



ANR coordina de la expresión de las oxidasas terminales de *Pseudomonas putida*

A. Ugidos¹, G. Morales¹, E. Rial², F. Rojo¹

¹ Centro Nacional de Biotecnología, CSIC. Campus U.A.M., Cantoblanco, Madrid

² Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, Madrid

La respiración es un conjunto de procesos redox en los que se transfieren electrones entre diferentes componentes de la cadena respiratoria que tienen distinto potencial de óxido-reducción. Esta transferencia de electrones va acoplada a la producción de energía gracias al gradiente de protones generado y aprovechado por la ATP-sintasa para generar ATP. En *Pseudomonas putida*, un microorganismo aerobio, la cadena respiratoria consta de cinco oxidasas terminales: Cyo, CIO, Cbb3.1, Cbb3.2 y Aa3, cuyas diferencias radican en su potencial de óxido-reducción, su afinidad por el oxígeno y su capacidad para bombear protones al espacio periplásmico. Esto se traduce en que unas sean más adecuadas que otras para generar energía dependiendo del estado metabólico de la célula.

Para comprobar la importancia de la composición y coordinación de los distintos componentes de la cadena de transporte de electrones, hemos inactivado selectivamente cada una de las oxidasas terminales de *P. putida*. Estos mutantes se han utilizado para hacer un análisis completo del efecto de la inactivación de cada una de ellas. Para ello, se han purificado membranas de cada cepa en medio LB en dos condiciones distintas: en fase exponencial y en fase estacionaria. Se ha cuantificado la respiración en cada mutante a partir del consumo de NADH de dichas membranas, añadiendo también inhibidores respiratorios como el cianuro. Los resultados obtenidos apuntan a que la composición de la cadena respiratoria debe estar coordinada, de manera que la ausencia de unas oxidasas terminales se compense con un incremento en la actividad de otras oxidasas. Los resultados muestran además que Cyo es la oxidasa más importante en fase exponencial, mientras que Cbb3-1 pasa a jugar un papel preponderante en fase estacionaria. Para estudiar si el regulador ANR, homólogo de FNR en *E. coli*, tiene algún efecto en la coordinación de la expresión de las distintas oxidasas terminales, hemos hecho un mutante en *anr* para hacer ensayos de RT-PCR en tiempo real comparando la expresión de todas las oxidasas terminales en *P. putida* KT2440 y en dicho mutante.

ANR es un regulador de transcripción que se une al DNA como dímero. Sin embargo, sólo dimeriza eficientemente cuando las concentraciones de oxígeno son bajas, por lo que actúa como un sensor de oxígeno. Hemos purificado un derivado de ANR que es activo en presencia de oxígeno y hemos comprobado que parte de los efectos ejercidos sobre las oxidasas terminales son directos, puesto que se une a los promotores de Cyo, CIO y Cbb3.1. Los resultados obtenidos nos han permitido determinar la secuencia consenso de ANR en *Pseudomonas*.

Ugidos, A., Morales, G., Rial, E., Williams, H.D. y Rojo, F. (2008). The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environmental Microbiology*, en prensa.