra parte, la capsaicina mostró un fuerte efecto inhibitorio sobre la actividad de la proteína His₆-NprB con TNP como sustrato, y esta inhibición fue de tipo competitiva (Figs. 50 y 51). Mientras que la K_M para el TNP fue 0,8 mM, la K_M' en presencia de capsaicina fue 35 mM, y el valor de K_i obtenido fue $2,5 \times 10^{-3}$ mM, lo que indica una gran afinidad de la enzima por este análogo de las quinonas, incluso mayor que la que presenta por el sustrato TNP.

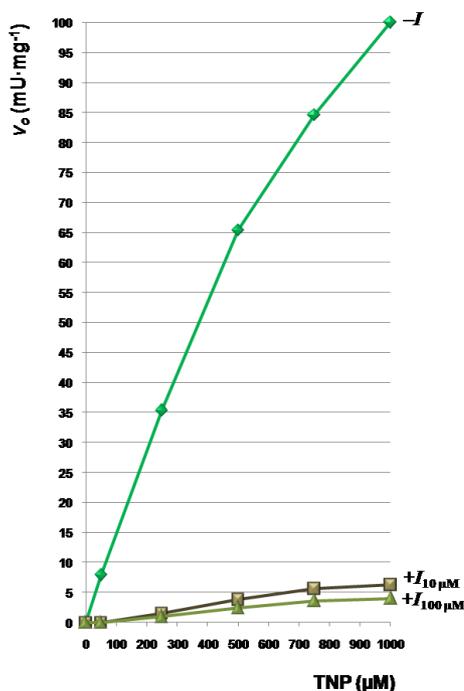


Figura 50. Representación directa de la velocidad de la reacción catalizada con la proteína recombinante His₆-NprB frente a la concentración de TNP en presencia de capsaicina 10 y 100 μM. La concentración de enzima fue de 1,3 μg.mL⁻¹.

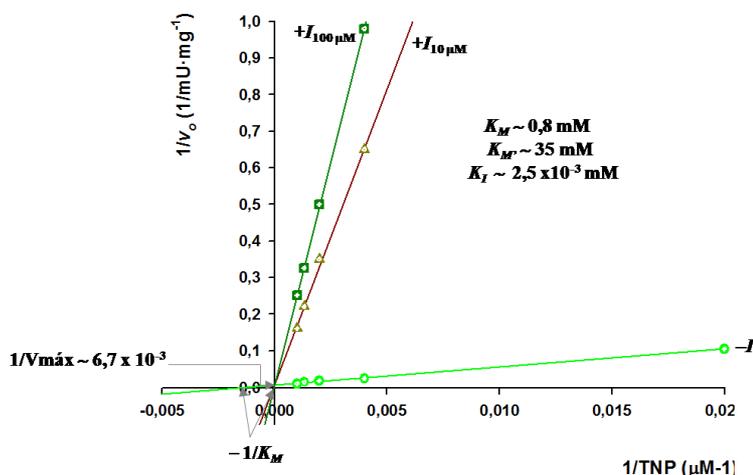


Figura 51. Representación de dobles recíprocos de Lineweaver–Burk para la actividad de la proteína recombinante His₆–NprB con TNP como sustrato en presencia de capsaicina 10 y 100 μM .

También se obtuvo el mismo efecto de la capsaicina como inhibidor cuando se utilizó el TNT como sustrato, a concentraciones de capsaicina 0 y 100 μM , para la proteína recombinante His₆–NprB. En presencia de capsaicina se observó una inhibición de tipo competitiva con un valor de K_i de aproximadamente 0,01 mM (Figs. 52 y 53). Esto confirma que la capsaicina podría actuar como un efectivo inhibidor competitivo de la actividad de la proteína His₆–NprB. Como este compuesto es un análogo de las quinonas, estos resultados podrían sugerir que la proteína NprB podría tener actividad quinona reductasa, a diferencia de NprA, que no presenta esta actividad (Pérez–Reinado, 2005) y se inhibe sólo ligeramente por capsaicina (Figs. 41 y 48).

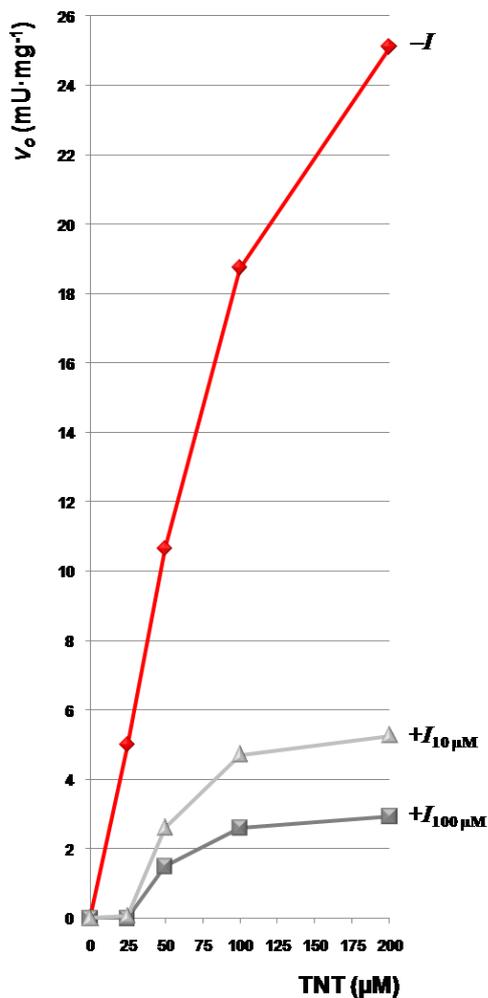


Figura 52. Representación de la velocidad de la reacción catalizada por la proteína recombinante His₆-NprB con TNT como sustrato en presencia de capsaicina 10 y 100 μM. La concentración de enzima fue 3 μg·mL⁻¹.

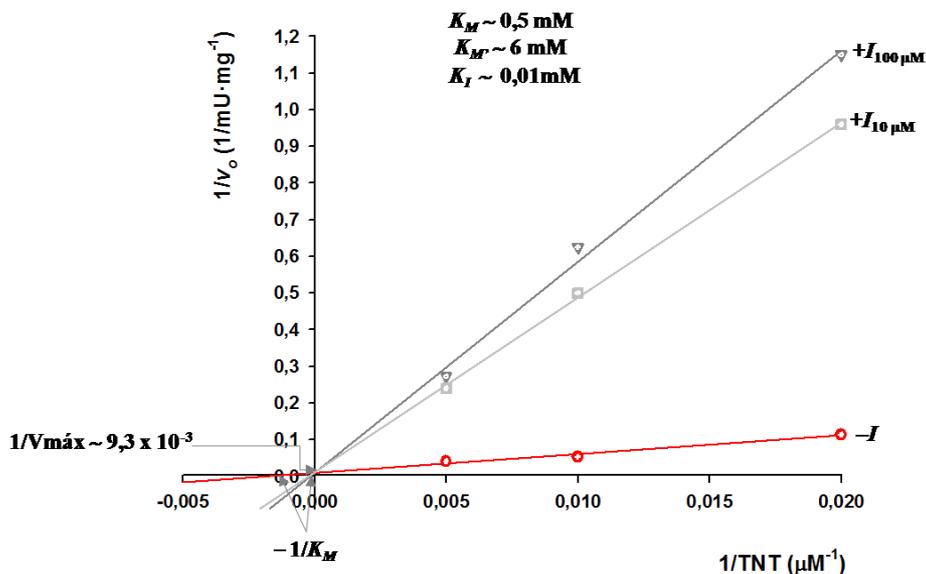


Figura 53. Representación de dobles recíprocos de Lineweaver–Burk para la actividad de la proteína recombinante His₆–NprB con TNT como sustrato en presencia de capsaicina 10 y 100 μM .

Los estudios cinéticos de la inhibición de las enzimas NprA y NprB, empleando TNP o TNT como sustratos y capsaicina (*trans*-8-metil-*N*-vanillil-6-nonenamida) como inhibidor, confirman que NprA y NprB difieren en cuanto a especificidad de sustrato y por lo tanto podrían tener una función fisiológica distinta en las células. Utilizando TNP como sustrato, la K_M de NprA es similar a la de NprB (0,9 mM y 0,8 mM, respectivamente); no obstante, los valores de K_i son bastante diferentes. Con respecto a la proteína NprA se obtuvo una inhibición de tipo no competitiva usando TNP como sustrato (Fig. 49) y NprB presentó una inhibición de tipo competitiva, utilizando TNP o TNT como sustratos (Figs. 51 y 53).

4.6. Actividad enzimática de la proteína His₆-NprB con dihidrobiopterina o con quinonas como posibles sustratos fisiológicos

En el metabolismo de la fenilalanina, un paso metabólico principal consiste en su transformación en tirosina mediante la fenilalanina hidroxilasa. Esta enzima requiere un cofactor, la tetrahydrobiopterina ([6R]-5,6,7,8,-tetrahydro-*L*-biopterina, BH₄ o H₄-biopterina), para llevar a cabo la reacción enzimática. La biopterina actúa además como cofactor necesario para la hidroxilación de otros aminoácidos aromáticos como la tirosina y el triptófano, y es además uno de los cofactores de la óxido-nítrico sintasa de los mamíferos (Rivero *et al.*, 1988). La reducción de dihidrobiopterina a tetrahydrobiopterina la lleva a cabo la enzima dihidrofolato reductasa dependiente de NADPH. La regeneración de BH₄ para la reacción de la fenilalanina hidroxilasa se produce mediante la dihidropterina reductasa (Fig. 54). La proteína NprA presenta una elevada actividad dihidropterina reductasa y se ha sugerido que podría participar en el metabolismo de aminoácidos aromáticos en *R. capsulatus* (Fig. 54; Pérez-Reinado *et al.*, 2008). El producto del gen *nprB* de *R. capsulatus*

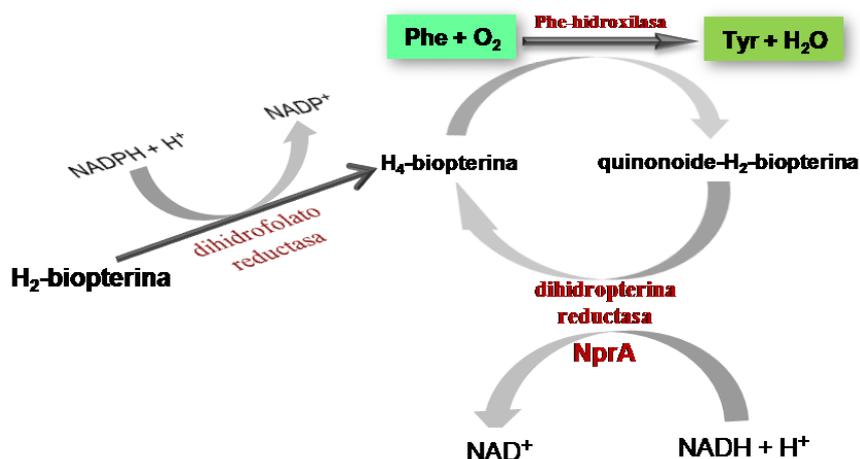


Figura 54. Posible función fisiológica de la proteína NprA en la regeneración de la tetrahydrobiopterina en el metabolismo de aminoácidos aromáticos.

no presenta una elevada similitud con el producto del gen *nprA* (Pérez-Reinado *et al.*, 2008), por lo que aunque ambas proteínas NprA y NprB pertenecen a la familia de las nitrorreductasas insensibles a oxígeno (Fig. 12), la posible función de la nitrorreductasa NprB como una dihidropterina reductasa alternativa a NprA no es evidente por la simple comparación de sus secuencias.

Con el objetivo de comprobar si la enzima recombinante His₆-NprB también presenta actividad dihidropterina reductasa y comparar esta posible actividad con la de la enzima recombinante His₆-NprA, se realizó el ensayo de actividad dihidropterina reductasa como se describe en Materiales y Métodos. Debido a que las pterinas quinonoides son muy inestables, esta reacción se llevó a cabo utilizando un análogo dimetilado, y acoplada a la peroxidasa de rábano, lo que permite obtener de forma continua la forma quinonoide de la 6,7-dimetil-7,8-dihidropterina (*q*DMPH₂) a partir de la 6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidropterina (DMPH₄) (Lye *et al.*, 2002; Pérez-Reinado *et al.*, 2008).



La proteína NprB catalizó la reducción de *q*DMPH₂ a DMPH₄ en los ensayos con los dos tampones diferentes utilizados (mezcla de tampones 250 mM, pH 6,9 y Tris-HCl 150 mM, pH 7,2), aunque la actividad de la proteína NprA en las mismas condiciones con dichos tampones fue superior. Sin embargo, las diferencias en las actividades dihidropterina reductasa de NprA y NprB fueron mayores con el tampón Tris-HCl pH 7,2 que cuando se empleó la mezcla de tampones a pH 6,9 (Fig. 55).

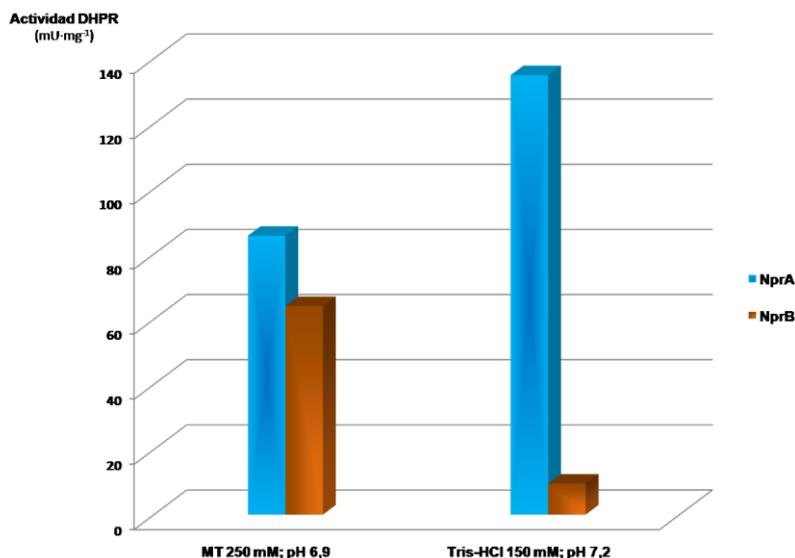


Figura 55. Actividad dihidropterina reductasa de las proteínas His₆-NprA y His₆-NprB. En los ensayos se utilizaron 6 µg de cada una de las enzimas (NprA o NprB). La proteína His₆-NprA fue purificada por Pérez-Reinado, 2005.

Por lo tanto, la actividad dihidropterina reductasa de la proteína NprB, de acuerdo a las condiciones ensayadas, fue incluso menor (casi tres veces menos) que su actividad nitrorreductasa con TNP (Fig. 37), mientras que la actividad dihidropterina reductasa que presentó la proteína NprA fue muy superior que su actividad nitrorreductasa con TNP (Pérez-Reinado *et al.*, 2008). Así pues, la función fisiológica de la proteína NprB no es probablemente actuar como una dihidropterina reductasa, lo que parece más probable para la proteína NprA, aunque es posible que casi todas las nitrorreductasas de la familia B pudieran tener cierta capacidad de actuar como dihidropterina reductasas, incluida la proteína NfnB de *E. coli* (Vasudevan *et al.*, 1988).

Por otra parte, se ha descrito que algunas nitrorreductasas tienen actividad reductora de quinonas (Rau y Stolz, 2003; Roldán *et al.*, 2008), compuestos ubicuos que participan en las cadenas de transporte

electrónico y que pueden experimentar reducción de uno o dos electrones (Deller *et al.*, 2008). Los resultados de inhibición con capsaicina, un análogo de las quinonas, también sugieren que la proteína NprB podría tener actividad quinona reductasa. Para comprobar la actividad reductora de quinonas por la enzima His₆-NprB purificada se utilizó como sustrato lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), a una concentración 34 μM, y *p*-benzoquinona (1,4-benzoquinona), a una concentración 60 μM, en las condiciones especificadas en Materiales y Métodos, utilizando siempre como control TNP 200 μM. La proteína NprB mostró mayor actividad con *p*-benzoquinona (180,3 mU·mg⁻¹), que correspondió al 110,5% de actividad con respecto al TNP como control. La actividad con lawsona fue 54,3 mU·mg⁻¹, un 33,3% de la actividad con TNP como sustrato (Fig. 56). Esto sugiere que la proteína NprB posiblemente tenga *in vivo* actividad reductora de quinonas.

Es interesante destacar que la proteína NprA de *R. capsulatus* B10S (Pérez-Reinado *et al.*, 2008) no tiene actividad reductora de quinonas. Sin embargo, la proteína NfsB de *E. coli*, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, utiliza *p*-benzoquinona como sustrato (Zenno *et al.*, 1996b; Rau y Stolz, 2003). La actividad de reducción de quinonas de la proteína NprB de *R. capsulatus* B10S es inferior a la que presenta la proteína NfsB de *E. coli*. Por otra parte, la proteína NprB de *R. capsulatus* B10 presentó tres veces más actividad reductora de quinonas que actividad dihidropterina reductasa (Figs. 55 y 56).

Estos resultados sugieren que la función fisiológica más probable para la proteína NprB de *R. capsulatus* B10S es la de actuar como NAD(P)H-quinona oxidoreductasa (NQO).

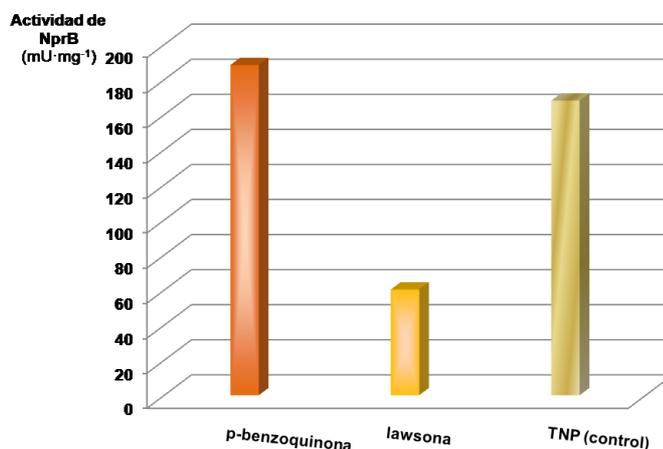


Figura 56. Actividad de la proteína His₆-NprB con quinonas. Como control se utilizó TNP como sustrato.

5. CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN DEL 2,4-DINITROFENOL EN *Rhodobacter sphaeroides* DSM158S: OBTENCIÓN DE MUTANTES POR INSERCIÓN AL AZAR DEL TRANSPOSÓN Tn5

La bacteria fototrófica *R. sphaeroides* DSM158S crece en presencia del compuesto xenobiótico DNP hasta una concentración de 0,5 mM, aunque rutinariamente se utiliza una concentración de 0,15 mM, ya que el crecimiento es mayor (Blasco y Castillo, 1992). Esta bacteria es capaz de degradar el DNP en condiciones fototróficas, en un primer paso mediante una reducción del grupo nitro en posición 2 del anillo aromático hasta amino, de igual forma que *R. capsulatus* E1F1, para generar el compuesto 2-amino-4-nitrofenol (ANP). *R. sphaeroides* DSM158S también es capaz de crecer en medio RCV con ANP 0,2 mM. El medio mínimo RCV de *R. sphaeroides* DSM158S en presencia del DNP presenta una coloración amarilla que se transforma en un color

naranja intenso que corresponde a la formación de ANP y otros intermediarios de la ruta degradativa que aún están sin identificar.

Para profundizar en el conocimiento del metabolismo del DNP se ha abordado la mutagénesis por inserción al azar del transposón Tn5 en el genoma de *R. sphaeroides* DSM158S. Esta técnica genética es muy adecuada para la identificación y la clonación de genes bacterianos porque es un proceso aleatorio, presenta una elevada frecuencia de transposición, y el elemento móvil cuando está integrado en el cromosoma del organismo receptor tiene una alta estabilidad y una baja posibilidad de reversión o de reorganización génica. Además, es posible utilizar las técnicas de hibridación (Southern blot) y de PCR para confirmar la localización del transposón e identificar y secuenciar los genes afectados que podrían estar implicados en la degradación de este compuesto xenobiótico (Fig. 57).

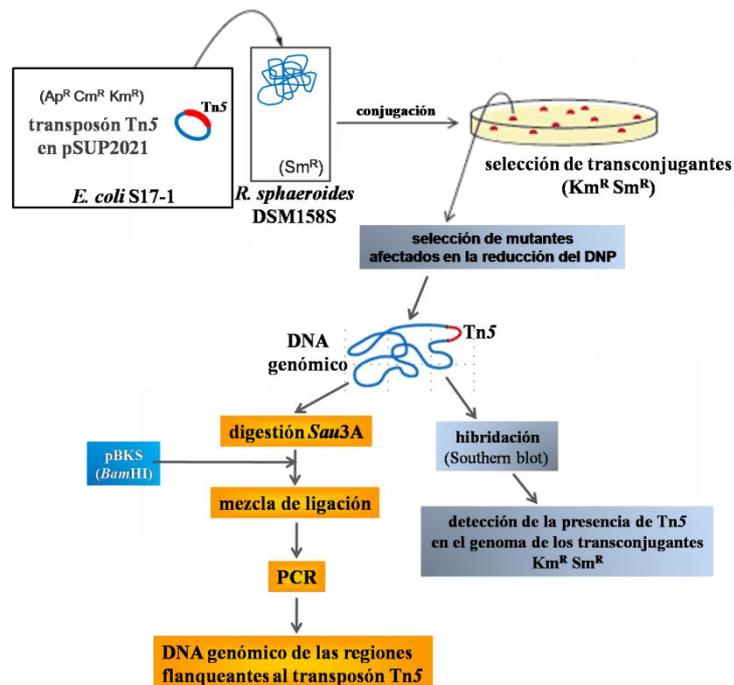


Figura 57. Estrategia para la mutagénesis con Tn5 y la identificación del sitio de inserción del transposón.

5.1. Mutagénesis por inserción al azar del transposón Tn5 en el genoma de *R. sphaeroides* DSM158S

Para la conjugación con *R. sphaeroides* DSM158S se empleó *E. coli* S17-1 como estirpe donadora portadora del plásmido movilizable pSUP2021, que contiene el transposón Tn5 (Simon *et al.*, 1983). Esta bacteria, además de dicho plásmido, posee en el cromosoma los genes *tra*, requeridos para movilizar los plásmidos que posean los genes *mob*. En el proceso de conjugación el plásmido pSUP2021 es transferido a *R. sphaeroides* DSM158S, estirpe receptora. Como este plásmido no se replica en bacterias fototróficas (Roldán, 1992; Moreno-Vivián *et al.*, 1994), los transconjugantes resistentes a kanamicina (Km^R) son el resultado de la inserción de Tn5 en el genoma de dichas bacterias. También, la ausencia de los marcadores codificados por el plásmido (resistencia a ampicilina y a cloramfenicol) en los transconjugantes resistentes a Km indica que sólo el transposón, y no el plásmido completo, está integrado en alguna posición del genoma de *R. sphaeroides* DSM158S.

5.2. Selección de mutantes de *R. sphaeroides* DSM158S afectados en la ruta de degradación de DNP

Se realizaron varios procesos de conjugación, de los que en total se obtuvieron 1800 transconjugantes Km^R y Sm^R . En los controles correspondientes para estos procesos no se obtuvieron resistentes espontáneos al antibiótico Km, por lo que todos los transconjugantes resistentes a Km deberían ser portadores de Tn5. A fin de garantizar la supervivencia de los transconjugantes, se cultivaron en placas de microtitulación conteniendo medio rico PY. Posteriormente, los transconjugantes se transfirieron a tres placas de microtitulación, una que contenía medio mínimo con malato como fuente de carbono y glutamato como fuente de nitrógeno, otra con malato, glutamato y el compuesto

xenobiótico DNP, y una tercera con malato, glutamato y el compuesto xenobiótico ANP. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaron escaso o nulo crecimiento en presencia de los compuestos xenobióticos antes mencionados, o bien aquellas que no presentaron cambio en la coloración del medio. De esta manera, se aislaron inicialmente 50 colonias que se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (con glicerol 20%) para su análisis posterior. Ya que el número de posibles mutantes aislados fue elevado, se procedió a una caracterización preliminar de todos ellos mediante el estudio de su comportamiento en medio que contenía DNP para agrupar a los posibles mutantes según su crecimiento y para descartar a algunos falsos mutantes.

5.3. Caracterización fisiológica de las estirpes mutantes de *R. sphaeroides* DSM158S

Los posibles mutantes seleccionados se cultivaron en condiciones fototróficas en medio mínimo RCV con malato y glutamato y el compuesto xenobiótico DNP, en presencia de los antibióticos Km y Sm. Se tomaron muestras a lo largo de las curvas de crecimiento de la estirpe silvestre de *R. sphaeroides* DSM158S y de los posibles mutantes. En dichas muestras se determinó el crecimiento, el consumo de DNP, la producción de ANP y la producción de posibles intermediarios de la ruta de degradación de DNP. Esta caracterización permitió seleccionar seis posibles mutantes, mientras que el resto de las colonias aisladas fueron descartadas porque no presentaron diferencias significativas respecto a la estirpe silvestre.

Los seis posibles mutantes que resultaron afectados en la degradación del DNP se clasificaron en tres grupos, según su fenotipo (Fig. 58). El grupo 1 está representado por un único mutante (A5-5), que según se muestra en la Fig. 58, tuvo un crecimiento similar al de la estirpe silvestre de *R. sphaeroides* DSM158S y un consumo normal de

DNP. Sin embargo, el análisis por HPLC de los sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo en condiciones fototróficas de la estirpe A5–5 en medios con DNP reveló la presencia de un nuevo intermediario que presentó un máximo de absorción a 400 nm. Este mismo intermediario se observó en sobrenadantes de cultivos correspondientes a la estirpe D1–2 (incluida en el grupo 3) en presencia de ANP, aunque a una concentración inferior (resultados no mostrados). Los mutantes del grupo 2, presentaron un crecimiento con DNP considerablemente inferior con respecto a la estirpe silvestre (Fig. 58) y consumieron solamente un 20–25% del DNP. En este grupo se incluyen las estirpes E12–3, C9–6 y C11–5. En el grupo 3 se incluyeron las estirpes que mostraron un crecimiento menor que la estirpe silvestre, con un consumo de DNP que no superó el 10% respecto al de la estirpe DSM158S (Fig. 58). En este grupo se incluyen las estirpes mutantes D1–2 y D5–3.

5.4. Comprobación de la presencia del transposón Tn5 en los mutantes de *R. sphaeroides* mediante hibridación (Southern blot)

Para confirmar la presencia del transposón Tn5 en algunos de los mutantes anteriores se llevó a cabo la hibridación (Southern blot) con una sonda marcada con digoxigenina. Aunque los mutantes seleccionados presentaron resistencia a Km, lo que sugiere la presencia del transposón Tn5 en el genoma, se aisló el DNA total de tres de los mutantes y se hibridó con un fragmento de DNA perteneciente al transposón Tn5 (fragmento *Pst*I de 1,1 kb). Las condiciones de transferencia e hibridación se describieron en el apartado 8.9 de Materiales y Métodos. La hibridación se realizó en condiciones de alta estringencia y se pudo observar que el transposón Tn5 estaba presente en el genoma de dichas estirpes mutantes de *R. sphaeroides* DSM158S (resultados no mostrados). Como control negativo se utilizó el DNA total de la estirpe silvestre de *R. sphaeroides*.

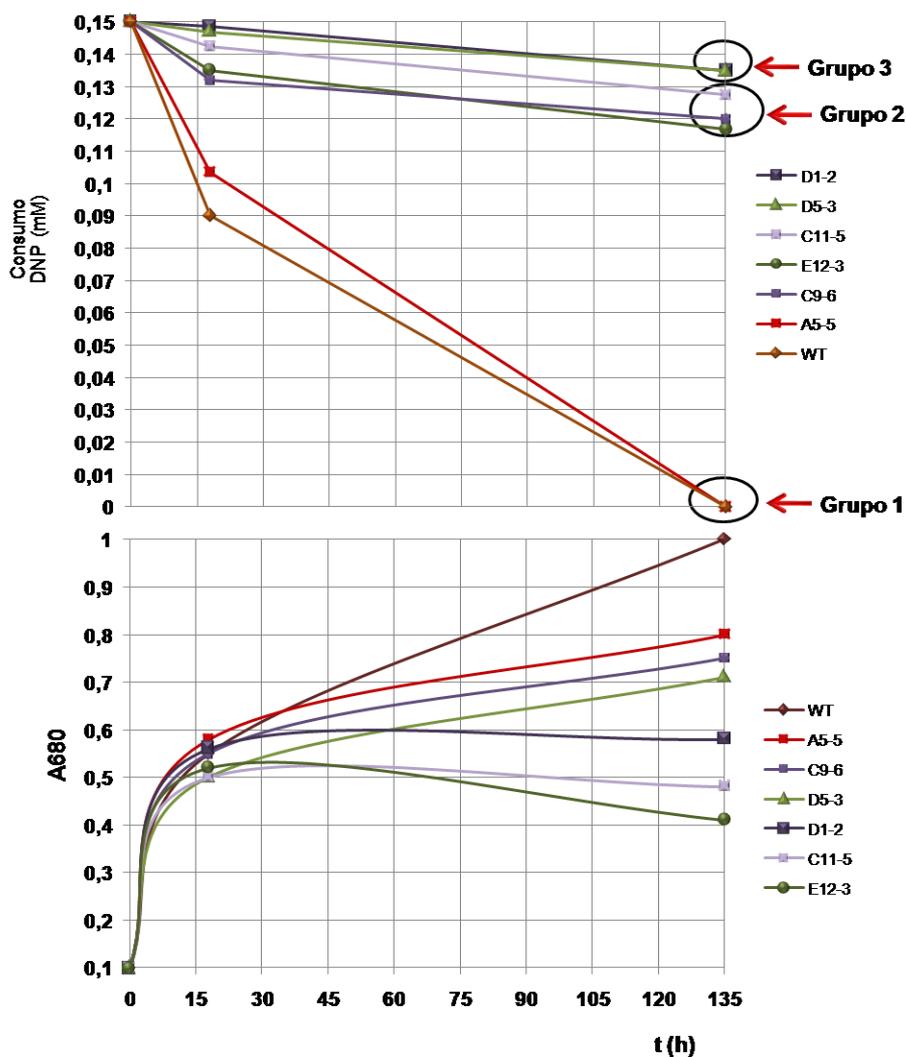


Figura 58. Crecimiento y consumo de DNP de la estirpe silvestre y los posibles mutantes de *Rhodobacter sphaeroides* DSM158S cultivados fototróficamente con DNP.

Para identificar el fragmento de DNA donde tuvo lugar la inserción del transposón Tn5 en el mutante D1-2 de *R. sphaeroides*, se aisló el DNA total de esta estirpe mutante y se realizaron digestiones con las enzimas *EcoRI*, *Sall* y *BamHI*, así como una digestión doble con *EcoRI* y *Sall*, en la que se identificó un fragmento de aproximadamente

3,0 kb. Los tamaños de los fragmentos *EcoRI*, *SalI* y *BamHI* estaban comprendidos entre 7 y 8 kb (Fig. 59).

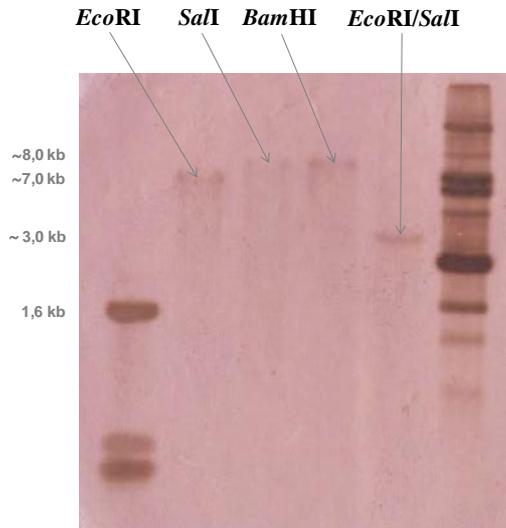


Figura 59. Hibridación con una sonda del transposón Tn5 del DNA genómico de la estirpe mutante D1-2 de *R. sphaeroides*, digerido con diferentes enzimas de restricción.

5.5. Aislamiento e identificación de las secuencias flanqueantes a Tn5 en el mutante D1-2

Con la finalidad de identificar el sitio de inserción del transposón Tn5 en el genoma de la estirpe mutante D1-2 de *R. sphaeroides* se procedió a digerir el DNA de este mutante con *Sau3A* para su posterior ligación en el vector pBKS previamente digerido con *BamHI*.

5.5.1. Digestiones parciales del DNA genómico de la estirpe mutante D1-2 de *R. sphaeroides* con la enzima de restricción *Sau3A*

El DNA total aislado de la estirpe D1-2 se digirió parcialmente con la enzima de restricción *Sau3A* a diferentes tiempos de incubación y diluciones. Se escogió esta enzima porque su frecuencia de restricción es

elevada al presentar una diana de 4 pb, y además porque genera extremos cohesivos compatibles con los generados por la enzima *Bam*HI. Los fragmentos resultantes se ligaron al vector pBKS, previamente linearizado por digestión con *Bam*HI.

Las digestiones con la enzima de restricción *Sau*3A se realizaron en las siguientes condiciones:

Condición	Dilución <i>Sau</i> 3A (3 U/ μ L)	Digestiones parciales		t (min)
		gDNA _{D1-2} (μ L)	<i>Sau</i> 3A (μ L)	
1	1/20	2	40	10
2	1/50	2	100	10
3	1/20	2	40	20
4	1/50	2	100	20

La condición 3 (40 μ L de la dilución 1/20 de *Sau*3A con 20 min de incubación) aparentemente fue la más adecuada (Fig. 60), por lo que esta digestión se utilizó para la clonación en el vector pBKS y la posterior amplificación por PCR.

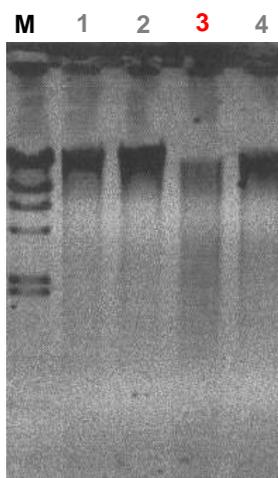


Figura 60. Digestiones parciales del DNA genómico del mutante D1–2 con la enzima de restricción *Sau*3A a diferentes tiempos y diluciones. M: marcador.

5.5.2. Ligación de los fragmentos *Sau3A* de la estirpe mutante D1–2 de *R. sphaeroides* DSM158S en el plásmido pBKS digerido con *Bam*HI y amplificación por PCR de la mezcla de ligación

Los fragmentos *Sau3A* digeridos se ligaron en pBKS y la mezcla de ligación se sometió posteriormente a amplificación por PCR. Como los extremos *Sau3A* de los fragmentos son idénticos, la clonación en el sitio *Bam*HI del vector pBKS es posible en ambas direcciones, y en la mezcla de ligación están presentes las construcciones pVR1 (directa) y PVR2 (inversa). Por lo tanto, la amplificación con las parejas de oligonucleótidos Tn5R/T3 y Tn5F/T3 permite identificar las regiones anteriores y posteriores al punto de inserción del transposón Tn5 (Fig. 61).

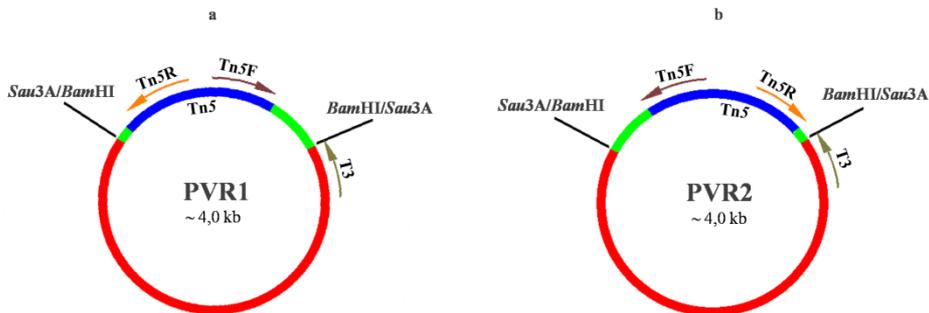


Figura 61. Amplificación por PCR de la región flanqueante de Tn5 tras la ligación en pBKS de los fragmentos *Sau3A* obtenidos en la digestión parcial.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el sistema Mastercycler–personal 5332 Eppendorf. Se utilizó para ello el preparado comercial Expand™ High Fidelity PCR System de Roche (ref. 1440000) que suministraba la DNA polimerasa, el tampón de reacción y el cloruro de magnesio. Los desoxinucleótidos (dNTPs) utilizados fueron los de Amersham Biosciencie (ref. 27–2035–01) y los cebadores

utilizados para amplificar las regiones flanqueantes al Tn5 en la estirpe mutante D1–2 de *R. sphaeroides* DSM158S fueron los siguientes:

Tn5R: 5'–GT TAG GAG GTC ACA TGG AAG TCA GAT CCT–3'

Tn5F 5'–CGT TAC CAT GTT AGG AGG TCA CAT GGA AGT–3'

T3 5'–TA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA–3'

que corresponden a las regiones internas del transposón Tn5 (Tn5R y Tn5F) y al vector pBKS (T3) como se presenta en la Fig. 61.

Las reacciones de amplificación con las parejas de cebadores Tn5R/T3 y Tn5F/T3 y el programa de PCR utilizado para la amplificación de las regiones flanqueantes de Tn5 se describen en la Fig. 62.

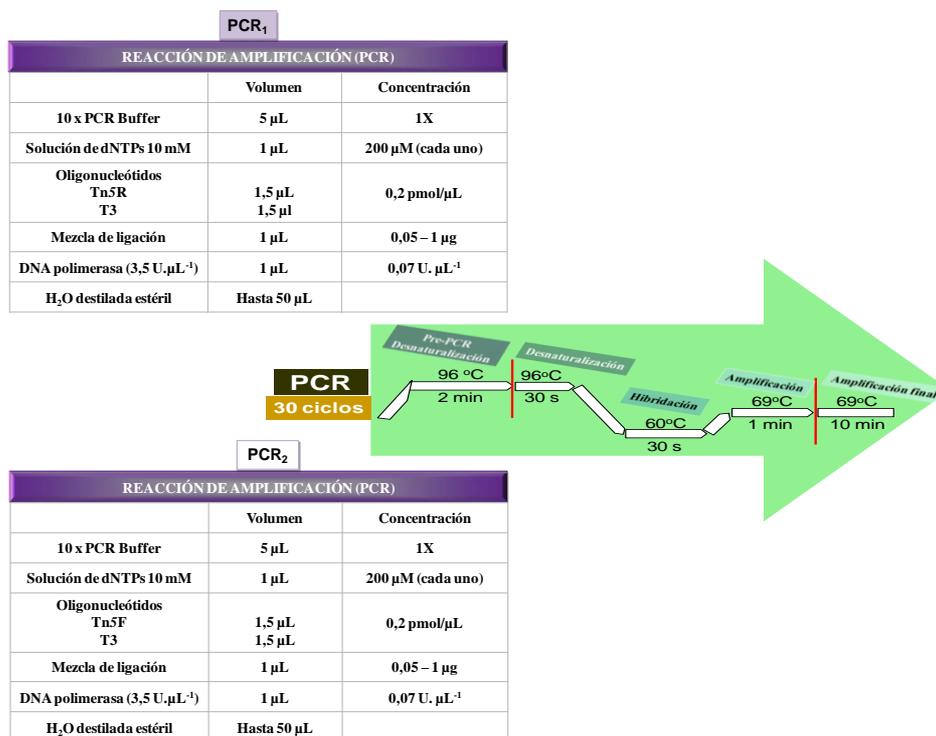


Figura 62. Esquema del programa de PCR para la amplificación de las regiones flanqueantes a Tn5 de la estirpe D1–2 de *R. sphaeroides* DSM158S.

Tras las reacciones de PCR, las correspondientes muestras amplificadas PCR1 y PCR2 se sometieron a electroforesis, comprobándose la presencia de bandas que podrían corresponder a los fragmentos amplificados de las regiones adyacentes al Tn5 (Fig. 63), por lo que a continuación estos fragmentos se clonaron en el vector pGEM–T para su posterior secuenciación.



Figura 63. Amplificación de las regiones flanqueantes a Tn5 del mutante *R. sphaeroides* D1–2. M, Marcador del tamaño del DNA (“DNA Molecular Marker X”), PCR₁ y PCR₂, fragmentos amplificados mediante PCR con los oligonucleótidos Tn5R/T3 (PCR1) y Tn5F/T3 (PCR2).

5.5.3. Clonación de los productos de PCR correspondientes a las regiones flanqueantes de Tn5 en el plásmido pGEM–T y secuenciación de dichas regiones

Los productos de las amplificaciones PCR1 y PCR2 se clonaron en el vector pGEM–T y se secuenciaron como se detalla en el apartado 8.6. de Materiales y Métodos, utilizando los oligonucleótidos T7 y SP6 de pGEM–T.

El análisis de las secuencias de las regiones adyacentes al transposón Tn5 en el mutante D1-2 de *R. sphaeroides* DSM158S se muestra en la Fig. 64. En la búsqueda en la base de datos del NCBI se detectó similitud con una proteína hipotética de empaquetamiento de DNA en bacteriófago (Fig. 64), por lo que este análisis de la secuencia no ha permitido identificar la función del gen de *R. sphaeroides* donde se produjo la inserción de Tn5 en el mutante D1-2.

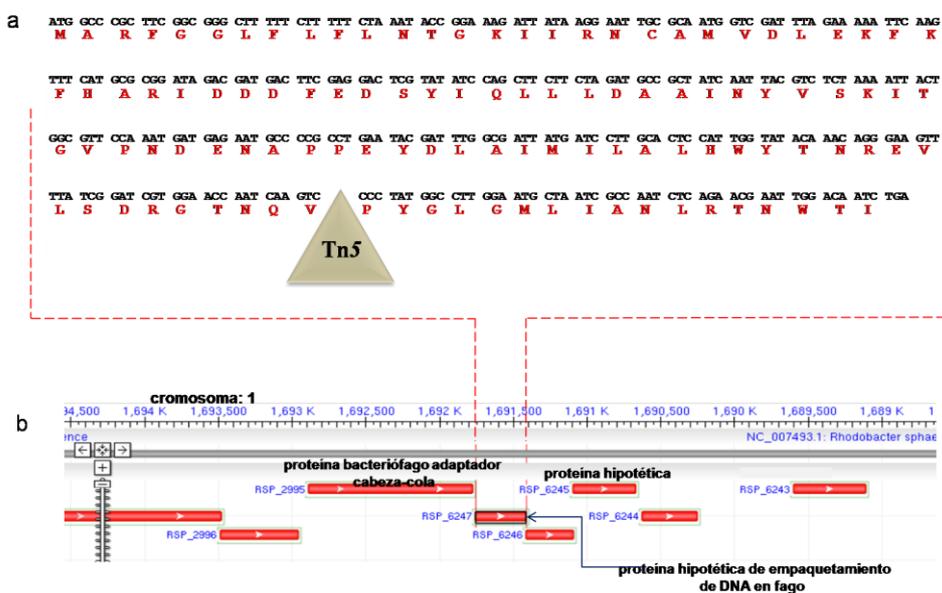


Figura 64. Posible localización del transposón Tn5 en el mutante D1-2 de *R. sphaeroides*. (a) secuencia de las regiones adyacentes al transposón Tn5 en el mutante D1-2 y (b) regiones del DNA genómico flanqueantes al gen RSP_6247 (resaltado con bordes color negro) que codifica la proteína hipotética de empaquetamiento de DNA en bacteriófago.

El transposón Tn5 causa generalmente un efecto polar cuando se inserta en un operón bacteriano (Ciampi y Roth, 1988). Por esta razón, es probable que el fenotipo del mutante D1-2 se deba a un efecto polar del transposón sobre otros genes localizados corriente abajo del sitio de inserción del transposón, que codifican hipotéticas proteínas de función desconocida.

Conclusiones

- 1) La reducción de compuestos nitroaromáticos por la estirpe de *Rhodobacter capsulatus* B10S se realiza en su mayor parte por dos nitrorreductasas insensibles a oxígeno: NprA, una proteína homodimérica de aproximadamente 50 kDa, que posee FMN como cofactor y utiliza NAD(P)H como donador de electrones y que está regulada positivamente por diversos compuestos nitroaromáticos, y NprB, una nitrorreductasa constitutiva que también es un homodímero de aproximadamente 50 kDa y que utiliza una variedad de compuestos nitroaromáticos y nitroheterocíclicos, especialmente ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol), 2,4,6-trinitrotolueno y nitrofurantoína.
- 2) La actividad nitrorreductasa de la proteína NprB purificada como proteína recombinante con una cola de polihistidinas muestra una temperatura y un pH óptimos de 33 °C y 7,0, respectivamente. Además, utiliza NADH como donador preferente de electrones, posee FMN como cofactor y se inhibe por dicumarol y capsaicina.
- 3) Aunque la proteína NprB de *R. capsulatus* posee cierta actividad dihidropterina reductasa, su actividad reductora de quinonas es más elevada, por lo que su posible función fisiológica podría ser la de actuar como NAD(P)H–quinona oxidorreductasa, a diferencia de NprA que carece de actividad quinona reductasa y parece ser una dihidropterina reductasa implicada en el metabolismo de aminoácidos aromáticos.

- 4) El profármaco CB1954 utilizado en técnicas de terapia antitumoral no es activado eficazmente por la proteína NprB de *R. capsulatus*.

- 5) La estrategia de mutagénesis por inserción al azar del transposón Tn5 en el genoma de *R. sphaeroides* DSM158S ha permitido obtener varios posibles mutantes por inserción al azar del transposón Tn5 que podrían estar afectados en la ruta degradativa del 2,4-dinitrofenol (DNP). La caracterización de estos mutantes podrá permitir dilucidar la ruta degradativa del DNP en esta bacteria, e identificar los principales genes e intermediarios metabólicos involucrados en el proceso.

Resumen

El gen *nprB* de *R. capsulatus* B10S codifica una nitrorreductasa que presenta similitud con miembros de la familia B de las nitrorreductasas insensibles a oxígeno. Asimismo, NprB también muestra cierta similitud, aunque no muy elevada, con la nitrorreductasa NprA de *R. capsulatus* que ha sido estudiada previamente.

La proteína NprB se ha sobreexpresado en células de *E. coli* fusionada a una cola de polihistidinas, y se ha purificado por cromatografía de afinidad. La proteína recombinante purificada posee actividad con diferentes compuestos nitroaromáticos y heterocíclicos utilizados por otras nitrorreductasas, y puede utilizar como sustrato 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), aunque la máxima actividad se obtiene con ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol). Sin embargo, la proteína NprB no puede activar eficazmente al profármaco CB1954 utilizado en terapias antitumorales.

La proteína purificada contiene FMN y utiliza preferentemente NADH como donador de electrones. Además, se inhibe por dicumarol y capsaicina, así como por cianuro y sulfato de cobre.

La proteína NprB posee una baja actividad dihidropterina reductasa, a diferencia de NprA, pero fisiológicamente podría actuar como una NAD(P)H-quinona oxidoreductasa.

Finalmente, se han obtenido varios posibles mutantes por inserción al azar del transposón Tn5 que podrían estar afectados en la ruta degradativa del 2,4-dinitrofenol (DNP) en *R. sphaeroides* DSM158S. La caracterización de estos mutantes podrá permitir dilucidar la ruta degradativa del DNP en esta bacteria, e identificar los principales genes e intermediarios metabólicos implicados en el proceso.

Bibliografía

- Abayomi O** (2007). Molecular strategies of microbial adaptation to xenobiotics in natural environment. *Biotech. Mol. Biol. Rev.* **2**:1–13.
- Ahmad F, Hughes JB** (2000). Anaerobic transformation of TNT by *Clostridium*. En: Spain JC, Hughes JB, Knackmuss HJ (eds.), *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. CRC Press, Boca Raton, pp 185–212.
- Aihara, J** (1992). Why nitroaromatic compounds are stable. *Sci. Am.* **266**:62–68.
- Aiub CA, Mazzei JL, Pinto LF, Felzenszwalb I** (2006). Evaluation of nitroreductase and acetyltransferase participation in *N*-nitrosodiethylamine genotoxicity. *Chem.–Biol. Interact.* **161**:146–154.
- Alexander M** (1981). Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* **211**:132–138.
- An D, Gibson DT, Spain JC** (1994). Oxidative release of nitrite from 2-nitrotoluene by a three-component enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain JS42. *J. Bacteriol.* **176**:7462–7467.
- Anandakumar P, Kamaraj S, Jagan S, Ramakrishnan G, Devaki T** (2009). Lysosomal abnormalities during benzo(a)pyrene-induced experimental lung carcinogenesis—defensive role of capsaicin. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **23**:97–103.
- Anderson PJ, Cole LJ, McKay DB, Entsch B** (2002). A flavoprotein encoded in *Selenomonas ruminantium* is characterized after expression in *Escherichia coli*. *Protein Express. Purif.* **24**:429–438.

- Anlezark GM, Melton RG, Sherwood RF, Coles B, Friedlos F, Knox RJ** (1992). The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)-1. Purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli*—a potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Biochem. Pharmacol.* **44**:2289–2295.
- Anusevičius Z, Martínez-Julvez M, Genzor DG, Nivinskas H, Gómez-Moreno C, Cènas N** (1997). Electron transfer reactions of *Anabaena* PCC7119 ferredoxin NADP⁺ reductase with nonphysiological oxidants. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**:247–255.
- Asnis RE** (1957). The reduction of furacin by cell-free extracts of furacinresistant and parent-susceptible strains of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **66**:208–216.
- Barna TM, Khan H, Bruce NC, Barsukov I, Scrutton NS, Moody PC** (2001). Crystal structure of pentaerythritol tetranitrate reductase: "flipped" binding geometries for steroid substrates in different redox states of the enzyme. *J. Mol. Biol.* **310**:433–447.
- Barna T, Messiha HL, Petosa C, Bruce NC, Scrutton NS, Moody PC** (2002). Crystal structure of bacterial morphinone reductase and properties of the C191A mutant enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**:30976–30983.
- Beland FA, Kadlubar FF** (1990). Metabolic activation and DNA adducts of aromatic amines and nitroaromatic hydrocarbons. En: Cooper CS, Grover PL (eds.), *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*. Springer-Verlag, Berlin, pp 267–325.

- Bhushan B, Chauhan A, Samanta SK, Jain RK** (2000). Kinetics of biodegradation of *p*-nitrophenol by different bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **274**:626–630.
- Binks PR, French CE, Nicklin S, Bruce NC** (1996). Degradation of pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1214–1219.
- Bironaitè DA, Cènes N, Kulys JJ** (1991). The rotenone-insensitive reduction of quinones and nitrocompounds by mitochondrial NADH:ubiquinone reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1060**:203–209.
- Black JG** (1999). Bioremediation. En: *Microbiology: Principles and Explorations*, 4th edition, Prentice Hall Publishers, Upper Saddle River, pp 751–752.
- Blasco R, Castillo F** (1992). Light-dependent degradation of nitrophenols by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:690–695.
- Blasco R, Castillo F** (1993). Characterization of a nitrophenol reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1774–1778.
- Blasco R, Aparicio PJ, Castillo F** (1995). Photoinactivation of the detoxifying enzyme nitrophenol reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* **163**: 248–253.
- Blasco R, Moore E, Wray V, Pieper D, Timmis K, Castillo F** (1999). 3-Nitroadipate, a metabolic intermediate for mineralization of 2,4-

- dinitrophenol by a new strain of a *Rhodococcus* species. *J. Bacteriol.* **181**:149–152.
- Blehert DS, Fox BG, Chambliss GH** (1999). Cloning and sequence analysis of two *Pseudomonas* flavoprotein xenobiotic reductases. *J. Bacteriol.* **181**:6254–6263.
- Blumer JL, Friedman A, Meyer LW, Fairchild E, Webster LT Jr, Speck WT** (1980). Relative importance of bacterial and mammalian nitroreductases for niridazole mutagenesis. *Cancer Res.* **40**:4599–4605.
- Boopathy R, Manning JF** (1996). Characterization of partial anaerobic metabolic pathway for 2,4,6–trinitrotoluene degradation by a sulfate–reducing bacterial consortium. *Can. J. Microbiol.* **42**:1203–1208.
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
- Breithaupt C, Strassner J, Breiting U, Huber R, Macheroux P, Schaller A, Clausen T** (2001). X–ray structure of 12–oxophytodienoate reductase 1 provides structural insight into substrate binding and specificity within the family of OYE. *Structure* **9**:419–429.
- Brown CM, Herbert RA** (1977). Ammonia assimilation in members of the *Rhodospirillaceae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1**:43–46.
- Bryant CH, DeLuca M** (1991). Purification and characterization of an oxygen–insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* **266**:4119–4125.

- Bryant DW, McCalla M, Leelsma M, Laneuville P** (1981). Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **27**:81–86.
- Bryant C, Hubbard L, McElroy WD** (1991). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* **266**:4126–4130.
- Caballero FJ, Cejudo FJ, Florencio FJ, Cárdenas J, Castillo F** (1985). Molecular and regulatory properties of glutamine synthetase from the phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* E1F1. *J. Bacteriol.* **162**:804–809.
- Caballero A, Lázaro A, Ramos JL, Esteve-Núñez A** (2005). PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain *Pseudomonas putida* JLR11. *Environ. Microbiol.* **7**:1211–1219.
- Callister SJ, Nicora CD, Zeng X, Roh JH, Dominguez MA, Tavano CL, Monroe ME, Kaplan S, Donohue TJ, Smith RD, Lipton MS** (2006). Comparison of aerobic and photosynthetic *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 proteomes. *J. Microbiol. Methods.* **67**:424–436.
- Caravatti I** (2007). Mechanisms of oxidative vs. reductive nitrobenzene transformation by microorganisms. Biogeochemistry and pollutant dynamics. Master Studies in Environmental Sciences, ETH Zürich, pp 1–5.
- Carlson GP, Dubois KP** (1970). Studies on the induction of nitroreductase activity by DDT and phenobarbital. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **17**:203–216.
- Cartwright NJ, Cain RB** (1959a). Bacterial degradation of the nitrobenzoic acids. *Biochem. J.* **71**:248–261.

- Cartwright NJ, Cain RB** (1959b). Bacterial degradation of the nitrobenzoic acids. 2. Reduction of the nitro group. *Biochem. J.* **73**:305–314.
- Castillo F, Cárdenas J** (1982). Nitrate reduction by the photosynthetic bacteria. *Photosynth. Res.* **3**:3–18.
- Castillo F, Roldán MD, Blasco R, Huertas MJ, Caballero FJ, Moreno-Vivián C, Martínez M** (2005). *Biotecnología Ambiental*. Tébar Madrid.
- Chamberlain RE** (1976). Chemotherapeutic properties of prominent nitrofurans. *J. Antimicrob. Chemother.* **2**:325–36.
- Chauhan A, Chakraborti AK, Jain RK** (2000). Kinetics of biodegradation of *p*-nitrophenol by different bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **270**:733–740.
- Choi JW, Lee J, Nishi K, Kim YS, Jung CH, Kim JS** (2008). Crystal structure of a minimal nitroreductase, *ydjA*, from *Escherichia coli* K12 with and without FMN cofactor. *J. Mol. Biol.* **377**:258–267.
- Choudhary M, Fu YX, Mackenzie C, Kaplan S** (2004). DNA sequence duplication in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: evidence of an ancient partnership between chromosomes I and II. *J. Bacteriol.* **186**:2019–2027.
- Ciampi MS, Roth JR** (1988). Polarity effects in the *hisG* gene of *Salmonella* require a site within the coding sequence. *Genetics* **118**:193–202.

- Corbett MD, Corbett BR** (1995). Bioorganic chemistry of the arylhydroxylamine and nitrosoarene functional groups. En: Spain JC (ed.), *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds*. Plenum Press, New York, pp 151–182.
- Cramer JW, Miller JA, Miller EC** (1960). A new metabolic reaction observed in the rat with the carcinogen 2-AAF. *J. Biol. Chem.* **235**:885–888.
- Deller S, Macheroux P, Sollner S** (2008). Flavin-dependent quinone reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**:141–160.
- Denny WA** (2002). Nitroreductase-based GDEPT. *Curr. Pharm. Des.* **8**:1349–1361.
- Dickel O, Knackmuss HJ** (1991). Catabolism of 1,3-dinitrobenzene by *Rhodococcus* sp. QT-1. *Arch. Microbiol.* **157**:76–79.
- Doi T, Yoshimura H, Tatsumi K** (1983). Properties of nitrofurane reductases from *Escherichia coli* B/r. *Chem. Pharm. Bull.* **31**:1105–1107.
- Dupuis A, Chevallet M, Darrouzet E, Duborjal H, Lunardi J, Issartel JP** (1998). The complex I from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**:147–65.
- Ebert S, Rieger PG, Knackmuss HJ** (1999). Function of coenzyme F₄₂₀ in aerobic catabolism of 2,4,6-trinitrophenol and 2,4-dinitrophenol by *Nocardioides simplex* FJ2-1A. *J. Bacteriol.* **181**:2669–2674.

- Ebert S, Fischer P, Knackmuss HJ** (2002). Converging catabolism of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) and 2,4-dinitrophenol by *Nocardioides simplex* FJ2-1A. *Biodegradation* **12**:367–376.
- Elanskaya IV, Chesnavichene EA, Vernotte C, Astier C** (1998). Resistance to nitrophenolic herbicides and metronidazole in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a result of the inactivation of a nitroreductase-like protein encoded by *drgA* gene. *FEBS Lett.* **428**:188–192.
- Esteve-Núñez A, Ramos JL** (1998). Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. JLR11. *Environ. Sci. Technol.* **32**:3802–3808.
- Esteve-Núñez A, Caballero A, Ramos JL** (2001). Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:335–352.
- Feinberg AP, Vogelstein B** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**:6–13.
- Ferreira P** (2004). Estudios estructura–función sobre la enzima aril–alcohol oxidasa implicada en la biodegradación de la lignina. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá de Henares. España.
- Fitzpatrick TB, Amrhein N, Macheroux P** (2003). Characterization of YqjM, an Old Yellow Enzyme homolog from *Bacillus subtilis* involved in the oxidative stress response. *J. Biol. Chem.* **278**:19891–19897.

- Fonstein M, Zheng S, Haselkorn R** (1992). Physical map of the genome of *Rhodobacter capsulatus* SB 1003. *J. Bacteriol.* **174**:4070–4077.
- Foster GD, Crosby DG** (1987). Comparative metabolism of nitroaromatic compounds in freshwater, brackish water and marine decapod crustaceans. *Xenobiotica* **17**:1393–1404.
- Fouts JR, Brodie BB** (1957). The enzymatic reduction of chloramphenicol *p*-nitrobenzoic acid and the other aromatic nitro-compounds in mammals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **119**:197–207.
- Fox KM, Karplus PA** (1994). Old Yellow Enzyme at 2 Å resolution – overall structure, ligand-binding, and comparison with related flavoproteins. *Structure* **2**:1089–1105.
- Fraaije MW, Mattevi A** (2000). Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem. Sci.* **25**:126–132.
- French CE, Bruce NC** (1995). Bacterial morphinone reductase is related to Old Yellow Enzyme *Biochem. J.* **312**:671–678.
- French CE, Nicklin S, Bruce NC** (1998). Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2864–2868.
- Friesner RA, Beachy MD** (1998). Quantum mechanical calculations on biological systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**:257–62.
- Fu PP** (1990). Metabolism of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Rev.* **22**:209–268.

- Garrity GM, Bell JA, Lilburn T** (2005). Family I. Rhodobacteraceae fam. nov. En Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed, vol. 2 Springer, New York, p 161.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn T** (2006). Rhodobacteraceae fam. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**:1–6.
- Gerrits MM, van der Wouden EJ, Bax DA, van Zwet AA, van Vliet AHM, de Jong A, Kusters JG, Thijs JC, Kuipers EJ** (2004). Role of the *rdxA* and *frxA* genes in oxygen-dependent metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. J. Med. Microbiol. **53**:1123–1128.
- Gesinski RM** (1976). Effectiveness of antimycin A, oligomycin, and sodium cyanide as inhibitors of rat bone marrow oxygen utilization. J. Sci. **76**:139.
- Gibson J, Harwood CS** (1995). Degradation of aromatic compounds by nonsulfur purple bacteria. En: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (eds.), Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Kluwer, Dordrecht, pp 991–1003.
- Gibson J, Harwood CS** (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. Annu. Rev. Microbiol. **56**:345–369.
- Haack T, Erdinger L, Boche G** (2001). Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 of nitroso and respective hydroxylamine compounds. Mutat. Res./Gen. Toxicol. Environ. Mutagen. **491**:183–193.

- Haidour A, Ramos JL** (1996). Identification of the products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, and 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Environ. Sci. Technol. **30**:2365–2370.
- Haigler BE, Wallace WH, Spain JC** (1994). Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JS42. Appl. Environ. Microbiol. **60**:3466–3469.
- Hallas LE, Alexander M** (1983). Microbial transformation of nitroaromatic compounds in sewage effluent. Appl. Environ. Microbiol. **45**:1234–1241.
- Hansen TA, van Gernerden H** (1972). Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. Arch. Microbiol. **86**:49–56.
- Hanstein WG, Hatefi Y** (1974). Trinitrophenol: a membrane-impermeable uncoupler of oxidative phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **71**: 288–292.
- Haselkorn R, Lapidus A, Kogan Y, Vlcek C, Paces J, Paces V, Ulbrich P, Pecenkova T, Rebrekov D, Milgram A, Mazur M, Cox R, Kyrpides N, Ivanova N, Kapatral V, Los T, Lykidis A, Mikhailova N, Reznik G, Vasieva O, Fonstein M** (2001). The *Rhodobacter capsulatus* genome. Photosynth. Res. **70**:43–52.
- Hatanaka N, Yamazaki H, Oda Y, Guengerich FP, Nakajima M, Yokoi T** (2001). Metabolic activation of carcinogenic 1-nitropyrene by human cytochrome P450 1B1 in *Salmonella typhimurium* strain expressing an *O*-acetyltransferase in SOS/*umu* assay. Mutat. Res./Gen. Toxicol. Environ. Mutagen. **497**:223–233.

- Haynes CA, Koder RL, Millar AF, Rodgers DS** (2002). Structures of nitroreductase in the three status. Effect of inhibitor binding and reduction. *J. Biol. Chem.* **13**:11513–11520.
- Heflich RH, Fifer KE, Djuric Z, Beland FA** (1985). DNA adduct formation and mutation induction by nitropyrenes in *Salmonella* and chinese hamster ovary cells: relationships with nitroreduction and acetylation. *Environ. Health Persp.* **62**:135–143.
- Heidi JC, Boardman GD, Freedman DL** (2000). Aerobic biological treatment of 2,4–dinitrotoluene in munitions plant wastewater. *Water Res.* **34**:1595–1603.
- Heiss G, Hofmann KW, Trachtmann N, Walters DM, Rouvière P, Knackmuss HJ** (2002). *npd* gene functions of *Rhodococcus (opacus) erythropolis* HL PM–1 in the initial steps of 2,4,6–trinitrophenol degradation. *Microbiology* **148**:799–806.
- Helsby NA, Ferry DM, Patterson AV, Pullen SM, Wilson WR** (2004). 2–Amino metabolites are key mediators of CB1954 and SN23862 bystander effects in nitroreductase GDEPT. *Brit. J. Cancer* **90**:1084–1092.
- Holtzman JL, Crankshaw DL, Peterson FJ, Polnaszek CF** (1981). The kinetics of the aerobic reduction on nitrofurantoin by NADPH–cytochrome P–450 reductase. *Mol. Pharmacol.* **20**:669–673.
- Horie S, Watanabe T, Ohta A** (1982). Studies on the enzymatic reduction of C–nitroso compounds. V. Molecular properties of porcine heart C–nitrosoreductase and identity of this enzyme with NAD(P)H dehydrogenase. *J. Biochem.* **92**:661–71.

- Hughes JB, Wang C, Yesland K, Bhadra R, Richardson A, Bennet G, Rudolph F** (1998). Reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum* through hydroxylamino intermediates. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**:343–348.
- Imhoff JF, Trüper HG** (1989). Purple nonsulfur bacteria. En: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, pp 1658–1682.
- Jain RK, Dreisbach JH, Spain JC** (1994). Biodegradation of *p*-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3030–3032.
- Jain MR, Zinjarde SS, Deobagkar DD, Deobagkar DN** (2004). 2,4,6-Trinitrotoluene transformation by a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Mar. Pollut. Bull.* **49**:783–788.
- Jensen HL, Lautrup-Larsen G** (1967). Microorganisms that decompose nitro-aromatic compounds, with special reference to dinitro-*o*-cresol. *Acta Agric. Scand.* **17**:115–126.
- Johnson GR, Spain JC** (2003). Evolution of catabolic pathways for synthetic compounds: bacterial pathways for degradation of 2,4-dinitrotoluene and nitrobenzene. *Appl. Microbiol. Biotech.* **62**:110–123.
- Jones CR, Liu YY, Sepai O, Yan H, Sabbioni G** (2005). Hemoglobin adducts in workers exposed to nitrotoluenes. *Carcinogenesis* **26**:133–143.

- Kadiyala V, Smets BF, Chandran K, Spain JC** (1998). High affinity *p*-nitrophenol oxidation by *Bacillus sphaericus* JS905. FEMS Microbiol. Lett. **166**:115–120.
- Kadiyala V, Nadeau LJ, Spain JC** (2003). Construction of *Escherichia coli* strains for conversion of nitroacetophenones to *ortho*-aminophenols. Appl. Environ. Microbiol. **69**:6520–6526.
- Kao MC, Di Bernardo S, Perego M, Nakamaru–Ogiso E, Matsuno–Yagi A, Yagi T** (2004). Functional roles of four conserved charged residues in the membrane domain subunit NuoA of the proton–translocating NADH–quinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **279**:32360–32366.
- Kaplan DL, Kaplan AM** (1982). Mutagenicity of TNT–surfactant complexes. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **28**:33–38.
- Kim HY, Song HG** (2005). Purification and characterization of NAD(P)H–dependent nitroreductase I from *Klebsiella* sp. C1 and enzymatic transformation of 2,4,6–trinitrotoluene. Appl. Microbiol. Biotech. **68**:766–773.
- Kinouchi T, Ohnishi Y** (1983). Purification and characterization of 1–nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*. Appl. Environ. Microbiol. **46**:596–604.
- Kitzing K, Fitzpatrick TB, Wilken C, Sawa J, Bourenkov GP, Macheroux P, Clausen T** (2005). The 1.3 Å crystal structure of the flavoprotein YqjM reveals a novel class of Old Yellow Enzymes. J. Biol. Chem. **280**:27904–27913.

- Klipp W, Masepohl B, Pühler A** (1988). Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: Duplication of a *nifA–nifB* region. *J. Bacteriol.* **170**:693–699.
- Knox RJ, Connors TA** (1997). Prodrugs in cancer chemotherapy. *Pathol. Oncol. Res.* **3**:309–324.
- Knox RJ, Friedlos F, Boland MP** (1993). The bioactivation of CB1954 and its use in antibody–directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Cancer Metast. Rev.* **12**:195–212.
- Knox RJ, Burke PJ, Chen S, Kerr DJ** (2003). CB1954: from the Walker tumor to NQO2 and VDEPT. *Curr. Pharm. Des.* **9**:2091–2104.
- Koder RL, Miller AF** (1998). Steady–state kinetic mechanism, stereospecificity, substrate and inhibitor specificity of *Enterobacter cloacae* nitroreductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1387**:395–405.
- Koder RL, Haynes CA, Rodgers ME, Rodgers DW, Miller AF** (2002). Flavin thermodynamics explain the oxygen insensitivity of enteric nitroreductases. *Biochemistry* **41**:14197–14205.
- Koike H, Sasaki H, Kobori T, Zenno S, Saigo K, Murphy EP, Adman ET, Tanokura M** (1998). 1,8 Å crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of a bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri*: overall structure, cofactor and substrate–analog binding, and comparison with related flavoproteins. *J. Mol. Biol.* **280**:259–273.

- Kutcher W, McCalla D** (1984). Aerobic reduction of 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone by rat liver xanthine dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **33**:799–805.
- Kutty R, Bennett G** (2005). Biochemical characterization of trinitrotoluene transforming oxygen-insensitive nitroreductases from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Arch. Microbiol.* **184**:158–167.
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
- Lee BU, Park SC, Cho YS, Kahng HY, Oh KH** (2008). Expression and characterization of the TNT nitroreductase of *Pseudomonas* sp. HK-6 in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **56**:386–390.
- Lenke H, Pieper DH, Bruhn C, Knackmuss HJ** (1992). Degradation of 2,4-dinitrophenol by two *Rhodococcus erythropolis* strains, HL 24-1 and HL 24-2. *App. Environ. Microbiol.* **58**:2928–2932.
- Leung KH, Yao M, Stearns R, Chiu SH** (1995). Mechanism of bioactivation and covalent binding of 2,4,6-trinitrotoluene. *Chem. Biol. Interact.* **97**:37–51.
- Lewis TA, Newcombe DA, Crawford RL** (2004). Bioremediation of soils contaminated with explosives. *J. Environ. Manag.* **70**:291–307.
- Li J, Vrielink A, Brick P, Blow DM** (1993). Crystal structure of cholesterol oxidase complexed with a steroid substrate: implications for flavin adenine dinucleotide dependent alcohol oxidases. *Biochemistry* **32**:11507–11515.

- Lim LW, Shamala N, Mathews FS, Steenkamp DJ, Hamlin R, Xuong NH** (1986). Three-dimensional structure of the iron-sulfur flavoprotein trimethylamine dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **261**:15140–15146.
- Liu YY, Lu AYH, Stearns RA, Chiu SHI** (1992). In vivo covalent binding of [¹⁴C] trinitrotoluene to proteins in the rat. *Chem. Biol. Interact.* **82**:1–19.
- Liu L, Wagner C, Hanna P** (2008). Human arylamine *N*-acetyltransferase 1: in vitro and intracellular inactivation by nitrosoarene metabolites of toxic and carcinogenic arylamines. *Chem. Res. Toxicol.* **21**:2005–2016.
- Luckenbach T, Epel D** (2005). Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters. *Environ. Health Persp.* **113**:17–23.
- Lye LF, Cunningham ML, Beverley SM** (2002). Characterization of *quinonoid*-dihydropteridine reductase (QDPR) from the lower eukaryote *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **277**:38245–38253.
- Madigan MT, Gest H** (1979). Growth of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* chemoautotrophically in darkness with H₂ as the energy source. *J. Bacteriol.* **137**:524–530.
- Madigan MT, Jung DO, Resnick SM** (2001). Growth of the purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* on the aromatic compound hippurate. *Arch. Microbiol.* **175**:462–465.

- Madigan MT, Martinko JM, Parker J** (2003). *Biología de los Microorganismos*, 10ª Ed. Pearson–Prentice Hall, Madrid.
- Mandel M, Higa A** (1970). Calcium–dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**:154–162.
- Manning BW, Cerniglia CE, Federle TW** (1986). Biotransformation of 1–nitropyrene to 1–aminopyrene and *N*–formyl–1–aminopyrene by the human intestinal microbiota. *J. Toxicol. Environ. Health.* **18**:339–346.
- Marques de Oliveira I, Pêgas JA, Bonatto D** (2007). *In silico* identification of a new group of specific bacterial and fungal nitroreductase–like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **355**: 919–925.
- Marvin–Sikkema FD, de Bont JAM** (1994). Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotech.* **42**:499–507.
- Marshall SJ, Krause D, Blencowe DK, White GF** (2004). Characterization of glycerol trinitrate reductase (NerA) and the catalytic role of active–site residues. *J. Bacteriol.* **186**:1802–1810.
- Mason C** (2002). *Biology of Freshwater Pollution*, 4th Ed. Pearson Education, Longman, London, pp 2–71.
- Mason RP, Holtzman JL** (1975a). The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**:1267–1274.

- Mason RP, Holtzman JL** (1975b). The mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase. Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates. *Biochemistry* **14**:1626–1632.
- Mastandrea C, Chichizola C, Ludueña B, Sánchez H, Álvarez H, Gutiérrez A** (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* **39**:1.
- Mattevi A** (1998). The PHBH fold: Not only flavoenzymes. *Biophys. Chem.* **70**:217–222.
- Mattevi A** (2006). To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes. *Trends Biochem. Sci.* **31**:276–283.
- Mattevi A, Vanoni MA, Todone F, Rizzi M, Teplyakov A, Coda A, Bolognesi M, Curti B** (1996). Crystal structure of D–amino acid oxidase: A case of active site mirror–image convergent evolution with flavocytochrome b2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:7496–7501.
- Mattevi A, Vanoni MA, Curti B** (1997). Structure of D–amino acid oxidase: new insights from an old enzyme. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**:804–810.
- Mattevi A, Tedeschi G, Bacchella L, Coda A, Negri A, Ronchi S** (1999). Structure of L–aspartate oxidase: implications for the succinate dehydrogenase/fumarate reductase oxidoreductase family. *Structure* **7**:745–756.
- McCalla DR, Reuvers A, Kaiser C** (1971). "Activation" of nitrofurazone in animal tissues. *Biochem. Pharmacol.* **20**:3532–3537.

- McCormick NG, Feeherry FE, Levinson HS** (1976). Microbial transformation of 2,4,6-TNT and other nitroaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**:949–958.
- McCoy EC, Rosenkranz HS, Mermelstein R** (1981). Frameshift mutations: relative roles of simple intercalation and of adduct formation. *Environ. Mutagen.* **3**:421–427.
- McGoldrick HM, Roessner CA, Raux E, Lawrence AD, McLean KJ, Munro AW, Santabarbara S, Rigby SE, Heathcote P, Scott AI, Warren MJ** (2005). Identification and characterization of a novel vitamin B12 (cobalamin) biosynthetic enzyme (CobZ) from *Rhodobacter capsulatus*, containing flavin, heme, and Fe–S cofactors. *J. Biol. Chem.* **280**:1086–1094.
- Meyer M, Wohlfahrt G, Knäblein J, Schomburg D** (1998). Aspects of the mechanism of catalysis of glucose oxidase: a docking, molecular mechanics and quantum chemical study. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **12**:425–440.
- Michael NP, Brehm JK, Anlezark GM, Minton NP** (1994). Physical characterization of the *Escherichia coli* B gene encoding nitroreductase and its overexpression in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**:195–202.
- Miskiniene V, Šarlauskas J, Jacquot J, Čėnas N** (1998). Nitroreductase reactions of *Arabidopsis thaliana* thioredoxin reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**:275–283.
- Mittal G, Brar AP, Soni G** (2008). *N*-nitrosodiethylamine-induced toxicity in relation to oxidative stress and development of

- atherosclerosis in hypercholesterolemic diet-fed rabbits. *Exp. Toxicol. Pathol.* **59**:409–414.
- Mizutani H, Miyahara I, Hirotsu K, Nishina Y, Shiga K, Setoyama C, Miura R** (1996). Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3.0 Å resolution. *J. Biochem.* **120**:14–17.
- Möller L** (1994). *In vivo* metabolism and genotoxic effects of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.* **102**:139–146.
- Moran GR, Entsch B, Palfey BA, Ballou DP** (1996). Evidence for flavin movement in the function of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase from studies of the mutant Arg220Lys. *Biochemistry* **35**:9278–9285.
- Moreno S, Mason R, Docampo R** (1984). Reduction of nifurtimox and nitrofurantoin to free radical metabolites by rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **259**:6298–6305.
- Moreno-Vivián C, Cejudo FJ, Cárdenas J, Castillo F** (1983). Ammonia assimilation pathways in *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1. *Arch Microbiol.* **136**:147–151.
- Moreno-Vivián C, Roldán MD, Reyes F, Castillo F** (1994). Isolation and characterization of transposon Tn5 mutans of *Rhodobacter sphaeroides* deficient in both nitrate and chlorate reduction. *FEMS Microbiol. Lett.* **115**:279–284.
- Nadeau LJ, Spain JC** (1995). Bacterial degradation of *m*-nitrobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:840–843.

- Nishino SF, Spain JC** (1993). Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Appl. Environ. Microbiol. **59**:2520–2525.
- Nishino SF, Spain JC, He Z** (2000). Strategies for aerobic degradation of nitroaromatic compounds by bacteria: process discovery to field application. En: Spain JC, Hughes JB, Knackmuss HJ (eds.), Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives, Boca Raton: CRC Press, pp 7–61.
- Nokhbeh MR, Boroumandi S, Pokorny N, Koziarz P, Paterson ES, Lambert IB** (2002). Identification and characterization of SnrA, an inducible oxygen-insensitive nitroreductase in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA1535. Mut. Res. **508**:59–70.
- Orna VM, Mason RP** (1989). Correlation of kinetic parameters of nitroreductase enzymes with redox properties of nitroaromatic compounds. J. Biol. Chem. **264**:12379–12384.
- Padda RS, Wang C, Hughes JB, Bennett GN** (2003). Mutagenicity of nitroaromatic explosives during anaerobic transformation by *Clostridium acetobutylicum*. Environ. Toxicol. Chem. **22**:2293–2297.
- Pak JW, Knoke KL, Noguera DR, Fox BG, Chambliss GH** (2000). Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. Appl. Environ. Microbiol. **66**:4742–4750.
- Pappas CT, Sram J, Moskvin OV, Ivanov PS, Mackenzie RC, Choudhary M, Land ML, Larimer FW, Kaplan S, Gomelsky M**

- (2004). Construction and validation of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 DNA microarray: transcriptome flexibility at diverse growth modes. *J. Bacteriol.* **186**:4748–58.
- Park HJ, Kreutzer R, Reiser CO, Sprinzl M** (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding a H₂O₂-forming NADH oxidase from the extreme thermophilic *Thermus thermophilus* HB8 and its expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **205**:875–879.
- Patridge EV, Ferry JG** (2006). WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *J. Bacteriol.* **188**:3498–506.
- Pérez-Reinado E** (2005). Bases Moleculares de la degradación de polinitrofenoles en *Rhodobacter capsulatus*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. España.
- Pérez-Reinado E, Blasco R, Castillo F, Moreno-Vivián C, Roldán D** (2005). Regulation and characterization of two nitroreductase *nprA* and *nprB* genes of *Rhodobacter capsulatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7643–7649.
- Pérez-Reinado E, Roldán MD, Castillo F, Moreno-Vivián C** (2008). The NprA nitroreductase required for 2,4-dinitrophenol reduction in *Rhodobacter capsulatus* is a dihydropteridine reductase. *Environ. Microbiol.* **10**:3174–3183.
- Pfennig N** (1978). General physiology and ecology of photosynthetic bacteria. En: Clayton RK, Sistrom WR, (eds.), *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press, Nueva York, pp 3–18.

- Pollich M, Wersig C, Klug G** (1996). The *bluF* gene of *Rhodobacter capsulatus* is involved in conversion of cobinamide to cobalamin (vitamin B12). *J. Bacteriol.* **178**:7308–7310.
- Popesku JT, Singh A, Zhao JS, Hawari J, Ward OP** (2003). High TNT-transforming activity by a mixed culture acclimated and maintained on crude-oil-containing media. *Can. J. Microbiol.* **49**:362–366.
- Porter SL, Wadhams GH, Martin AC, Byles ED, Lancaster DE, Armitage JP** (2006). The CheY of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* **281**:32694–32704.
- Qasim M, Moore B, Taylor L, Honea P, Gorb L, Leszczynski J** (2007). Structural characteristics and reactivity relationships of nitroaromatic and nitramine explosives – A review of our computational chemistry and spectroscopic research. *Int. J. Mol. Sci.* **8**:1234–1264.
- Race PR, Lovering AL, Green RM, Ossor A, White SA, Searle PF, Wrighton CJ, Hyde EI** (2005). Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. *J. Biol. Chem.* **280**:13256–13264.
- Race PR, Lovering AL, White SA, Grove JI, Searle PF, Wrighton CW, Hyde EI** (2007). Kinetic and structural characterization of *Escherichia coli* nitroreductase mutants showing improved efficacy for the prodrug substrate CB1954. *J. Mol. Biol.* **368**:481–92.

- Rafii F, Franklin W, Heflich RH, Cerniglia CE** (1991). Reduction of nitroaromatic compounds by anaerobic bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:962–968.
- Rafii F, Hehman G, Lunsford P** (2001). Purification and characterization of an enzyme from *Mycobacterium* sp. Pyr-1, with nitroreductase activity and an N-terminal sequence similar to lipoamide dehydrogenase. *Arch. Microbiol.* **176**:381–385.
- Ramos JL, González-Pérez MM, Caballero A, van Dillewijn P** (2005). Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Curr. Opin. Biotech.* **16**:275–281.
- Rau J, Stolz A** (2003). Oxygen-insensitive nitroreductases NfsA and NfsB of *Escherichia coli* function under anaerobic conditions as lawsone-dependent azo reductases. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3448–3455.
- Rieger PG, Knackmuss HJ** (1995). Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. En: Spain JC (ed.), *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds*. Plenum Press, New York, pp 1–18.
- Rieger PG, Sinnwell V, Preuss A, Francke W, Knackmuss HJ** (1999). Hydride-Meisenheimer complex formation and protonation as key reactions of 2,4,6-trinitrophenol biodegradation by *Rhodococcus erythropolis*. *J. Bacteriol.* **181**:1189–1195.
- Rieger PG, Meier HM, Gerle M, Vogt U, Groth T, Knackmuss HJ** (2002). Xenobiotics in the environment: present and future strategies

- to obviate the problem of biological persistence. *J. Biotech.* **94**:101–123.
- Riley RJ, Workman P** (1992). DT–diaphorase in cancer chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **43**:1657–1669.
- Rivero A, Chueca M, García de Juan JF, Elso J, Olivera JE, Grijalva A, Palacios M, García S** (1988). Programa de detección precoz de la hiperfenilalaninemia: 11 años de andadura. En: Anales de la Universidad de Navarra. (<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol121/n3>).
- Robertson BK, Jjemba PK** (2005). Enhanced bioavailability of sorbed 2,4,6–trinitrotoluene (TNT) by a bacterial consortium. *Chemosphere.* **58**:263–70.
- Robidoux PY, Hawari J, Thiboutot S, Ampleman G, Sunahara GI** (1999). Acute toxicity of 2,4,6–trinitrotoluene in earthworm (*Eisenia andrei*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **44**:311–321.
- Roldán MD** (1992). Reducción de nitrato y resistencia a clorato en *Rhodobacter sphaeroides*: aislamiento y caracterización de mutantes con el transposón Tn5. Tesis de Licenciatura, Universidad de Córdoba, España.
- Roldán MD, Blasco R, Caballero FJ, Castillo F** (1998). Degradation of *p*–nitrophenol by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* **169**:36–42.
- Roldán MD, Pérez–Reinado E, Castillo F, Moreno–Vivián C** (2008). Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:474–500.

- Rooseboom M, Commandeur JNM, Vermeulen NPE** (2004). Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol. Rev.* **56**:53–102.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Šarlauskas J, Nemeikaitė-Čėnienė A, Anusevičius Ž, Misevičienė L, Marozienė A, Markevičius A, Narimantas Čėnas** (2004). Enzymatic redox properties of novel nitrotriazole explosives implications for their toxicity. *Z. Naturforsch.* **59**:399–404.
- Satoh T, Miyoshi H, Sakamoto K, Iwamura H** (1996). Comparison of the inhibitory action of synthetic capsaicin analogues with various NADH-ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* **1273**:21–30.
- Sauriasari R, Wang D-H, Takemura Y, Tsutsui K, Masuokac N, Sano K, Horita M, Wang B-L, Ogino K** (2007). Cytotoxicity of lawsone and cytoprotective activity of antioxidants in catalase mutant *Escherichia coli*. *Toxicol.* **235**:103–111.
- Saz AK, Martínez LM** (1956). Enzymatic basis of resistance to Aureotmycin I. Differences between flavoprotein nitro reductases of sensitive and resistant *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **223**:285–292.
- Schäfer R, Achazi RK** (1999). The toxicity of soil samples containing TNT and other ammunition derived compounds in the enchytraeid and collembola-biotest. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **6**:213–219.

- Schreuder HA, Prick PAJ, Wierenga RK, Vriend G, Wilson KS, Hol WGJ, Drenth J** (1989). Crystal structure of the *p*-hydroxybenzoate hydroxylase–substrate complex refined at 1.9 Å resolution. Analysis of the enzyme–substrate and enzyme–product complexes. *J. Mol. Biol.* **208**:679–696.
- Schreuder HA, Hol WGJ, Drenth J** (1990). Analysis of the active site of the flavoprotein *p*-hydroxybenzoate hydroxylase and some ideas with respect to its reaction mechanism. *Biochemistry* **29**:3101–3108.
- Schuler F, Yano T, Di Bernardo S, Yagi T, Yankovskaya V, Singer TP, Casida JE** (1999). NADH–quinone oxidoreductase: PSST subunit couples electron transfer from iron–sulfur cluster N2 to quinone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:4149–53.
- Searle PF, Chen MJ, Hu L, Race PR, Lovering AL, Grove JI, Guise C, Jaberipour M, James ND, Mautner V, Young LS, Kerr DJ, Mountain A, White SA, Hyde EI** (2004). Nitroreductase: a prodrug–activating enzyme for cancer gene therapy. *Clin. Experiment. Pharmacol. Physiol.* **31**:811–816.
- Sener MK, Olsen JD, Hunter CN, Schulten K** (2007). Atomic level structural and functional model of a bacterial photosynthetic membrane vesicle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**:15723–15728.
- Simon R, Priefer U, Pühler A** (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram–negative bacteria. *Biotechnology* **1**:784–791.

- Sims JG, Steevens JA** (2008). The role of metabolism in the toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its degradation products to the aquatic amphipod *Hyaella azteca*. *Ecotox. Environ. Saf.* **70**:38–46.
- Singh H, Purnell E, Smith C** (2007). Mechanistic study on aniline-induced erythrocyte toxicity. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **58**:275–285.
- Smets BF, Yin H, Esteve-Nuñez A** (2007). TNT biotransformation: when chemistry confronts mineralization. *Appl. Microbiol. Biotech.* **76**:267–277.
- Smith AL, Erwin AL, Kline T, Unrath WCT, Nelson K, Weber A, Howald WN** (2007). Chloramphenicol is a substrate for a novel nitroreductase pathway in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **51**:2820–2829.
- Smyth G, Orsi B** (1989). Nitroreductase activity of NADH dehydrogenase of the respiratory redox chain. *Biochem. J.* **257**:859–863.
- Snape JR, Walkley NA, Morby AP, Nicklin S, White GF** (1997). Purification, properties, and sequence of glycerol trinitrate reductase from *Agrobacterium radiobacter*. *J. Bacteriol.* **179**:7796–7802.
- Sommerville CC, Nishino SF, Spain JC** (1995). Isolation and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.* **177**:3837–3842.
- Spain JC** (1995a). Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:523–555.

- Spain JC** (1995b). Bacterial degradation of nitroaromatic compounds under aerobic conditions. En: Spain JC (ed.), Biodegradation of Nitroaromatic Compounds. Plenum Press, New York, pp 19–35.
- Spain JC, Gibson DT** (1991). Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in a *Moraxella* sp. Appl. Environ. Microbiol. **57**:812–819.
- Spain JC, Wyss O, Gibson DT** (1979). Enzymatic oxidation of *p*-nitrophenol. Biochem. Biophys. Res. Commun. **88**:634–641.
- Spanggard RJ, Mabey WR, Chou TW, Smith JH** (1985). Environmental fate of selected nitroaromatic compounds in the aquatic environment. En: Rickert DE (ed.), Toxicity of Nitroaromatic Compounds, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, pp 15–33.
- Spanggard RJ, Spain JC, Nishino SF, Mortelmans KE** (1991). Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. Appl. Environ. Microbiol. **57**:3200–3205.
- Spyridaki A, Fritzsich G, Kouimtzoglou E, Baciou L, Ghanotakis D** (2000). The natural product capsaicin inhibits photosynthetic electron transport at the reducing side of photosystem II and purple bacterial reaction center: structural details of capsaicin binding. Biochim. Biophys. Acta **1459**:69–76.
- Stenberg K, Lindqvist Y** (1997). Three-dimensional structures of glycolate oxidase with bound active-site inhibitors. Protein Sci. **6**:1009–1015.

- Tatsumi, K, Doi T, Yoshimura H, Koga H, Horiuchi T** (1982). Oxygen-insensitive nitrofurantoin reductases in *Salmonella typhimurium* TA100. *J. Pharm. Dyn.* **5**:423–429.
- Testa B, Krämer S** (2006). The biochemistry of drug metabolism – an introduction Part 1. Principles and Overview. *Helvetica Chim. Acta* **3**:1059.
- Trüper HG, Pfenning N** (1978). Taxonomy of the *Rhodospirillales*. En: Clayton RK, Sistrom WR (eds.), *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press, New York, pp 19–27.
- Ueda O, Kitamura S, Ohashi K, Sugihara K, Ohta S** (2003). Xanthine oxidase-catalyzed metabolism of 2-nitrofluorene, a carcinogenic air pollutant, in rat skin. *Drug Metab. Dispos.* **31**:367–372.
- Umbreit J** (2007). Methemoglobin—it’s not just blue: a concise review. *Am. J. Hematol.* **82**:134–144.
- Uden G, Bongaerts J** (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta.* **1320**:217–234.
- Van Dillewijn P, Wittich RM, Caballero A, Ramos JL** (2008). Subfunctionality of hydride transferases of the Old Yellow Enzyme family of flavoproteins of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:6703–6708.

- Vance WA, Levin DE** (1984). Structural features of nitroaromatics that determine mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. Environ. Mutat. **6**:797–811.
- Varela E, Martínez J, Martínez AT** (2000). Aryl–alcohol oxidase protein sequence: a comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. Biochim. Biophys. Acta. **1481**:202–208.
- Vasudevan SG, Shaw DC, Armarego WLF** (1988). Dihydropteridine reductase from *Escherichia coli*. Biochem. J. **255**:581–588.
- Villanueva JR** (1964). The purification of a nitro–reductase from *Nocardia* V. J. Biol. Chem. **239**:773–776.
- Vorbeck C, Lenke H, Fischer P, Spain JC, Knackmuss HJ** (1998). Initial reductive reactions in anaerobic microbial metabolism of 2,4,6–trinitrotoluene (TNT). Appl. Environ. Microbiol. **64**:246–252.
- Wang G, Maier RJ** (2004). An NADPH quinone reductase of *Helicobacter pylori* plays an important role in oxidative stress resistance and host colonization. Infect. Immun. **72**(3):1391–1396.
- Warburg O, Christian W** (1933). The yellow enzyme and its functions. Biochem. J. **266**:377–411.
- Wardman P, Clarke ED** (1976). Oxygen inhibition of nitroreductase: electron transfer from nitro radical–anions to oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. **69**:942–949.
- Watanabe M, Ishidate M, Nohmi T** (1990). Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene. Nucleic Acids Res. **18**:1059.

- Watanabe M, Igarashi T, Kaminuma T, Sofuni T, Nohmi T** (1994). *N*-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase of *Salmonella typhimurium*: proposal for a common catalytic mechanism of arylamine acetyltransferase enzymes. *Environ. Health Perspect.* **102**:83–89.
- Watanabe M, Nishino T, Takio K, Sofuni T, Nohmi T** (1998). Purification and characterization of wild-type and mutant “classical” nitroreductases of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **273**:23922–23928.
- Weaver PF, Wall JD, Gest H** (1975). Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* **105**:207–216.
- Webster GC, Frenkel AW** (1953). Some respiratory characteristics of the blue-green alga, *Anabaena*. *Plant Physiol.* **28**:63–69.
- Whiteway J, Koziarz PJ, Veall V, Sandhu N, Kumar P, Hoecher B, Lambert IB** (1998). Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of *nfsA* and *nfsB* in development of resistance to 5-nitrofurán derivatives in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:5529–5539.
- Williams RE, Bruce NC** (2002). ‘New uses for an old enzyme’ – the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes. *Microbiology* **148**:1607–1614.
- Williams RE, Rathbone DA, Scrutton NS, Bruce NC** (2004). Biotransformation of explosives by the Old Yellow Enzyme family of flavoproteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3566–3574.

- Won WD, Disalvo LH, Ng J** (1976). Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**:576–580.
- Xiao Y, Zhang JJ, Liu H, Zhou NY** (2007). Molecular characterization of a novel *ortho*-nitrophenol catabolic gene cluster in *Alcaligenes* sp. strain NyZ215. *J. Bacteriol.* **189**:6587–93.
- Xu G, McLeod HL** (2001). Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **7**:3314–3324.
- Yagi T, Yano T, Di Bernardo S, Matsuno–Yagi A** (1998). Prokaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* **1364**:125–133.
- Yarlett N, Gorrell T, Marczak R, Müller M** (1985). Reduction of nitroimidazole derivatives by hydrogenosomal extracts of *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **14**:29–40.
- Zablotowicz RM, Leung KT, Alber T, Cassidy MB, Trevors JT, Lee H, Veldhuis L, Hall JC** (1999). Degradation of 2,4-dinitrophenol and selected nitroaromatic compounds by *Sphingomonas* sp. UG30. *Can. J. Microbiol.* **45**:840–848.
- Zbaida S** (2002). Nitroreductases and azoreductases. Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics. *Curr. Toxicol. Series.* **16**:555–566.
- Zenno S, Saigo K, Kanoh H, Inouye S** (1994). Identification of the gene encoding the major NAD(P)H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J. Bacteriol.* **176**:3536–3543.

- Zenno S, Koike H, Kumar AN, Jayarman R, Tanokura M, Saigo K** (1996a). Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* mayor nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase. *J. Bacteriol.* **178**:4508–4514.
- Zenno S, Koike H, Tanokura M, Saigo K** (1996b). Gene cloning, purification and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to FRaseI, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*. *J. Biochem.* **120**:736–744.
- Zenno S, Koike H, Tanokura M and Saigo K** (1996c). Conversion of NfsB, a minor *Escherichia coli* nitroreductase, to a flavin reductase similar in biochemical properties to FRaseI, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*, by a single amino acid substitution. *Appl. Environ. Microbiol.* **178**:4731–4733.
- Zenno S, Kobori T, Tanokura M, Saigo K** (1998a). Conversion of NfsA, the major *Escherichia coli* nitroreductase, to a flavin reductase with an activity similar to that of Frp, a flavin reductase in *Vibrio harveyi*, by a single amino acid substitution. *J. Bacteriol.* **180**:422–425.
- Zeyer J, Kocher HP, Timmis KN** (1986). Influence of *para*-substituents on the oxidative metabolism of *o*-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:334–339.