

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de
Biosistemas



Bases moleculares del tránsito de hierro en la fijación biológica del nitrógeno

TESIS DOCTORAL

Presentada para optar al título de Doctor por:

Elena Rosa Núñez

Graduada en Biología

Máster en Biología Molecular y Celular Integrativa

Madrid, 2024



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica,
Alimentaria y de Biosistemas

**Doctorado en Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas
y Microorganismos Asociados**

Bases moleculares del tránsito de hierro en la fijación biológica del nitrógeno

TESIS DOCTORAL

Presentada para optar al título de Doctor por:

Elena Rosa Núñez

Graduada en Biología
Máster en Biología Molecular y Celular Integrativa

Bajo la dirección de:

Dr. Manuel González Guerrero

Dr. Luis Manuel Rubio Herrero

Madrid, 2024

Título: Bases moleculares del tránsito de hierro en la fijación biológica del nitrógeno

Autor: Elena Rosa Núñez

Programa de Doctorado: Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas y Microorganismos Asociados

Dirección de tesis:

Dr. Manuel González Guerrero, Catedrático, Universidad Politécnica de Madrid (UPM) (Director)

Dr. Luis Manuel Rubio Herrero, Investigador Científico, Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (Co-director)

Revisores externos:

Tribunal de tesis:

Fecha de defensa:

“Esta tesis ha sido parcialmente financiada por una beca Severo Ochoa del Programa de Centros de Excelencia en R&D por la Agencia Estatal de Investigación de España (SEV-2016-0672) recibida por el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA/CSIC) con una beca de Formación del Personal de Investigación (PRE2018-084895). Esta tesis también ha sido parcialmente financiada por la Fundación Bill & Melinda Gates (INV-005889) y por la beca PID2021-124060OB-100 del Ministerio de Ciencia, Innovación/Agencia Estatal de Investigación/10.13039/50110001103.

Tras las nubes el cielo es siempre azul.

Agradecimientos

A mis padres.

Abstract

One of the most important processes for obtaining assimilable nitrogen in natural ecosystems is mediated by nitrogenase. This metalloenzyme requires three different iron-sulfur clusters for N_2 reduction to NH_3 , a process known as nitrogen fixation. Assembly and formation of these metallic cofactors has been studied in detail on the bacterium *Azotobacter vinelandii*. These studies indicate that the proteins NifQ, NifU and NifS are the starting point for the incorporation of molybdenum, iron and sulfur into nitrogenase clusters. NifQ receives a 4Fe-4S precursor through direct interaction with NifU to form a 3Fe-4S-Mo group. NifU acts as central point for assembly of iron-sulfur clusters that will be delivered to apo-proteins. In this pathway sulfur is provided by the cysteine desulfurase NifS, but the iron donor is unknown. In addition to NifU, IscU also acts as a scaffold protein in the formation of Fe-S clusters as house-keeping system. At the beginning of this Doctoral Thesis, it was unknown whether IscU would have some role in Fe-S cluster delivery to NifQ. It has been shown that although IscU and NifQ interact, NifU is the principal iron donor to NifQ. In *A. vinelandii* there are two known points of interest in iron homeostasis regarding from nitrogen fixation: bacterioferritin A (BfrA), a cytosolic iron storage protein, and NifU. With the aim of finding new proteins involved in iron trafficking, a pull-down was done using these two proteins as bait and an extract of *A. vinelandii* DJ. Among the interactors found, glutaredoxin D (GrxD) was a promising candidate as it interacts with both proteins. Different copurification assays confirmed that GrxD only interacts with BfrA when BfrA is iron loaded and GrxD is missing its sulfoferric cluster. It indicates a possible iron transfer from BfrA to GrxD. On the other hand, NifU-GrxD interaction occurs independently of metallic state of these proteins although this interaction was stronger when only one of them was Fe-S reconstituted. Finally, grxD and bfrA mutants fix, significantly, less nitrogen than the wild-type strain. All these data suggest that GrxD is required for optimal nitrogenase activity, participating in iron metabolism.

Resumen

Uno de los procesos más importantes para la obtención de nitrógeno asimilable en los ecosistemas naturales es la fijación de nitrógeno catalizada por la nitrogenasa. Esta metaloenzima posee tres grupos sulfoferricos que son necesarios para que se produzca la reducción de N_2 a NH_3 . El ensamblaje y formación de los cofactores metálicos de la nitrogenasa han sido descritos en detalle en la bacteria *Azotobacter vinelandii*. Estos estudios posicionan a las proteínas NifQ, NifU y NifS como punto de partida para la incorporación de molibdeno, hierro y azufre respectivamente. NifQ recibe un precursor 4Fe-4S, por interacción directa, de NifU para formar su grupo 3Fe-4S-Mo. NifU actúa como eje central en el ensamblaje de los grupos sulfoferricos que serán entregados a apo-proteínas, donde el azufre es entregado por la desulfurasa NifS y el donador de hierro es desconocido. Además de NifU, la proteína IscU también actúa como proteína andamio en la formación de los grupos Fe-S actuando como un sistema *house-keeping*. Al inicio de esta Tesis Doctoral se desconocía si IscU tenía alguna implicación en la entrega de grupos Fe-S a NifQ. Se ha comprobado que, aunque IscU y NifQ interaccionan, el principal donador de hierro a NifQ es NifU. En *A. vinelandii* existen dos puntos de interés conocidos en la homeostasis de hierro desde el punto de vista de la fijación del nitrógeno : bacterioferritina A (BfrA), proteína citosólica de almacenaje de este metal, y NifU. Con el objetivo de encontrar nuevas proteínas involucrada en el tráfico de hierro se realizó un ensayo *pull-down* usando estas dos proteínas junto con un extracto de *A. vinelandii* DJ. De entre todos los interactores obtenidos, glutarredoxina D (GrxD) fue un candidato prometedor porque interaccionaba con ambas. Diferentes ensayos de copurificación confirmaron que GrxD solo interacciona con la ferritina cuando BfrA se encuentra cargada de hierro y GrxD no tiene su grupo sulfoferrico, indicando una posible transferencia de hierro con una dirección BfrA-GrxD. Por otro lado, la interacción NifU-GrxD ocurría de forma independiente al estado metálico de las proteínas, aunque era más fuerte cuando únicamente una de las proteínas implicadas estaba reconstituida con sus grupos sulfoferricos. Por último, mutantes en los genes *grxD* y *bfrA* fijan, de forma significativa, menos nitrógeno que la cepa silvestre. Todos estos datos sugieren que GrxD es requerida para la actividad nitrogenasa, teniendo una función en el metabolismo de hierro.

Índice

Agradecimientos	v
Abstract	vii
Resumen	viii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tablas.....	xv
Abreviaturas y Acrónimos	xvii
INTRODUCCIÓN	1
1. IMPORTANCIA Y FORMAS DE FIJACIÓN DEL NITRÓGENO	3
2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO	4
3. GRUPOS SULFOFÉRRICOS	8
4. FORMACIÓN DE GRUPOS P-CLUSTER Y FEMO-CO	13
4.1 Formación del grupo P-cluster	13
4.2 Formación del grupo FeMo-co.....	13
5. TRANSPORTE Y ENTREGA DE HIERRO Y MOLIBDENO EN BACTERIAS DIAZOTROFAS DE VIDA LIBRE	15
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	27
1.1 Cepas bacterianas.....	27
1.1.1 Escherichia coli.....	27
1.1.2 Azotobacter vinelandii	27
2. MEDIOS DE CULTIVO	27
2.1 LB (Lysogeny Broth)	27
2.2 SOC (SOB medium containing glucose)	29
2.3 SOB (Super Optimal Broth)	29
2.4 TB (Terrific Broth)	29

2.5	CCMB80 (Buffer containing calcium (80 mM) and manganese-based)	30
2.6	Azotobacter vinelandii Burk`s modified medium	30
3.	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	31
3.1	Extracción de ADN plasmídico de bacterias	31
3.2	Recuperación de ADN de geles de agarosa/PCR	31
3.3	Cuantificación de ADN	32
3.4	Electroforesis.....	32
4.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	32
5.	CLONACIÓN.....	34
5.1	Vectores usados	34
5.2	Clonajes con enzimas de restricción: Ligación e <i>In-Fusion</i>	34
5.3	Clonajes realizados en esta tesis doctoral.....	35
5.3.1	Clonajes en <i>E. coli</i>	35
5.3.2	Clonajes en <i>A. vinelandii</i>	37
6.	TRANSFORMACIÓN.....	39
6.1	Transformación de células de <i>E.coli</i>	39
6.1.1	Preparación de células quimiocompetentes.....	39
6.1.2	Transformación de células quimiocompetentes (Choque térmico).....	40
6.1.3	Preparación de células electrocompetentes.....	40
6.1.4	Transformación de células electrocompetentes (Electroporación)	41
6.2	Transformación de células de <i>A. vinelandii</i>	41
7.	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE <i>E. COLI</i>	41
8.	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS DE <i>A. VINELANDII</i>	43
9.	ELIMINACIÓN GRUPOS SULFOFÉRRICOS	44
10.	RECONSTITUCIÓN DE LOS GRUPOS FE-S DE LAS PROTEÍNAS	44
11.	RECONSTITUCIÓN DE LA BACTERIOFERRITINA.....	45
12.	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	45
12.1.1	Espectroscopía de ultravioleta-visible (UV-Vis).....	45
12.1.2	Cuantificación de proteína	45

12.1.3	Cuantificación de hierro	46
13.	ENSAYOS DE COPURIFICACIÓN	47
14.	INMUNODETECCIÓN.....	48
14.1	SDS-PAGE	48
14.2	Tinción del gel de poliacrilamida	48
14.3	Transferencia de proteínas	48
14.4	Inmunodetección de proteínas.....	49
14.4.1	Proteínas conjugadas a un epítipo de Strep	49
14.4.2	Proteínas conjugadas a un epítipo de histidinas.....	49
14.4.3	Proteínas NifU, NifQ y NifDK	50
14.4.4	Deshibridación de anticuerpos de la membrana	50
15.	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD NITROGENASA EN <i>A. VINELANDII</i>.....	50
16.	BIOINFORMÁTICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
16.1.1	Búsqueda, comparación y análisis de secuencias	51
16.1.2	Diseño de oligonucleótidos	52
16.1.3	Comparación de secuencias y construcción del dendrograma	53
16.1.4	Análisis estadístico, realización de gráficas y diseño de figuras	55
RESULTADOS		57
1.	DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN DE ISCU EN EL PROCESO DE DONACIÓN DE GRUPOS SULFOFÉRRICOS A NIFQ.....	59
1.1	NifQ interacciona con IscU.....	59
1.2	NifU es el principal donador de grupos Fe-S a NifQ <i>in vivo</i>	61
2.	GRXD EN LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO.....	64
2.1	GrxD en el tráfico de hierro en <i>A. vinelandii</i>	64
2.2	Glutarredoxinas en <i>A. vinelandii</i> DJ	64
2.3	GrxD interacciona con la proteína BfrA.....	67
2.4	GrxD interacciona con la proteína NifU	68
2.5	Caracterización de la interacción GrxD-NifU	72
2.6	Grx5 interacciona con la proteína IscU	77

2.7	GrxD es necesaria para una óptima actividad nitrogenasa	79
2.7.1	El gen AvgrxD es preciso para una idónea actividad nitrogenasa.....	79
2.7.2	El fenotipo del mutante MGGAV2 es debido a la delección de gen grxD.....	80
2.7.3	Los genes grxD y bfrA parecen intervenir en la misma ruta en la actividad nitrogenasa	81
DISCUSIÓN.....		85
CONCLUSIONES.....		97
REFERENCIAS.....		101

Lista de Figuras

Figura 1. Vías de fijación de nitrógeno.....	3
Figura 2. Esquema representativo de los cofactores metálicos característicos de los tres tipos de nitrogenasa.....	5
Figura 3. Nitrogenasa de molibdeno y sus grupos metálicos	7
Figura 4. Biogénesis general de los grupos sulfoferricos	9
Figura 5. Esquema del tránsito de grupos Fe-S para la síntesis de la nitrogenasa	11
Figura 6. Estructura modular de AvNifU	12
Figura 7. Modelo esquemático de la formación de los grupos P-clusters	13
Figura 8. Modelos esquemático de la ruta de biosíntesis del grupo FeMo-co.....	14
Figura 9. Homeostasis de hierro y molibdeno en <i>A. vinelandii</i> hasta llegar a la nitrogenasa	16
Figura 10. Mecanismo de entrada de molibdato y hierro en las proteínas MoSto y bacterioferritina	19
Figura 11. Esquema de la posición de NifU y NifS en el plásmido pRHB612	36
Figura 12. Esquema del proceso de delección del gen <i>grxD</i> en <i>A. vinelandii</i>	37
Figura 13. Esquema del proceso de inserción del gen <i>grxD</i> en el mutante MGGAV2.....	38
Figura 14. Esquema de la generación del doble mutante MGGAV6.....	39
Figura 15. Ensayos de copurificación	48
Figura 16. Esquema representativo del ensayo de actividad nitrogenasa dependiente de la concentración de hierro en el medio de cultivo	51
Figura 17. NifQ _H e IscU _S coeluyen al ser expresadas de forma simultánea.....	60
Figura 18. R-IscU _S interacciona con apo-NifQ _H	61
Figura 19. _H NifQ se expresa en condiciones diazotróficas en MGGAV1	62
Figura 20. Purificación de NifQ _H de UW300 y MGGAV1	63
Figura 21. Entorno genético de las glutarredoxinas en <i>A. vinelandii</i>	65
Figura 22. Estructura y homología de las glutarredoxinas existentes en <i>A. vinelandii</i>	66
Figura 23. Dendograma de las glutarredoxinas encontradas en <i>A. vinelandii</i>	67
Figura 24. R- _S BfrA interacciona con apo- _H GrxD	69
Figura 25. Las proteínas GrxD y NifU interaccionan independientemente de su contenido de hierro	70
Figura 26. Comparación de la interacción GrxD-NifU en función del estado metálico de cada una....	71

Figura 27. Las proteínas ${}_S$ NifU y ${}_H$ GrxD interaccionan.....	71
Figura 28. GrxD interacciona con Δ N-NifU y Δ C-NifU	73
Figura 29. GrxD no interacciona con el dominio central de la proteína NifU.....	74
Figura 30. La proteína R-GrxD _s interacciona con el mutante AS- ${}_H$ C _{35,62,106,272,275} A-NifU.....	75
Figura 31. La proteína GrxD no interacciona con los dominios N y C de la proteína NifU de forma individual	76
Figura 32. Reconstitución de los mutantes de NifU.....	77
Figura 33. R-IscU _s interacciona con apo- ${}_H$ GrxD y R- ${}_H$ GrxD	78
Figura 34. El mutante MGGAV2 tiene afectada su actividad nitrogenasa.....	80
Figura 35. Ensayo de actividad nitrogenasa con las cepas DJ y los mutantes MGGAV2, MGGAV3 y MGGAV4.....	82
Figura 36. Los genes <i>grxD</i> y <i>bfrA</i> podrían estar actuando en la misma vía de donación de hierro a la nitrogenasa.....	83
Figura 37. Modelo propuesto como ruta de donación de hierro a la nitrogenasa	91
Figura 37. Modelo propuesto como ruta de donación de hierro a la nitrogenasa	37

Lista de Tablas

Tabla 1. Genes de <i>A. vinelandii</i> involucrados en la fijación de N ₂ dependiente de molibdeno y la función de sus productos	6
Tabla 2. Cepas de <i>E.coli</i> usadas en esta Tesis Doctoral.....	27
Tabla 3. Cepas de <i>A. vinelandii</i> utilizadas en esta Tesis Doctoral	28
Tabla 4. Composición LB	28
Tabla 5. Composición SOC.....	29
Tabla 6. Composición SOB	29
Tabla 7. Composición TB.....	30
Tabla 8. Composición CCMB80	30
Tabla 9. Composición medio Burk	31
Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis Doctoral.....	33
Tabla 11. Vectores usados en los clonajes de esta Tesis Doctoral.....	34
Tabla 12. Mutantes de NifU usados en esta Tesis Doctoral.....	36
Tabla 13. Protocolo atomización de hierro.....	46
Tabla 14. Secuencias de proteínas empleadas en esta Tesis Doctoral	52
Tabla 15. Códigos de las proteínas empleadas en el dendograma.....	53
Tabla 16. Genes de las glutarredoxinas en <i>A. vinelandii</i>	64
Tabla 17. Resumen de los ensayos de interacción con la proteína GrxD realizados en una columna Strep-tactin.....	79

Abreviaturas y Acrónimos

ABC	Casete de union a ATP; del inglés <i>ATP binding cassette</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN codificante
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
Atm	Atmósferas
ATP	Adenosina trifosfato
Av	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Bfr	Bacterioferritina
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local; del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Cisteína
CFE	Extracto libre de células; del inglés <i>cell free extract</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	Del inglés <i>Column Volume</i>
Cys	Cisteína
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
Dps	Mini-ferritina
DTH	Ditionito sódico
DTT	Ditiotreitol
E	Elución
ECL	Quimioluminiscencia mejorada; del inglés <i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBN	Fijación Biológica del Nitrógeno
Fdx	Ferredoxina
Fe ²⁺	Hierro ferroso
Fe ³⁺	Hierro férrico
FeFe-co	Cofactor de solo hierro
FeMo-co	Cofactor de hierro y molibdeno
Fe-S	Grupo sulfoférrico
FeV-co	Cofactor de hierro y vanadio

FRO	Quelato férrico reductasa oxidasa; del inglés <i>Ferric-chelate Reductase Oxidase</i>
FSN	Fijación Simbiótica del Nitrógeno
FT	Flujo continuo; del inglés <i>flowthrough</i>
Ftn	Ferritina
Glrx	Glutarredoxina
Gm	Gentamicina
GR	Glutación reductasa
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutación
H	Histidina
His	Histidina
HRP	Peroxidasa de rábano
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
ISC	Del inglés <i>Iron-Sulfur Cluster</i>
Km	Kanamicina
LB	Caldo de lisogenia; del inglés <i>Lysogeny Broth</i>
Leu	Leucina
m.e.	Membrana externa
m.i.	Membrana interna
MFS	Del inglés <i>Major Facilitator Superfamily</i>
MoO ₄ ²⁻	Molibdato
MOPS	Ácido 3- (N-morfolino) propanosulfónico; del inglés <i>3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid</i>
N ₂ O	Óxido de dinitrógeno
NA	Niacotianamina
naf	Del inglés <i>Nitrogenase associated factors</i>
NAS	NA sintasa
NH ₃	Amoniaco
NH ₄ ⁺	Amonio
NIF	Fijación de nitrógeno; del inglés <i>Nitrogen Fixation</i>
NO	Óxido de nitrógeno
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
Nramp	Del inglés <i>Natural Resistance-Associated Macrophage Protein</i>
OD _x	Densidad óptica a x nm
p/v	Peso/volumen
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino; del inglés <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCBP	Del inglés poly r(C)-binding proteins
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa; del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pi	Fósforo inorgánico
PLP	Piridoxal fosfato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POM	Polioxometalato
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
R	Proteína reconstituida
Rif	Rifampicina
ROS	Especies reactivas de oxígeno; del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Revoluciones por minuto
S	Strep
S ₂ ⁻	Ion sulfide
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Dodecilsulfato sódico- gel de electroforesis de poliacrilamida
SOB	Caldo superóptimo; del inglés <i>Super Optimal Broth</i>
SUF	Mobilización de azufre; del inglés <i>Sulfur mobilization</i>
TB	Caldo excelente; del inglés <i>Terrific Broth</i>
TBDT	Transportador dependiente de TonB; del inglés <i>TonB-dependent transporter</i>
TBE	Tris-Bórico-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina
Trx	Tiorredoxina
UV-visible	Ultravioleta-visible
v/v	Volumen/volumen
W	Lavado; del inglés <i>wash</i>
ZIP	Del inglés ZRT1, IRT1-like protein

Introducción

1. IMPORTANCIA Y FORMAS DE FIJACIÓN DEL NITRÓGENO

El nitrógeno (N), en su forma molecular (N_2), es el elemento más abundante en la atmósfera terrestre, representando casi un 80 % de los gases que la conforman (Holland, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Es un componente esencial en muchas biomoléculas, entre ellas ácidos nucleicos y proteínas. Por ello, es imprescindible para el crecimiento de plantas y la productividad de los ecosistemas (Hirsch & Mauchline, 2015). Sin embargo, el N es uno de los nutrientes limitantes en la biosfera ya que la mayoría de los seres vivos no pueden usar directamente N_2 (Xuan *et al.*, 2017). Las plantas, por ejemplo, lo asimilan preferentemente en forma de amonio (NH_4^+) o de nitrato (NO_3^-) (Maathuis, 2009).

La conversión de N_2 en NH_3 , la fijación del nitrógeno, es esencial en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Es un proceso con un alto coste energético (960 kJ por mol de N_2 en condiciones estándar) en el que debe romperse el triple enlace covalente del N_2 (Sprent & Raven, 1985). Existen tres vías para fijar nitrógeno: eventos geológicos y atmosféricos (relámpagos y volcanes), fijación industrial por el proceso de Haber-Bosch y la fijación biológica (Smil, 2004; Fowler *et al.*, 2013) (Fig. 1). De todas ellas, un 3 % se corresponde con un origen geoquímico, mientras que el 32 % es producido biológicamente y un 65 % tiene origen industrial (Smil, 2004; Gruber & Galloway, 2008; Galloway *et al.*, 2021).

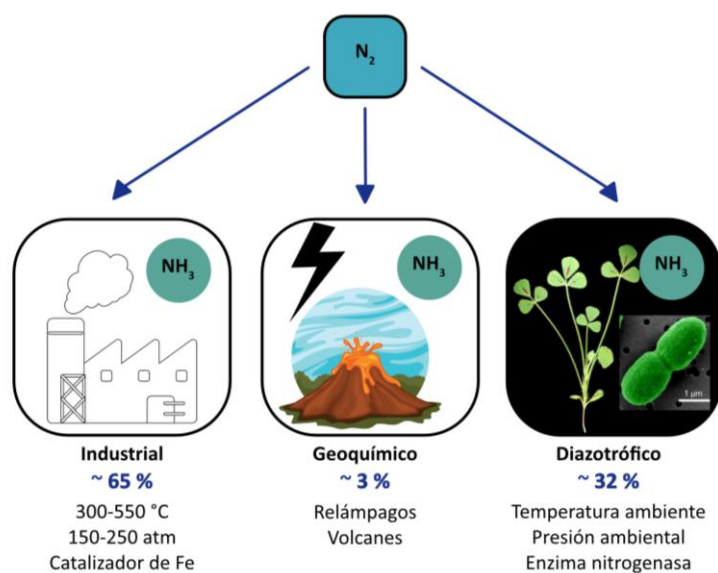


Figura 1. Vías de fijación de nitrógeno. Representación esquemática de las tres mayores fuentes de nitrógeno fijado en la biosfera.

2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es mediada por la metaloenzima nitrogenasa. Se requiere la hidrólisis de 16 moléculas de ATP, la transferencia de 8 electrones y la presencia de grupos sulfoferricos en la estructura de la nitrogenasa para la reducción de una molécula de N_2 a dos de NH_3 (Canfield *et al.* 2010, Dos Santos *et al.*, 2012). Así, la reacción catalizada se puede representar como:



Todos los organismos diazotrofos (los que pueden fijar nitrógeno) son bacterias o arqueas (Postgate, 1981; Raymond *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2012; Boyd & Peters, 2013). Pueden clasificarse dependiendo de si la fijación la hacen en vida libre o cuando están asociados a otros organismos. Entre las bacterias de vida libre se encuentran *Azotobacter vinelandii* (Strand & Wilson, 1968) y algunas cianobacterias como *Oscillatoria* o *Nostoc* (Carpenter & Price, 1976; Fay, 1992; Kumar *et al.*, 2010). En el otro lado, se encuentran las bacterias que establecen una simbiosis con eucariotas, realizando lo que se conoce como fijación simbiótica del nitrógeno (FSN) (Kneip *et al.*, 2007). Una de la simbiosis mejor descritas y con mayor relevancia a nivel agroambiental es la que se produce entre ciertas bacterias del suelo conocidas como rizobios y las leguminosas (Oldroyd, 2013; Downie, 2014).

La metaloenzima nitrogenasa está compuesta por dos subunidades que contienen tres cofactores metálicos distintos que otorgan a la nitrogenasa la capacidad de catalizar la conversión de N_2 a NH_3 . Existen 3 clases de nitrogenasas con una composición de subunidades y estructura de cofactores similares (Eady, 1996; Seefeldt *et al.*, 2009): nitrogenasa de molibdeno (Mo-nitrogenasa), nitrogenasa de vanadio (V-nitrogenasa) y nitrogenasa de hierro (solo-Fe nitrogenasa) (Chisnell *et al.*, 1988; Rubio & Ludden, 2005; Rees *et al.*, 2015). De todas ellas, la Mo-nitrogenasa es la más abundante en la naturaleza y la más eficiente en la conversión de N_2 en NH_3 (Martin del Campo *et al.*, 2022). Sin embargo, aunque la mayoría de los organismos diazotrofos solo tienen esta metaloenzima, algunos también son capaces de sintetizar las nitrogenasas alternativas de vanadio y hierro, como es el caso de *A. vinelandii* (Bishop & Joerger, 1990; Mus *et al.*, 2018). Cada una de estas metaloenzimas tiene un grupo metálico diferente en su sitio activo (Fig. 2): FeMo-co (Mo-nitrogenasa), FeFe-co (solo-Fe nitrogenasa) y FeV-co (V-nitrogenasa). La regulación de la expresión de la nitrogenasa en bacterias que poseen las formas alternativas depende de la disponibilidad de molibdeno, vanadio y hierro en el medio (Klipp *et al.*, 2004).

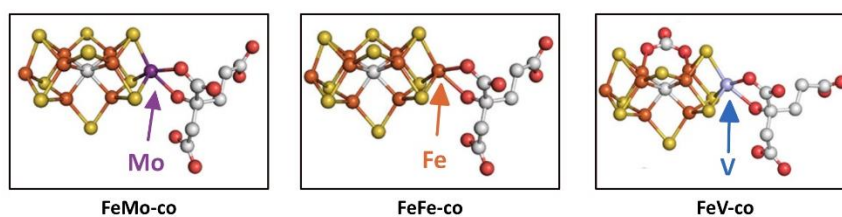


Figura 2. Representación de los cofactores metálicos característicos de los tres tipos de nitrogenasa. El grupo FeMo-co pertenece a la nitrogenasa de molibdeno, el grupo FeFe-co a la solo-Fe nitrogenasa y el grupo FeV-co a la nitrogenasa de vanadio.

La nitrogenasa de molibdeno ha sido la más estudiada por ser la más universal (Dos Santos *et al.*, 2012; Addo & Dos Santos, 2020). La nomenclatura original para los genes relacionados con la fijación del nitrógeno se estableció usando como modelo experimental *Klebsiella oxytoca*. Estos genes, organizados en diferentes unidades transcripcionales, se designaron como genes *nif* (*n*itrogen *f*ixation) (Arnold *et al.*, 1988). Posteriormente, en *A. vinelandii* se encontraron genes ortólogos que adquirieron la misma nomenclatura, organizados en dos grupos (Joerger *et al.*, 1988; Jacobson *et al.*, 1989; Setubal *et al.*, 2009). Otros genes de *A. vinelandii*, localizados en los dos principales grupos, se denominan *naf* (*n*itrogenase *a*ssociated *f*actors) (Rubio *et al.*, 2002). En la Tabla 1 se encuentran los genes *nif* y *naf* que se mencionan en esta Tesis Doctoral.

La nitrogenasa de molibdeno es una enzima formada por dos metaloproteínas que interaccionan entre ellas: NifDK (también llamada componente I, dinitrogenasa o proteína MoFe) y NifH (conocida como componente II, dinitrogenasa reductasa o proteína Fe) (Bulen & LeComte, 1966) (Fig. 3A). Esta nitrogenasa requiere de tres grupos sulfoferricos para su actividad catalítica: grupos 4Fe-4S, P-cluster (8Fe-7S) y FeMo-co (7Fe-Mo-9S-C-homocitrato) (Shah & Brill, 1977; Kim & Rees, 1992; Spatzal *et al.*, 2011; Burén *et al.*, 2020) (Fig. 3B). NifDK está formada por dos dímeros con estructura $\alpha\beta$ formando un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ de 230 kDa (Kim & Rees, 1992; Einsle, 2014). Esta metaloproteína une un P-cluster en cada uno de los dos puntos de contacto entre NifD y NifK y un grupo FeMo-co en el sitio activo dentro de cada subunidad NifD. NifH es un homodímero de 64 kDa que coordina un grupo 4Fe-4S entre ambas subunidades (Georgiadis *et al.*, 1992). NifH es responsable de donar electrones a NifDK para la reducción del N_2 en NH_3 y participa en la formación de los P-clusters con NifDK (Allen *et al.*, 1993; Rangaraj *et al.*, 1997) y en la biosíntesis de FeMo-co (Rangaraj *et al.*, 1997,1999; Hu *et al.*, 2005; Soboh *et al.*, 2006; Curatti *et al.*, 2007). En la Figura 4 se encuentran representadas cada una de las subunidades y sus grupos metálicos.

Tabla 1. Genes de *A. vinelandii* involucrados en la fijación de N₂ dependiente de molibdeno y la función de sus productos mencionados en esta Tesis Doctoral.

Gen	Identificación/ Función
<i>nafH</i>	Unido a NifDK antes de la maduración de los P-clusters.
<i>nafY</i>	Estabiliza a la proteína apo-MoFe antes de la incorporación de FeMo-co y une específicamente FeMo-co.
<i>nifB</i>	Esencial para la síntesis de FeMo-co. Cataliza la formación de NifB-co (primer paso en la biosíntesis de FeMo-co).
<i>nifD</i>	Subunidad α de la proteína MoFe. Subunidad donde se une FeMo-co. Forma un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ con NifK.
<i>nifE</i>	Proteína andamio para la maduración del grupo NifB-Co en FeMo-co. Forma un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ con NifN.
<i>nifH</i>	Proteína Fe. Donante de electrones a la proteína MoFe. También es requerida para la biosíntesis de FeMo-co y la maduración de apo-MoFe.
<i>nifK</i>	Subunidad β de la proteína MoFe. Forma un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ con NifD.
<i>nifN</i>	Proteína andamio para la maduración del grupo NifB-Co en FeMo-co. Forma un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ con NifE.
<i>nifQ</i>	Procesa el Mo antes de su incorporación en FeMo-co.
<i>nifS</i>	Cisteína desulfurasa que moviliza el azufre para la formación de los grupos Fe-S en NifU.
<i>nifU</i>	Entrega los precursores de los grupos Fe-S para las proteínas de la nitrogenasa y sus cofactores.
<i>nifV</i>	Síntesis de homocitrato. Está involucrada en la síntesis del grupo FeMo-co.
<i>nifW</i>	Asociado a NifDK antes de la maduración de los P-clusters.
<i>nifX</i>	Une los grupos NifB-co y VK-cluster. Interacciona con NifEN. Posible donante de los precursores de FeMo-co.
<i>nifZ</i>	Involucrado en la maduración de los P-clusters junto con NifH.

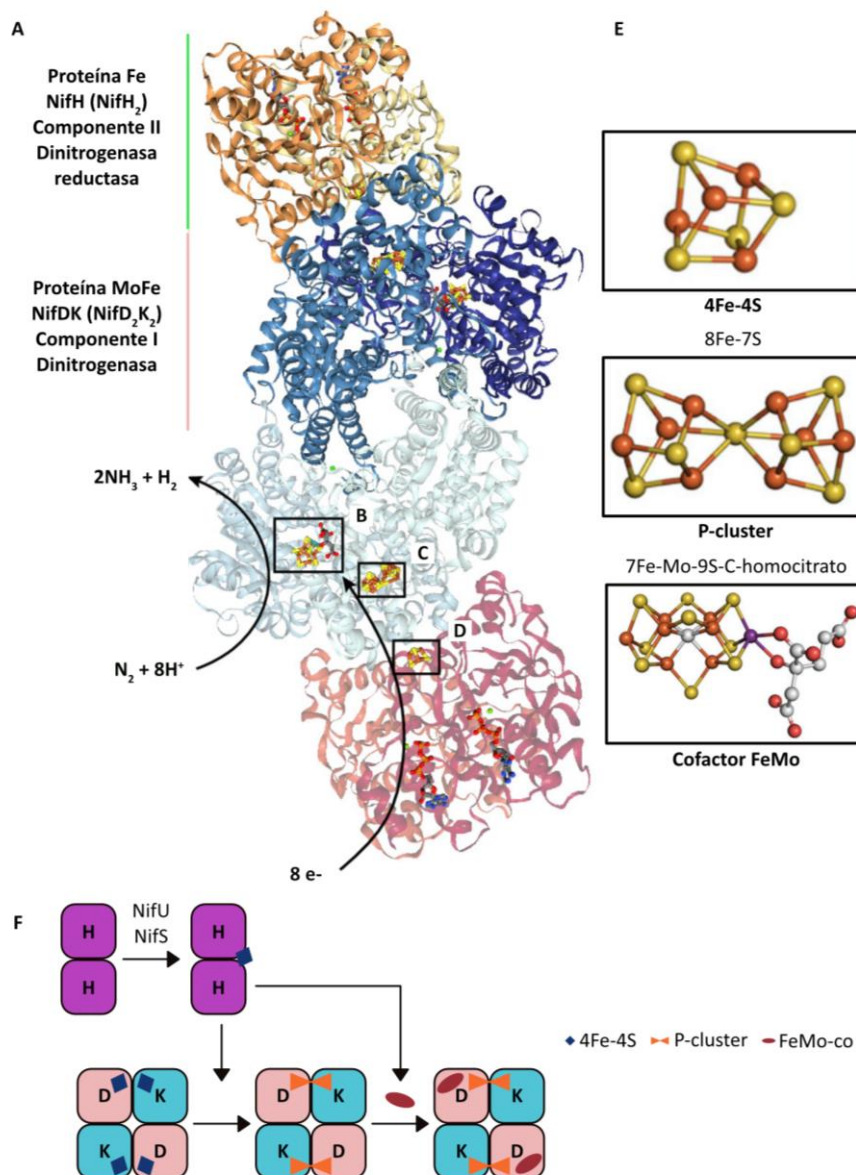


Figura 3. Nitrogenasa de molibdeno y sus grupos metálicos. **A.** Estructura secundaria de la nitrogenasa de molibdeno donde se observa sus dos subunidades catalíticas y las nomenclaturas más usadas para referirse a las mismas. La designación de proteína Fe y proteína MoFe se refieren a la composición de los cofactores asociados a ambas subunidades. La nomenclatura NifH (o NifH₂) y NifDK (o NifD₂K₂) se basa en los genes que codifican para la proteína Fe (*nifH*) y la proteína MoFe (*nifDK*) respectivamente. La denominación de componente I y componente II está basada en el orden de elución en una cromatografía de intercambio iónico (Bulen & LeComte, 1966). Dinitrogenasa reductasa y dinitrogenasa es la nomenclatura usada para indicar que, durante la catálisis, la proteína Fe es una reductasa que dona los electrones a la proteína MoFe, que alberga el lugar para la reducción de N₂ (Emericht & Burris, 1978). En la parte derecha se ha aplicado una semitransparencia en las cadenas polipeptídicas para visualizar los grupos metálicos: FeMo-co (**B**), P-cluster (**C**) y 4Fe-4S (**D**). **E.** Grupos metálicos que componen la nitrogenasa de molibdeno. Cada elemento está representado con un color diferente: hierro (naranja), azufre (amarillo), molibdeno (morado), oxígeno (rojo) y carbono (gris). **F.** En el esquema se observan los grupos metálicos 4Fe-4S, P-cluster y FeMo-co en cada una de las subunidades que forman NifH y NifDK. Cada letra hace referencia a una subunidad: NifH (H), NifD (D) y NifK (K).

3. GRUPOS SULFOFÉRRICOS

Los grupos sulfoferricos (Fe-S) son ensamblados moleculares formados por hierro y azufre (Braymer *et al.*, 2021). Las estequiometrías más comunes son 2Fe-2S, 4Fe-4S y 3Fe-4S (Beinert *et al.*, 1997). Se estima que entre el 1-5% del genoma de organismos procariotas codifica proteínas que contienen grupos Fe-S (Andreini *et al.*, 2017) que participan en la respiración celular, fotosíntesis, síntesis y reparación de ADN, traducción de proteínas, defensa antiviral y fijación de nitrógeno entre otros (Lill & Freibert, 2020; Burén *et al.*, 2020).

Se conocen tres sistemas para la biogénesis y ensamblaje de los grupos sulfoferricos: ISC (*iron-sulfur cluster assembly*), SUF (*sulfur mobilization*) y NIF (*nitrogen fixation*). Los sistemas ISC y SUF son los mecanismos básicos de síntesis de grupos Fe-S, mientras que el NIF es específico de organismos diazotrofos (Fig. 4). La síntesis de grupos Fe-S se realiza sobre una proteína andamio (IscU o SufB). De forma secuencial, se van añadiendo los iones sulfuro y de hierro hasta formar un grupo 2Fe-2S. En ambos sistemas, el donante de azufre pertenece a la familia de cisteínas desulfurasas dependientes de piridoxal fosfato (PLP). En el sistema ISC es llevado a cabo por la proteína IscS (Black & Dos Santos, 2015), mientras que en el sistema SUF el subcomplejo SufSE es el donador de azufre para la formación de los grupos Fe-S (Outten *et al.*, 2003). La proteína SufS actúa como una cisteína desulfurasa, ayudada por SufE (Loiseau *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003). En esta desulfuración se produce alanina y un átomo de azufre elemental (S⁰) que es transferido a la proteína andamio para formar el grupo sulfoferrico (Shi *et al.*, 2010; Marinoni *et al.*, 2012; Boniecki *et al.*, 2017; Fox *et al.*, 2019). En contraste, el donante de hierro para la síntesis de grupos Fe-S es desconocido hasta el momento.

Los grupos Fe-S contruidos sobre la proteína andamio se transfieren a otras proteínas, bien de forma directa, como en el caso de la aconitasa (Unciuleac *et al.*, 2007), o bien a través de otras proteínas intermediarias denominadas *carriers* (Esquilin-Lebron *et al.*, 2021). El número de *carriers* en bacterias varía dependiendo de la especie estudiada. En *E. coli*, por ejemplo, se han identificado 6 proteínas *carriers*: IscA, SufA, ErpA, NfuA, GrxD y Mrp (Tan *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2011; Py *et al.*, 2018; Burschel *et al.*, 2019). Otras bacterias, por el contrario, como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, solo tienen dos *carriers* caracterizados: SufA y NfuA (Esquilin-Lebron *et al.*, 2021).

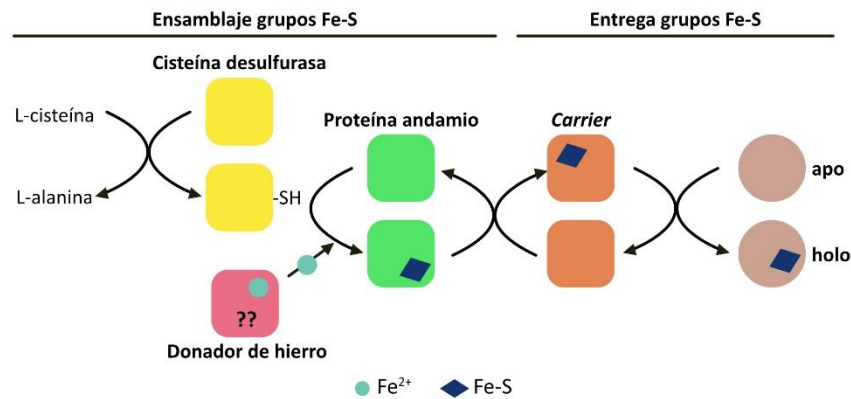


Figura 4. Biogénesis general de los grupos sulfoférricos. Los grupos Fe-S se ensamblan sobre una proteína andamio, que recibe el azufre desde una cisteína desulfurasa y un hierro desde un donador desconocido. A continuación, los grupos Fe-S son transferidos a una apo-proteína directamente o a través de una proteína *carrier*. Imagen modificada de Roche *et al.* (2013).

IscA es una proteína no esencial codificada dentro del operón ISC. IscA podría actuar, además de *carrier*, como una proteína andamio alternativa en el ensamblaje de los grupos Fe-S (Ollagnier-De-Choudens *et al.*, 2001; Krebs *et al.*, 2001) o como donador de hierro para el ensamblaje de los mismos, aunque esta última función no está ampliamente admitida (Ding *et al.*, 2004). Otra proteína que participa en la entrega de los grupos sulfoférricos formados en IscU es NfuA (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). NfuA es una proteína modular con dos dominios, siendo el N-terminal homólogo a IscA. Sin embargo, los tres residuos de cisteína de IscA, fundamentales para su función (Johnson *et al.*, 2006), no se encuentran en el dominio N-terminal de NfuA. Aunque NfuA no es esencial para la maduración de proteínas sulfoférricas; su pérdida produce una menor actividad de la aconitasa, enzima que contiene un grupo 4Fe-4S (Py *et al.*, 2012). Además, NfuA podría cooperar con GrxD en la maduración de la enzima MiaB (Boutigny *et al.*, 2013). El hecho de que NfuA sea dispensable indica que la proteína IscU es capaz de transferir los grupos sulfoférricos a otras proteínas, al igual que en otros organismos, como la anteriormente mencionada IscA (Krebs *et al.*, 2001; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004; Abdel-Ghany *et al.*, 2005; Morimoto *et al.*, 2006) o glutaredoxinas (Rodríguez-Manzanique *et al.*, 2002; Lillig *et al.*, 2005; Rouhier *et al.*, 2007).

Las glutaredoxinas (Grxs), junto con las tiorredoxinas (Trxs), forman parte de la familia de las tiol oxidoreductasas, cuya principal función es controlar el estado redox celular (Couturier *et al.*, 2015). Así, las Grxs son pequeñas enzimas redox capaces de usar el glutatión (GSH) como reductor, el cual se mantiene reducido por la enzima glutatión reductasa (GR) y NADPH (Lillig *et al.*, 2008). La primera glutaredoxina fue descubierta en *E. coli* (Holmgren, 1976) y desde entonces se han encontrado en arqueas, bacterias y eucariotas (Vilella *et al.*, 2004; Xing *et al.*,

2006; Couturier *et al.*, 2009; Mondal *et al.*, 2020). Participan en la regulación del desarrollo (Xing & Zachgo, 2008; Hofmann, 2009), metabolismo (Alloing *et al.*, 2018), respuesta a estrés (Kapoor *et al.*, 2015) y adaptación ambiental (Wu *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2017). Este papel se debe a su actividad tiol-transferasa y su participación en la homeostasis de hierro entre otras (Fernandes, 2004; Prigge *et al.*, 2017). Su importancia se refleja, por ejemplo, en su implicación en enfermedades cardíacas (Adluri *et al.*, 2012; Behring *et al.*, 2014), desarrollo de cáncer (Wells *et al.*, 1991) y funcionamiento del sistema nervioso central (Ren *et al.*, 2017).

De forma general, las glutarredoxinas se pueden clasificar en ditiol (motivo CPY/FC) (clase I) o monotiol (motivo CGFS) (clase II) en base a la secuencia de su sitio activo (Rodríguez *et al.*, 1999; Couturier *et al.*, 2009). En general, todas las Grxs de la clase II tienen la capacidad de unir grupos Fe-S en su motivo CGFS (Couturier *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2009), aunque también pueden participar en la reparación de los grupos sulfoferricos (Zhang *et al.*, 2013; Boutigny *et al.*, 2013).

Las glutarredoxinas transfieren grupos 2Fe-2S a ferredoxinas (Fdx) (Wang *et al.*, 2012).. Esta transferencia de grupos sulfoferricos desde Grxs a Fdxs también se ha observado en *E. coli* (Yeung *et al.*, 2011), donde además GrxD puede formar un heterodímero con la proteína BOLA (Feng *et al.*, 2006; Hider & Kong, 2011) sin perder su capacidad de transferir su grupo Fe-S a Fdx (Yeung *et al.*, 2011). El complejo Grx-BOLA se ha estudiado en organismos como *S. cerevisiae*, *A. thaliana* y *Homo sapiens*, sugiriendo que podría ser un evento común a casi todos los organismos, aunque no se conoce en detalle la función de dicho complejo (Ito *et al.*, 2000; Kumánovics *et al.*, 2008; Li & Outten, 2012; Qin *et al.*, 2015; Rev *et al.*, 2019).

En la transformación de dos grupos 2Fe-2S en un grupo más complejo, como puede ser el 4Fe-4S, es necesaria una fuente de electrones (Cai *et al.*, 2017; Mendel *et al.*, 2020). Las ferredoxinas intervienen en reacciones de oxidoreducción, siendo las proteínas donadoras de electrones en procesos metabólicos esenciales como la fotosíntesis, biosíntesis de grupos Fe-S, metabolismo del carbono, síntesis de hormonas esteroideas o fijación de nitrógeno (Buchanan & Arnon, 1979; Cejudo *et al.*, 2021; Hall & Evans, 1969; Hall *et al.*, 1971; Zheng *et al.*, 1998). Son proteínas pequeñas, con un peso molecular entre 6-12 KDa, que contienen a su vez uno o dos grupos sulfoferricos (Hall *et al.*, 1971; Yoch & Carithers, 1979). Las bacterias suelen codificar varias Fdxs. Por ejemplo, las α -proteobacterias pueden tener hasta 12 Fdxs, mientras que las Firmicutes pueden llegar a tener 20 (Nzuza *et al.*, 2021). El genoma de *A. vinelandii* codifica 15 (Setubal *et al.*, 2009). De todas ellas, una de las más estudiadas ha sido FdxN, ya que se encuentra en el mismo operón que otros genes implicados en la nitrogenasa como nifB o nifQ

(Rodríguez-Quiñones *et al.*, 1993). Se ha propuesto que FdxN es la donadora de electrones para la biosíntesis de la nitrogenasa, y su función sería aportar los electrones necesarios para la formación del cofactor NifB-co (Jiménez-Vicente *et al.*, 2014; Burén *et al.*, 2019). Otra ferredoxina de interés es la encontrada en el operón del ensamblaje de los grupos sulfoferricos ISC (Zheng *et al.*, 1998). Aunque esta Fdx no está caracterizada en *A. vinelandii*, sí se ha visto que está relacionada con el sistema ISC en *E. coli*, donde también comparten operón. Fdx^{isc} cede los electrones necesarios a IscS para reducir el S⁰ a S²⁻, imprescindible para el ensamblaje de los grupos Fe-S en IscU (Kim *et al.*, 2013).

La nitrogenasa puede llegar a representar el 5-10% de la proteína soluble de un organismo diazotrofo (Jacobs *et al.*, 1995; Zheng & Dos Santos, 2018). Esta enzima tiene 38 átomos de hierro procedentes de los dos grupos FeMo-co, dos P-clusters, y dos grupos 4Fe-4S (Martin del Campo *et al.*, 2023). Además, muchas de las proteínas implicadas en la biosíntesis de los cofactores de la nitrogenasa son, a su vez, proteínas sulfoferricas (Burén *et al.*, 2020; Martin del Campo *et al.*, 2023). Esta alta necesidad de síntesis de grupos Fe-S en los organismos diazotrofos ha resultado en el desarrollo de un sistema especializado en grupos sulfoferricos destinados a la fijación biológica del nitrógeno. Así, la bacteria diazotrofa modelo *A. vinelandii*, objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, además del sistema ISC, posee el sistema NIF. En este sistema se encuentran NifS, como cisteína desulfurasa, y NifU como proteína andamio. Como se observa en la Figura 5, todos los grupos sulfoferricos llegan de forma directa, o indirecta, desde NifU, convirtiéndose en el punto de partida para la entrega de grupos Fe-S destinadas a la nitrogenasa.

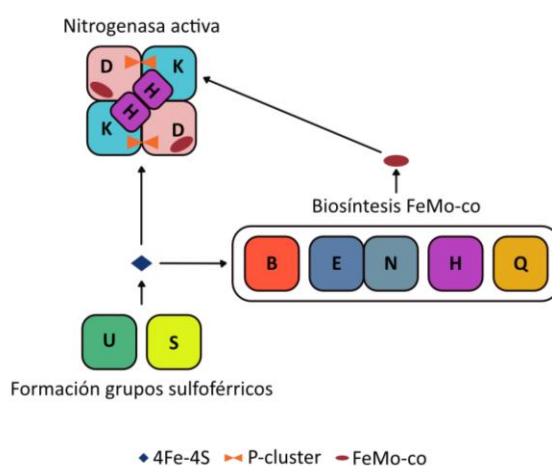


Figura 5. Esquema del tránsito de grupos Fe-S para la síntesis de la nitrogenasa. Los grupos sulfoferricos se generan en la proteína andamio NifU, donde NifS aporta el azufre. A continuación, estos centros sulfoferricos son entregados a NifB, NifEN, NifQ, NifH y NifDK. Imagen adaptada de Burén *et al.* (2020). Cada letra hace referencia a una proteína diferente: NifU (U), NifS (S), NifH (H), NifD (D), NifK (K), NifB (B), NifE (E), NifN (N) y NifQ (Q).

NifU es una proteína dimérica cuya principal función es la formación de los precursores de los grupos sulfoferricos para las proteínas de la nitrogenasa y sus cofactores (Agar *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005). Como se representa en la Figura 6, la NifU de *A. vinelandii* es una proteína modular con 9 residuos conservados de cisteínas distribuidas a lo largo de sus tres dominios: un dominio N terminal similar a IscU, un dominio central similar a Fdx y un dominio C similar a NfuA (Fu *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1998; Agar *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2003).

El dominio N-terminal funciona como la proteína andamio IscU. Aunque se desconoce el mecanismo de entrega de hierro a NifU, sí se ha demostrado que los grupos iniciales 2Fe-2S se ensamblan en el dominio N-terminal. Al igual que IscU, contiene tres residuos de cisteínas que proveen el sitio para el ensamblaje del grupo sulfoferrico (Zheng *et al.*, 1998; Agar *et al.*, 2000). Este grupo se forma con el azufre donado por NifS, un homólogo de IscS (Yuvaniyama *et al.*, 2000). Posteriormente, los dos grupos 2Fe-2S del dominio N-terminal de cada monómero se fusionan para formar un único grupo 4Fe-4S (Smith *et al.*, 2005). La formación de este grupo sulfoferrico más complejo requiere de electrones que podrían ser obtenidos por la actividad reductasa del dominio central. El modelo actual de funcionamiento de NifU propone que el grupo 4Fe-4S es, a continuación, transferido al dominio C-terminal (Smith *et al.*, 2005).

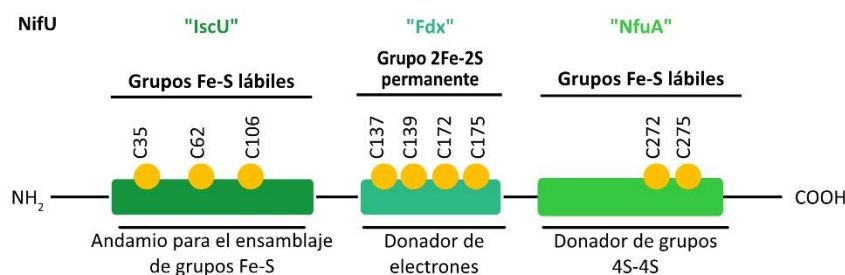


Figura 6. Estructura modular de AvNifU. En la imagen se representan los 3 dominios presentes en la proteína NifU junto con los residuos de cisteínas en color amarillo. Entre comillas aparece la proteína con la que tienen homología cada uno de estos dominios. Imagen adaptada de Burén *et al.* (2020).

La pérdida de función de NifU produce una disminución en el crecimiento diazotrófico, pero no su absoluta eliminación. Esto sugiere que otras proteínas, como las implicadas en el sistema ISC, podrían suplantar su función. Se ha demostrado que el crecimiento diazotrófico en el mutante *nifU* de *A. vinelandii* es reestablecido de forma parcial por la sobreexpresión de IscU (Dos Santos *et al.*, 2007). De forma paralela, al eliminar el gen *iscU* se observa que su función puede ser rescatada por NifU cuando las condiciones de oxígeno son bajas (Dos Santos *et al.*, 2007). Por el contrario, las funciones de NifS e IscS no son intercambiables (Dos Santos *et al.*,

2007). El hecho de que los sistemas NIF e ISC en *A. vinelandii* no sean totalmente reemplazables indica que existe una alta especificidad en la biosíntesis de los grupos Fe-S, siendo NifU la principal responsable de la maduración de grupos Fe-S destinados a la nitrogenasa (Dos Santos *et al.*, 2007).

4. FORMACIÓN DE GRUPOS P-CUSTER Y FEMO-CO

4.1 Formación del grupo P-cluster

Los P-clusters se ensamblan en NifDK por la fusión de dos grupos 4Fe-4S (Hu *et al.*, 2008) que podrían ser entregados por NifU (Fig. 7) (Agar *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005). Los electrones necesarios para la fusión de los grupos sulfoferricos son transferidos por NifH (Hu *et al.*, 2007). Aunque hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto de formación de P-clusters, se ha observado la implicación de NafH, NifZ y NifW (Jacobson *et al.*, 1989a; Kim & Burgess, 1996; Jimenez-Vicente *et al.*, 2018, 2019). Estas proteínas podrían estar involucradas en la inserción de los grupos 4Fe-4S en NifDK, en la estabilización de NifDK en su estado inmaduro, en la condensación de dos grupos 4Fe-4S para formar los P-clusters, o en el reclutamiento de NifH, que se ha demostrado necesario en este proceso (Jacobson *et al.*, 1989; Paul & Merrick, 1989; Hu *et al.*, 2004; Van Stappen *et al.*, 2022). Asimismo, la generación de los P-clusters promueve la “apertura” del sitio de unión del cofactor FeMo-co, formándose apo-NifDK que es activable mediante inserción del FeMo-co (Rubio & Ludden, 2005).

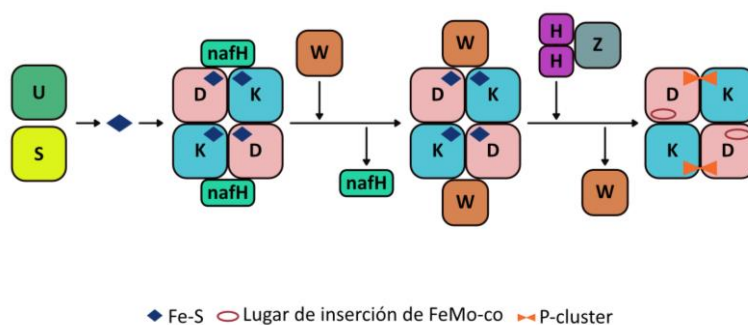


Figura 7. Modelo esquemático de la formación de los P-clusters. Los grupos sulfoferricos son formados por las proteínas NifU y NifS. Estos grupos 4Fe-4S se ensamblan para dar lugar a los P-cluster con la intervención, en primer lugar, de NafH y NifW y, posteriormente, con la implicación de NifZ y NifH. Imagen adaptada de Burén *et al.* (2020).

4.2 Formación del grupo FeMo-co

En la Figura 8 se esquematizan las diferentes proteínas que intervienen para la formación de FeMo-co en *A. vinelandii*. En primer lugar, NifU cede los grupos Fe-S a NifQ (Barahona *et al.*, 2021) y a NifB (Zhao *et al.*, 2007). NifQ cede el Mo al complejo NifEN/NifH (Hernandez *et al.*,

2008) y NifB sintetiza el cofactor NifB-co (Curatti *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 1994) que será transformado en el grupo VK tras su transferencia a NifEN (Hernandez *et al.*, 2007; Spatzal *et al.*, 2011). La proteína NifX podría ser la encargada de entregar NifB-co al complejo NifEN/NifH (Hernandez *et al.*, 2007). Por último, la proteína NifV es la encargada de sintetizar el homocitrato precedente de la condensación de acetil-coA y α -cetoglutarato (Zheng *et al.*, 1997). Una vez que el molibdeno, grupo VK y homocitrato se encuentran en el complejo NifEN/NifH, este es capaz de completar la síntesis de FeMo-co, en una reacción dependiente de ATP y de poder reductor (Rubio *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2021). El FeMo-co sintetizado en NifEN puede ser entregado a NifDK a través de la proteína *carrier* NafY.

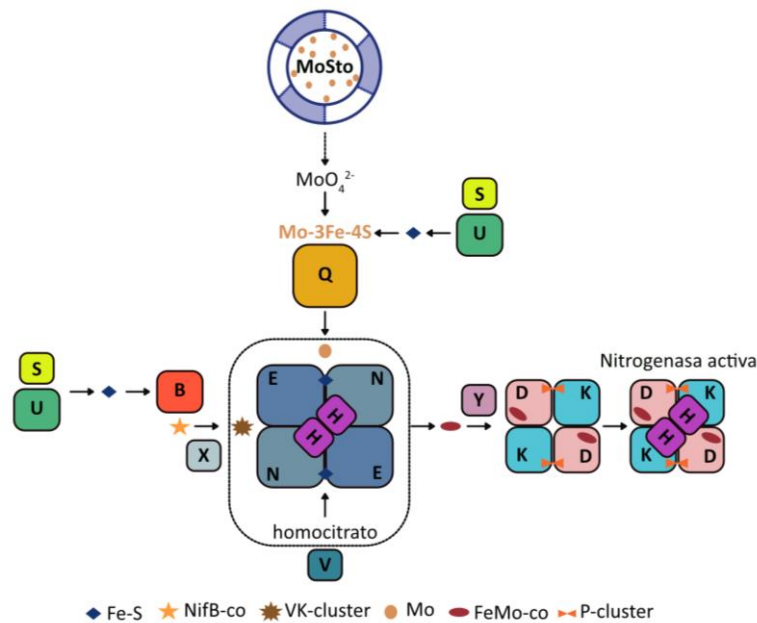


Figura 8. Modelo esquemático de la ruta de biosíntesis del grupo FeMo-co. Se muestran las tres rutas (síntesis de grupos sulfoférricos, entrega de molibdeno y homocitrato) que convergen en un único punto compuesto por las proteínas NifEN y NifH. La ruta de biosíntesis de los grupos Fe-S incluye la actividad de las proteínas NifS, NifU, NifB y NifX. Por su parte, la ruta del molibdeno incluye a la proteína NifQ y Mosto. Por último, el homocitrato es sintetizado por NifV. El complejo NifEN cataliza la conversión de NifBco en el cluster VK, mientras que la incorporación de molibdeno y homocitrato en FeMo-co requiere de la actividad conjunta de NifEN y NifH. Una vez que el cofactor FeMo-co está completo, es transferido por NafY a apo-NifDK para generar una nitrogenasa de molibdeno activa. Imagen adaptada de Burén *et al.* (2020) y Hernandez *et al.* (2009).

5. TRANSPORTE Y ENTREGA DE HIERRO Y MOLIBDENO EN BACTERIAS DIAZOTROFAS DE VIDA LIBRE

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre. Sin embargo, en ocasiones, su disponibilidad es reducida por su baja solubilidad a alto pH, debido a su oxidación a óxidos de hierro. Esto produce que se quede retenido en las partículas del suelo por su carga negativa (Lindsay & Schwab, 1982; Jones, 2020; Piskin *et al.*, 2022). El molibdeno, a diferencia del hierro, aun encontrándose en la posición 53 de los elementos más abundantes de la corteza terrestre, tiene una gran biodisponibilidad en ambientes oxidativos (Wedepohl, 1995). La forma estable y principal fuente de molibdeno en la biosfera es el molibdato (MoO_4^{2-}) (Pope *et al.*, 1980). El proceso mediante el cual *A. vinelandii* adquiere el hierro y el molibdeno para que la nitrogenasa sea catalíticamente activa se encuentra esquematizado en la Figura 9.

Para captar el hierro y el molibdeno del suelo, *A. vinelandii* secreta sideróforos con diferentes características químicas para poder adaptarse a las diversas y cambiantes condiciones ambientales (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Los sideróforos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular con gran afinidad por metales de transición (Neilands, 1995). Estos compuestos han sido estudiados principalmente en la captación de hierro, pudiendo ser clasificados en dos categorías: catecoles (coordinan el hierro mediante grupos hidroxilos) y mixtos (coordinan el hierro por grupos carboxilos e hidroxilos). La aminoquelina, azotoquelina, protoquelina y 2,3-DBHA son los catecoles más abundantes. Por otro lado, la azotobactina y vibrioferrina son los más representativos de entre los sideróforos de hierro mixtos (Tindale *et al.*, 2000; Page *et al.*, 2003; Liermann *et al.*, 2005; Wichard *et al.*, 2008; Kraepiel *et al.*, 2009). También existen sideróforos capaces de captar el molibdato, como la protoquelina y la azotoquelina (Cornish & Page, 2000; Bellenger *et al.*, 2008; McRose *et al.*, 2017).

El complejo metal-sideróforo entra en el periplasma mediante receptores dependientes de TonB (TBDT) (Ferguson & Deisenhofer, 2002; Lim, 2010). Una vez en el periplasma, el molibdato pasa al citosol por transportadores de tipo ABC. En *A. vinelandii*, encontramos transportadores ABC específicos para el MoO_4^{2-} codificado por los genes *modA*, *modB* y *modC*. *ModA* es una proteína periplasmática con gran afinidad por el molibdato. El gen *modB* da lugar a una proteína de membrana citoplasmática a través de la cual el molibdato pasa hacia el citosol. Por último, el producto del gen *modC* provee la energía necesaria para el transporte activo del molibdato a través de la hidrólisis de ATP (Moncey *et al.*, 1995; Grunden & Shanmugam, 1997; Self *et al.*, 2001). *A. vinelandii* tiene tres copias del operón *modABC*, poniendo de manifiesto la importancia y complejidad de su metabolismo del molibdeno (Hernandez *et al.*, 2009).

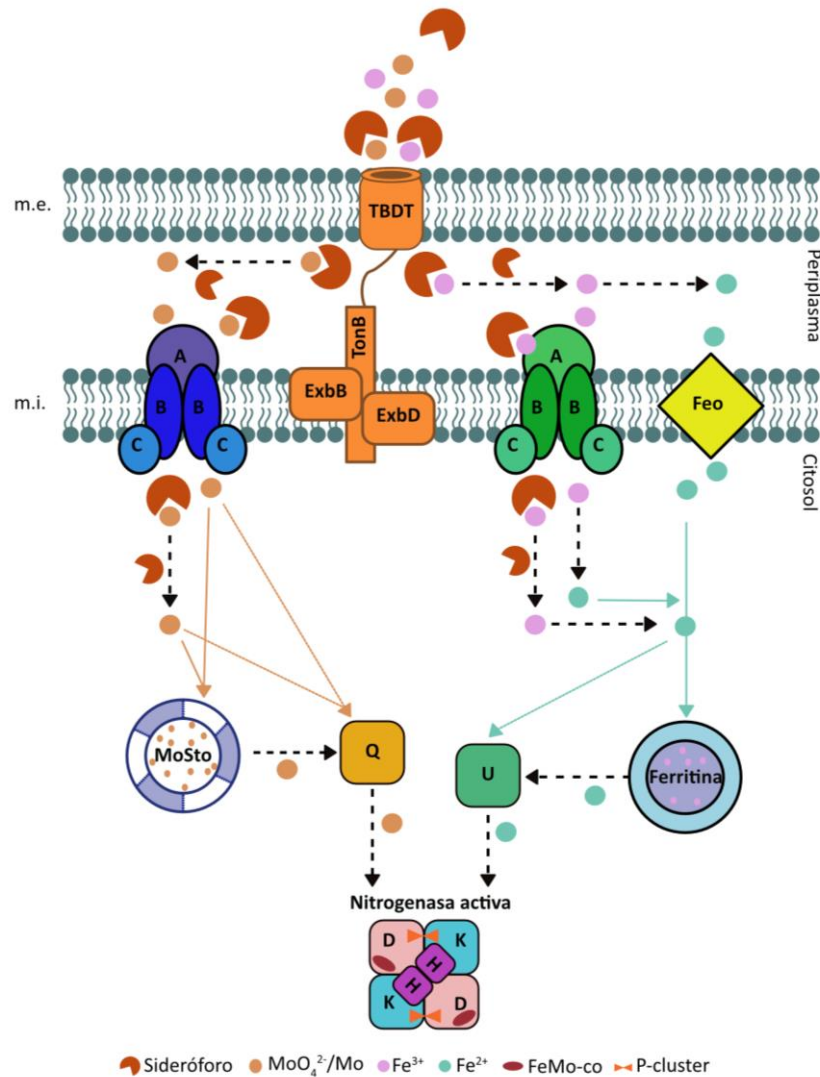


Figura 9. Homeostasis de hierro y molibdeno en *A. vinelandii* hasta llegar a la nitrogenasa. En el esquema se muestra cómo el MoO_4^{2-} y el Fe^{3+} se unen al sideróforo y llegan al periplasma a través del transportador TBBDT que obtiene la energía del complejo ExbB/ExbD y la proteína TonB localizados en la membrana interna (m. i.). El nuevo complejo metal-sideróforo puede atravesar directamente la membrana interna por transportadores del tipo ABC. Otra alternativa es que el metal quede libre y pase al citosol a través del mismo tipo de transportadores ABC. Para el molibdato existen unos transportadores específicos de MoO_4^{2-} denominados ModABC. Si en el periplasma el Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} , este pasa al citosol por un transportador específico: Feo. Una vez en el citosol, el molibdato se almacena en la proteína MoSto en forma de molibdeno. El molibdato liberado puede llegar a NifQ, proteína donadora del molibdeno al cofactor FeMo-co. En el caso del hierro, si una vez en el citosol continúa unido al sideróforo, este complejo se disgrega y el sideróforo es reciclado. El Fe^{2+} no puede encontrarse libre en el citosol, pues se producirían especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que debe estar unido a chaperonas que medien su entrega a otras metaloproteínas. Además, el Fe^{2+} puede ser almacenado en ferritinas o ser entregado a proteínas andamio (IscU y NifU), donde se formarán grupos Fe-S que serán transferidos a diferentes proteínas. Imagen adaptada de Hernandez *et al.* (2009) y Rosa-Núñez *et al.* (2023).

Para llegar al citosol, el hierro puede atravesar la membrana interna a través de un transportador ABC con las mismas características que los descritos para el transporte de molibdato: la subunidad A posee una alta afinidad por el metal, uniéndolo, de manera que posteriormente cruza la membrana a través de la subunidad B gracias a la energía aportada por la subunidad C (Altendorf, 2000). Estos transportadores no han sido estudiados en *A. vinelandii*, pero en los operones para la síntesis de sideróforos catecoles de hierro se encuentran genes que codifican para transportadores ABC (Rosa-Núñez *et al.*, 2023). Por ello, podría inferirse que el metal que transportan es el hierro y que el mecanismo seguido es el mismo que siguen muchas otras bacterias (Thomas & Tampé, 2020). El hierro unido al sideróforo es extraído en el periplasma o citosol por reducción (reductasas férricas) o degradación del sideróforo (Huyer & Page, 1989). En la membrana interna también se encuentran transportadores de Fe^{2+} de la familia FeoB. Normalmente, se organizan en tres subunidades codificadas en el mismo operón: FeoA (pequeña proteína citosólica que activa a FeoB), FeoB (GTP permeasa) y FeoC (posible regulador del operon *feo*) (Ash *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2020). De esta forma, en *A. vinelandii* existen dos operones *feoB* que no han sido estudiados en detalle aún. El primero engloba todo el sistema FeoABC, mientras que el segundo solo FeoAB. Este último produce una proteína FeoB asociada a una proteína con un alto contenido en cisteínas en su extremo C-terminal, de función desconocida, que también se encuentra en otros organismos sin FeoC (Lau *et al.*, 2016). Por último, el genoma de *A. vinelandii* también codifica para otros transportadores de hierro de las familias ZIP y NRAMP (Makui *et al.*, 2000; Grass *et al.*, 2005; Bozzi & Gaudet, 2021; Roberts *et al.*, 2021).

El exceso de hierro y molibdato es almacenado en proteínas específicas. La proteína Mo storage protein (MoSto) es la encargada del almacenaje de Mo, siendo exclusiva del género *Azotobacter* (Pienkost & Brill, 1981; Fenske *et al.*, 2005). Se trata de un hexámero $\alpha_3\beta_3$ conformado por tres dímeros $\alpha\beta$ (Schemberg *et al.*, 2007). Esta proteína es capaz de acumular hasta 100 átomos de Mo, lo que garantiza la fijación de nitrógeno incluso en condiciones extremas de deficiencia de Mo (Pienkost & Brill, 1981; Fenske *et al.*, 2005; Schemberg *et al.*, 2008). El molibdato cruza la superficie de la proteína hasta llegar a la cavidad interior gracias a la energía liberada del ATP (Fig. 10A). Una vez en el interior de la proteína se produce un aumento de la presión que desemboca en la formación de grupos de polioxometalato (POM) (Poppe *et al.*, 2018). El mecanismo de salida del molibdato no ha sido caracterizado hasta el momento *in vivo*. Bajo condiciones *in vitro* se ha observado que el molibdato es liberado por cambios de pH (Schemberg *et al.*, 2008). El Mo liberado podría ser transferido, posteriormente, a la proteína NifQ (Hernandez *et al.*, 2008).

En el caso del hierro, las ferritinas, conservadas desde arqueas hasta humanos, son las encargadas de almacenar este metal (Ebrahimi *et al.*, 2015; Arosio *et al.*, 2017; Sudarev *et al.*, 2023). Son complejas proteínas globulares formadas generalmente por 24 subunidades que dejan una cavidad interior donde se almacena el hierro (Bai *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2020). Existen diferentes tipos de ferritinas en bacterias: ferritinas (Ftn), similares a las que se encuentran en animales; bacterioferritinas (Bfr), que contienen un grupo hemo cada dos subunidades (12 grupos hemos) y las mini-ferritinas (Dps), con solo 12 subunidades (Liu *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2022). En concreto, en el genoma de *A. vinelandii* encontramos una ferritina, dos bacterioferritinas y una mini-ferritina. Aunque las ferritinas de este organismo no han sido caracterizadas hasta la fecha, podemos inferir que su función podría ser similar a la que realizan en otras bacterias: regular los niveles de hierro en la célula mediante su almacenamiento y posterior movilización, protección ante toxicidad por O₂ y tolerancia a radicales libres (Abdul-tehrani *et al.*, 1999; Ceci *et al.*, 2003; Velayudhan *et al.*, 2007). El proceso mediante el cual el hierro es almacenado y luego liberado ha sido estudiado en otras bacterias como *E. coli* o *P. aeruginosa* (Abdul-tehrani *et al.*, 1999; Yasmin *et al.*, 2011; Rivera, 2017, 2023). El Fe²⁺ es capaz de entrar en el interior de la bacterioferritina (Tosha *et al.*, 2010; Rui *et al.*, 2012; Behera & Theil, 2014), donde es convertido en Fe³⁺ (Laghaei *et al.*, 2013; Ebrahimi *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2020). Cuando entra un nuevo átomo de Fe²⁺, el Fe³⁺ es empujado al interior (Ebrahimi *et al.*, 2012), donde se almacena en forma de un mineral férrico-fosfato (Fdez-Gubieda *et al.*, 2016). Cuando este nutriente es necesario en el metabolismo, el mineral férrico es reducido nuevamente a Fe²⁺ para su liberación. En las bacterias *E. coli* y *P. aeruginosa*, el gen *bfr* se encuentra contiguo a otro llamado *bacterioferritin-associated ferredoxin (bfd)*, cuyo producto une un grupo 2Fe-2S. Esta proteína es la responsable de la reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺, para su liberación de la bacterioferritina, con la ayuda de los electrones de los grupos hemo de la propia bacterioferritina (Quail *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 2012) (Fig. 10B). Este Fe²⁺ será utilizado, entre otros, por las proteínas IscU y NifU para generar los grupos sulfoférricos que serán donados a las proteínas que lo necesiten. Sin embargo, se desconoce el proceso de llegada de hierro a estas proteínas.

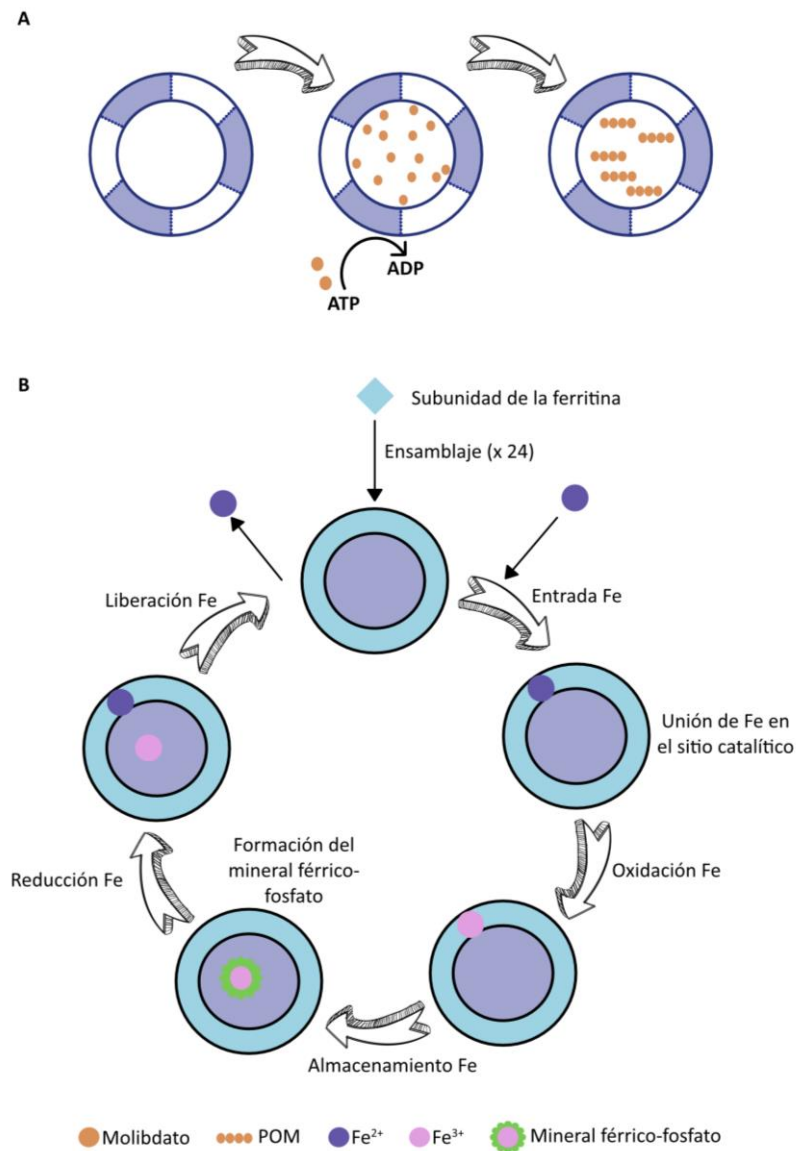


Figura 10. Mecanismo de entrada de molibdato y hierro en las proteínas MoSto y bacterioferritina. A. Esquema del almacenamiento de molibdato en forma de grupos POM. En primer lugar, el molibdato es bombeado al interior de la cavidad acoplado a la hidrólisis de ATP. Posteriormente los grupos POM son autoensamblados. Las seis subunidades que conforman la proteína MoSto están indicadas con diferentes colores; en azul aparecen las subunidades α y en blanco las subunidades β . **B.** Diagrama que representa el mecanismo de adquisición y liberación del hierro en diferentes pasos: En primer lugar, ocurre el ensamblaje de las 24 subunidades, luego entra el Fe^{2+} y se une al sitio catalítico. El siguiente paso es la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} y su almacenamiento dentro de la cavidad de la ferritina formando un mineral con fosfato. Por último, ante una demanda de hierro en la célula, el Fe^{3+} se reduce liberándose Fe^{2+} . Imagen adaptada de Poppe *et al.* (2015) y Ebrahimi *et al.* (2015).

Objetivos

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso esencial en la biosfera, representando una importante fuente de nitrógeno para los sistemas vivos. Realizada por un pequeño grupo de bacterias en vida libre o en simbiosis con eucariotas (los nódulos de las leguminosas son un ejemplo típico), requiere de la síntesis de la metaloenzima nitrogenasa. Para el funcionamiento de esta enzima se necesitan la integración de varios grupos hierro-azufre (Fe-S) (Burén *et al.*, 2020). De este modo, los mecanismos de entrega de hierro en organismos diazotrofos son cruciales para la comprensión de la fisiología de la fijación de nitrógeno, para su mejora, y su posible transferencia a organismos no fijadores de nitrógeno.

Se ha descrito en gran detalle el proceso de ensamblaje de la nitrogenasa y la elaboración de los cofactores metálicos (Burén *et al.*, 2020). En este proceso, la enzima NifU marca la entrada de hierro en esta vía. No obstante, la procedencia de este hierro es desconocida, más allá de que su entrada en bacterias fijadoras de vida libre es mediada por transportadores de Fe-sideróforos y la proteína FeoB (Lau *et al.*, 2016; Nora & Bruno-Bárcena, 2018). Finalmente, la enzima NifQ dona el molibdeno necesario para la formación del grupo FeMo-co, necesario para la activación catalítica de la nitrogenasa. Esta proteína, a su vez, recibe un grupo 4Fe-4S de NifU para la formación de su grupo Mo-3Fe-4S (George *et al.*, 2019; Barahona *et al.*, 2021).

La presente Tesis Doctoral tiene como propósito completar nuestro conocimiento en estas cuestiones y se articula en los siguientes tres objetivos:

- 1) Comprobar si IscU puede actuar como donante de grupos Fe-S a NifQ
- 2) Caracterizar proteínas que interaccionan con NifU involucradas en el tráfico de hierro

Para ello, como modelo se usará la bacteria fijadora de vida libre *A. vinelandii*.

Materiales y métodos

1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

1.1 Cepas bacterianas

1.1.1 *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* que se han empleado se encuentran detalladas en la Tabla 2. La cepa *E. coli* DH5 α se usó para la realización de clonajes, mientras que *E. coli* BL21 DE3 (Studier & Moffattf, 1986) fue utilizada para la producción de proteínas. Todas las cepas se conservaron en 20 % de glicerol (v/v) y almacenadas a -80 °C.

Tabla 2. Cepas *E.coli* usadas en esta Tesis Doctoral

Cepa	Genotipo	Selección	Origen
DH5 α	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (<i>lac</i> ZYA- <i>arg</i> F) U169 <i>rec</i>	Interrupción de <i>lacZ</i> usando	Hanahan, 1983
	A1 <i>end</i> A1 <i>hsd</i> R17 (rK-, mK+) <i>pho</i> A <i>sup</i> E44	5-bromo-4-cloro—3-indolil-	
	λ - <i>thi</i> -1 <i>gyr</i> A96 <i>rel</i> A1	β D-galactopiranosido (X-gal)	
BL21	F-ompT gal dcm lon <i>hsd</i> SB (rB - mB-) λ (DE3 [<i>lac</i> llacUV5-T7 gene 1 <i>ind</i> 1 <i>sam</i> 7 <i>nin</i> 5]		Promega

1.1.2 *Azotobacter vinelandii*

La cepa *A. vinelandii* DJ fue obtenida de la colección del Profesor Dennis Dean (Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, EE. UU.) y se empleó para la producción de los mutantes usados en esta Tesis Doctoral. Todas las cepas de *A. vinelandii* usadas en esta tesis se encuentran descritas en la Tabla 3. *A. vinelandii* se cultivó a 30 °C durante 2-3 días. Las cepas se conservaron a -80 °C en una mezcla del 92,78 % (v/v) del tampón fosfato estéril (apartado 2.6) y un 7,22 % (v/v) de DMSO (dimetil sulfóxido).

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1 LB (Lysogeny Broth)

El medio LB (Bertani, 1951) se usó para el cultivo de *E.coli*. El medio líquido y sólido solo se diferencian en la adición del 2 % de agar bacteriológico (p/v) para el segundo tipo. Ambos medios fueron autoclavados durante 20 minutos a 121 °C. La composición del medio LB se encuentra detallada en la Tabla 4.

Cuando fueron necesarios, los antibióticos fueron añadidos a las siguientes concentraciones finales: 100 μ g/ml ampicilina, 50 μ g/ml kanamicina, 35 μ g/ml cloranfenicol y 25 μ g/ml gentamicina.

Tabla 3. Cepas de *A. vinelandii* utilizadas en esta Tesis Doctoral

Cepa	Genotipo	Cepa parental	Origen	Finalidad
DJ	ATCC BAA-1303	-	Dr. Dennis Dean	Control positivo de crecimiento diazotrófico
UW300	$p_{nifH}::his_9-nifQ$	<i>A. vinelandii</i> DJ	Dr. Luis Rubio (Hernandez <i>et al.</i> , 2008)	Purificación $_{H}NifQ$
DJ105	$\Delta nifU$ (Delección en fase desde aa115-aa231)	<i>A. vinelandii</i> DJ	Dr. Dennis Dean (Jacobson <i>et al.</i> , 1989)	Fondo genético para MGGAV1
MGGAV1	$\Delta nifU p_{nifH}::his_9-nifQ$	DJ105	Esta tesis	Purificación $_{H}NifQ$
MGGAV2	$grxD::Km^R$ (Casete de kanamicina en lugar del gen <i>grxD</i>)	<i>A. vinelandii</i> DJ	Esta tesis	Ensayos actividad nitrogenasa
MGGAV3	$\Delta grxD$ (Delección en fase aa2-50)	<i>A. vinelandii</i> DJ	Esta tesis	Ensayos actividad nitrogenasa
MGGAV4	$Km^R::grxD$ (Mutante MGGAV2 complementado con el gen <i>grxD</i>)	MGGAV2	Esta tesis	Ensayos actividad nitrogenasa
MGGAV5	$bfrA::Km^R$ (Casete de kanamicina en lugar del gen <i>bfrA</i>)	<i>A. vinelandii</i> DJ	Dr. Dennis Dean	Ensayos actividad nitrogenasa
MGGAV6	$bfrA::Km^R - grxD::Gm^R$ (Casetes de kanamicina y gentamicina en lugar de los genes <i>bfrA</i> y <i>grxD</i> respectivamente)	MGGAV5	Esta tesis	Ensayos actividad nitrogenasa

Tabla 4. Composición LB

Compuesto	Concentración
Tryptona	1 % (p/v)
Extracto de levadura	0,5 % (p/v)
NaCl	1 % (p/v)
Agar bacteriológico	2 % (p/v)

2.2 SOC (SOB medium containing glucose)

El medio de caldo superóptimo con represión por catabolito (SOC), cuya composición se encuentra detallada en la Tabla 5, se usó para la recuperación de células bacterianas tras una transformación (Hanahan, 1983).

Tabla 5. Composición SOC

Compuesto	Concentración
Tryptona	2 % (p/v)
Extracto de levadura	0,5 % (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM
pH 7,0	

2.3 SOB (Super Optimal Broth)

Este medio (Hanahan, 1983) se empleó para la preparación de células competentes que iban a ser transformadas por choque térmico. En la Tabla 6 se muestra la composición de este medio.

2.4 TB (Terrific Broth)

Este medio se usó para la recuperación de células durante la obtención de células quimiocompetentes (Sambrook & Russell, 2006). Su composición se detalla en la Tabla 7.

Tabla 6. Composición SOB

Compuesto	Concentración
Tryptona	2 % (p/v)
Extracto de levadura	0,5 % (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
pH 7,0	

Tabla 7. Composición TB

Compuesto	Concentración
Piperazina N,N`-bis (2-etanosulfónico) PIPES	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
MnCl ₂	55 mM
pH 6,7	

2.5 CCMB80 (Buffer containing calcium (80 mM) and manganese-based)

Este medio se usó para la obtención de células BL21 quimiocompetentes (Hanahan, 1983). En la Tabla 8 se muestra su composición.

Tabla 8. Composición CCMB80

Compuesto	Concentración
KOAc pH 7,0	10 mM
CaCl ₂	80 mM
MgCl ₂	10 mM
MnCl ₂	20 mM
Glicerol	10 % (v/v)
pH 6,4	

2.6 Azotobacter vinelandii Burk`s modified medium

El medio Burk para el crecimiento no diazotrófico de *A. vinelandii* (Dos Santos, 2011) consiste en 3 componentes que necesitan ser autoclavados de forma independiente para evitar que precipiten: Un tampón fosfato (1 x) llamado BB, una solución concentrada de sacarosa, cationes y metales (10 x)

llamada BS, además de la fuente de nitrógeno $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$. Las concentraciones finales de cada uno de los componentes se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9. Composición medio Burk

-	Compuesto	Concentración
BB 1 x	KH_2PO_4	14,7 mM
	K_2PO_4	4,5 mM
	Sugar	5,8 mM
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	16,6 mM
BS 10 x	CaCl_2	0,6 mM
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,21 μM
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18 μM
Acetato de amonio	$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$	28,5 mM

Cuando *A. vinelandii* crece bajo condiciones diazotróficas se elimina el acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$). Para la preparación de placas de medio Burk al medio BB 1 x se le añade un 1,7 % (p/v) de agar bacteriológico. El BB 1 x y el BS 10 x fueron autoclavados durante 20 minutos a 121 °C, mientras que el acetato de amonio fue filtrado por un poro de 0,2 μm . Cuando estos medios fueron preparados para generar células competentes, todos los medios se filtraron y se utilizaron “reservas” sin contaminar con ningún metal previamente.

Los antibióticos fueron añadidos en las siguientes concentraciones finales: 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicilina, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ kanamicina, 5 $\mu\text{g/ml}$ rifampicina y 0,25 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina.

3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

3.1 Extracción de ADN plasmídico de bacterias

Para la extracción de ADN plasmídico se usaron 5 ml de un cultivo saturado de *E. coli* DH5 α que se centrifugó 1 minuto a 11.000 x g. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se empleó para la extracción del plásmido utilizando el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

3.2 Recuperación de ADN de geles de agarosa/PCR

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se cargaron en geles de agarosa para su posterior purificación. Las bandas obtenidas se cortaron del gel empleando un bisturí y se purificaron empleando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Düren, Alemania).

3.3 Cuantificación de ADN

Se utilizó 1 µl del ADN extraído para su cuantificación con el Nanodrop ND-1000 UV/Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). Para comprobar que las muestras no estaban contaminadas con proteínas, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. La relación entre ambas debía de ser superior a 1,8 para afirmar que la muestra estaba libre de estos contaminantes. En paralelo, para evaluar la contaminación por carbohidratos, se usó la relación de las absorbancias medidas a 260 y 230 nm, debiendo ser esta superior a 2.

3.4 Electroforesis

Las muestras obtenidas se visualizaron en geles de 0,8-2 % de agarosa en tampón TBE (0,1 M Tris, 0,1 M ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0), usando tampón de carga OrangeG 6x (0,25 % Orange G (p/v) en 30 % glicerol (v/v)). Para visualizar el ADN, los geles se tiñeron con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EE. UU.).

4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las PCR se usaron para el clonaje de secuencias mediante la amplificación de un fragmento de ADN concreto o para la validación de la presencia de una determinada secuencia de ADN. En todas ellas se usó como control negativo agua MiliQ. Los oligonucleótidos empleados para cada una de ellas se encuentran detallados en la Tabla 10. La visualización de los fragmentos amplificados se realizó en geles de agarosa (apartado 3.5).

Cuando se realizaron PCR cuyos fragmentos eran requeridos para futuros clonajes, su amplificación se realizó empleando la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Esta enzima presenta una tasa de introducción de errores 50 veces menor a la de una polimerasa convencional. Por otro lado, cuando las PCR se utilizaron para la comprobación de la presencia de un fragmento de ADN clonado en *E. coli*, la polimerasa utilizada fue la Dream Taq (Thermo, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). En las PCR de colonias, en lugar de utilizar ADN se empleó directamente la colonia bacteriana recogida con una punta de pipeta estéril. En el caso de la PCR de colonias de *A. vinelandii*, previamente se realizó un ciclo de 20 minutos a 95 °C. El tiempo de elongación usado para ambas polimerasas fue de 1 min/Kb.

Tabla 10: Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis Doctoral

Mutantes de NifU	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
Dominio N	5IN-NdeI-ATGNifU	TTTTCAGGGACATATGTGGGATTATTCGGAAAAA
	3IN-NifU-STOP-NifS	ATAGACGTCAGCCATTACGTCTCGCCACGGTAGTT
	5IN-NifU-STOP-NifS	CGTGGCGAGACGTGAATGGCTGACGTCTATCTCGAT
	3IN-SexIA-NifS	TCAGCGCCATGCCGACCTGGTTGCCGAAGCTGTGCA
Dominio central	NdeI-DnifU	CACCATATGGAGGACGACCACGAAGAGGG
	SexAI-nifS	ATCACCTGGTTGCCGAAGCTGTGCAGCGAC
Dominio C	5NdeI-CNifU	AGGCATATGAAGAAGGTCAAGGTGCTCGCC
	SexAI-NifS	ATCACCTGGTTGCCGAAGCTGTGCAGCGAC
Mutante <i>grxD</i>	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligo
Aguas arriba	5GdxXbaIUp	AGGTCTAGAAGCGGTTCTGAACAGGGCACC
	3GdxNcoIUp	CCTCCATGGTGAGTCACCTCGGCTGTGCTG
Aguas abajo	5GdxNcoIDown	AGGCCATGGGACGTGTCTGTTGCACGGGCT
	3GdxXhoIDown	CCTCTCGAGGGAGCCGAATGGCACCACCG
Kanamicina	5KnNcoI	AGGCCATGGGGGAAAGCCACGTTGTGTC
	3KnNcoI	CTTCCATGGCTTTTGCTTTGCCACGGAACGG
Complementación <i>grxD</i>	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
GrxD + 700 pb aguas arriba + 700 pb aguas abajo	FW-NotI-700UpGrx5	AAAGCGGCCGCCAGGGATGCAGATCGTCGGAC
	700DownGrx5EcoRI-RV	CCTGAATTCCAACCTCCAGGAGCTCGGCAA
Mutante <i>bfrAgrxD</i>	Nombre del oligo	Secuencia del oligonucleótido
Gentamicina	5NcoIGm	AGGCCATGGGACGCACACCGTGGAAACGGA
	3NcoIGm	CTTCCATGGCGCGGTTGTGACAATTTACCG
Proteínas <i>E.coli</i>	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
$_{H}$ GrxD	5NdeIGdxN-Strep	AGGCATATGATGGATATCATCGAAACCATT
	3BamHIGdxN-Strep	CCTGGATCCTCAAGCATCGGCTTTGTGCGGC
GrxD _s	5NcoIGdxC-Strep	AGGCCATGGATATCATCGAAACCATTAAAG
	3NdeIGdxC-Strep	CCTCATATGAGCATCGGCTTTGTGCGCCGC
IscU _s	5NcoI-IscU-C-Strep	AGGCCATGGCTTACAGTGACAAGGTCATCG
	3NdeI-IscU-C-Strep	CCTCATATGAACCAGGCCTTTCTGTGCTT
$_{H}$ BfrA	5NdeI-BfrA-His	AGGCATATGATGAAAGGCGATAAGATAGTC
	3BamHI-BfrA-His	CCTGGATCCTTACTCATCCATTTGCGATTG
$_{S}$ NifQ	NifQ-5'	CATGCATATGGGCAGCGCCGCGGCC
	NifQ-3'	CTACGGATCCTGGCCGCCAGCAGG
	NdeI-Strep-tag-5'	TATGGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAACA
	NdeI-Strep-tag-3'	TATGTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTAGCCA
NifQ _H	1184	AAATTCTGCAGATGGGCAGCGCCGCG
	1185	AATTGCGGCCGCGAGAATCGGGTCATATCTCTGCTCC

5. CLONACIÓN

5.1 Vectores usados

Los vectores usados en esta tesis se encuentran recogidos en la Tabla 11.

Tabla 11. Vectores usados en los clonajes de esta Tesis Doctoral. Los antibióticos utilizados en la selección aparecen abreviados como Ap (ampicilina), Gm (gentamicina), Km (kanamicina) y Rf (rifampicina).

Nombre	Selección	Finalidad
pET16bStrep	Ap	Generar proteínas con epítipo de Strep
pET16bHis	Ap	Generar proteínas con epítipo de His
pRHB612	Ap	Purificación $_H$ NifU en <i>E. coli</i>
pRHB272	Ap	Purificación $_H$ NifQ en <i>A. vinelandii</i>
pUC57	Ap	Síntesis mutantes de NifU
pUC4K	Km	Amplificación Km para la generación de mutantes en <i>A. vinelandii</i>
pBluEScript	Ap	Generación de mutantes en <i>A. vinelandii</i>
pDB303	Rf	Selección de colonias en la complementación de mutantes de <i>A. vinelandii</i>
pDB1416	Gm	Plásmido que interrumpe el gen scrB con un casete de gentamicina.
pT7-7	Ap	Clonación de $_S$ NifQ
pN2LP42	Gm	Amplificación de Gm para la generación de mutantes en <i>A. vinelandii</i>
pCU18	Ap	Plásmido usado para la transformación de <i>A. vinelandii</i>
pDB2678	Ap	Plásmido pCU18 con la secuencia Up-GrxD-Down
pDB2679	Ap	Plásmido pCU18 con la delección desde aa2-50 de GrxD
pTrc99a	Km	Coexpresión de dos plásmidos con diferentes resistencias a antibióticos

5.2 Clonajes con enzimas de restricción: Ligación e *In-Fusion*

Para digerir 1 μ g de plásmido o 500 ng de un fragmento de ADN se usó 1,5 μ l de cada una de las enzimas de restricción necesarias (Thermo Scientific) en un volumen final de 30 μ l. La mezcla se incubó dos horas a 37 °C para su eficiente digestión.

Para la ligación de fragmentos se usó una proporción 1:7 (vector: inserto), añadiendo 50 ng del vector digerido. En un volumen final de 20 μ l se añadieron 2 μ l de la enzima ligasa T4 (Invitrogen). La mezcla se dejó toda la noche a 4 °C hasta su transformación en células DH5 α quimiocompetentes (6.1.2).

En el caso de la clonación usando la técnica In-Fusion se siguieron las indicaciones propuestas por el fabricante (In-Fusion HD Cloning, Takara Bio Usa, Inc.) En un volumen final de 10 μ l y usando una proporción 1:2 (vector: inserto) se añadió 2 μ l de la enzima (5x In-Fusion HD enzyme) y 2,5 μ l del

vector. La mezcla se incubó a 50 °C durante 15 minutos antes de su transformación en células DH5 α quimiocompetentes (6.1.2).

5.3 Clonajes realizados en esta tesis doctoral

5.3.1 Clonajes en *E. coli*

5.3.1.1 GrxD con epítomos de Strep e His

La secuencia de *AvgrxD* (Avin_14040) fue amplificada del ADN genómico de *A. vinelandii* e introducida en los vectores de expresión pET16bStrep y pET16bHis por enzimas de restricción. Para el primer caso se usaron las enzimas de restricción *NcoI* y *NdeI* (oligonucleótidos 5'*NcoI*GdxC-Strep y 3'*NdeI*GdxC-Strep), mientras que para el caso de las histidinas se usaron las enzimas *NdeI* y *BamHI* (oligonucleótidos 5'*NdeI*GdxC-Strep y 3'*BamHI*GdxC-Strep) (Tabla 10).

5.3.1.2 BfrA con epítomos de Strep e His

La secuencia de la BfrA (Avin_14050) fue fusionada a un epítopo Twin-strep o una cola de histidinas en su extremo N-terminal debido a que es el extremo que se encuentra expuesto en la estructura cuaternaria de la bacterioferritina. Los plásmidos usados fueron el pET16bStrep y pET16bHis y, en ambos casos, las enzimas de restricción usadas fueron *NdeI* y *BamHI*. Para generar los sitios de corte flanqueantes a la región de la BfrA se utilizaron los oligonucleótidos *NdeI*_BfrA_prot_FW y *BamHI*_BfrA_prot_RV para BfrA y los oligonucleótidos 5'*NdeI*-BfrA-His y 3'*BamHI*-BfrA-His para el clonaje de BfrA (Tabla 10). Estas secuencias fueron digeridas y ligadas en el plásmido previamente digerido.

5.3.1.3 IscU con epítopo de Strep

El plásmido pET16bStrep se usó para generar la construcción IscU-Strep (IscU_S). La secuencia del gen *iscU* (Avin_40380) se amplificó desde ADN genómico de *A. vinelandii* con los oligonucleótidos 5'*NcoI*-IscU-C-Strep y 3'*NdeI*-IscU-C-Strep (Table Suplementaria 1). Estos oligonucleótidos insertaron a ambos lados de la secuencia de *iscU* unos sitios de corte para las enzimas de restricción *NcoI* y *NdeI*. Una vez digerido el fragmento, este se ligó junto con el plásmido pET16bStrep digerido con las mismas enzimas de restricción.

5.3.1.4 Generación de mutantes NifU en *E. coli*

En la tabla 12 se indican las características de los 6 mutantes de NifU generados:

Tabla 12. Mutantes de NifU usados en esta Tesis Doctoral. Todas estas proteínas tienen una cola de histidinas (H) en su extremo N-terminal.

Mutantes	Características
$H\Delta N$ -NifU	Aminoácidos 1-125 deletados. Ile126 se cambió por Met1.
$H\Delta C$ -NifU	Aminoácidos 203-312 deletados. Se añadió codón stop después del codón que codifica Lys202.
$H C_{35,62,106,272,275}A$ -NifU	Las cisteínas de los dominios N- y C- terminal (Cys35, Cys62, Cys106, Cys272 y Cys275) fueron sustituidas por Ala.
$H N$ -NifU	Aminoácidos 125-312 deletados. Se añadió codón stop después del codón que codifica Thr125.
$H core$ -NifU	Aminoácido 127 hasta el 202, añadiendo un codón que codifica Met1 y un codón stop.
$H C$ -NifU	Aminoácidos 1-202 deletados. Se añadió un codón que codifica Met1 antes de Lys203.

La zona amplificada en todos los casos abarcó desde el sitio de restricción *NdeI* en el dominio N terminal del gen *nifU* hasta el sitio de restricción *SexAI* en el gen *nifS*, localizado a continuación de *nifU* en el genoma de *A. vinelandii* DJ. Ambos genes habían sido clonados previamente en el plásmido pRHB612 (Fig. 11).



Figura 11. Esquema de la posición de *nifU* y *nifS* en el plásmido pRHB612. En la imagen se observan los sitios de corte *NdeI* y *SexAI* para realizar los clonajes de los diferentes mutantes de *nifU* en *E. coli*. De igual modo, se encuentran detallados los 3 dominios encontrados en la proteína NifU.

Los genes codificantes de proteínas mutantes ΔN (NifU sin el dominio N), ΔC (NifU sin el dominio C) y $C_{35,62,106,272,275}A$ (C35A-C62A-C106A-C272A-C275A) fueron sintetizados por GenScript (Nueva Jersey, EE. UU.) y clonados en los sitios *NdeI* y *SexAI* del plásmido pUC57. Los fragmentos clonados en el plásmido pUC57 y el plásmido de destino, pRHB612, fueron digeridos con ambas enzimas de restricción para después ser ligados.

Por otro lado, también se clonaron de forma individual los genes codificantes de cada uno de los tres dominios de la proteína NifU. En primer lugar, el gen codificante para el dominio N se clonó usando In-Fusion. Para ello, se generaron tres fragmentos: A (Dominio N con el sitio de restricción *NdeI*), B (NifS desde el ATG hasta el sitio de restricción *SexAI*) y el plásmido pRHB612 digerido con

ambas enzimas de restricción. Los oligonucleótidos utilizados para cada uno de los fragmentos se encuentran en la Tabla 10.

El fragmento que codifica el dominio central fue amplificado mediante PCR. Los oligos usados fueron *NdeI*- Δ nifU y *SexAI*-nifS (Tabla 10). Por último, el fragmento codificante del dominio C fue amplificado mediante PCR usando los oligonucleótidos 5'*NdeI*-CNifU y *SexAI*-nifS (Tabla 10). En ambos casos tanto el fragmento como el plásmido fueron digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *SexAI*, para luego ser ligados de nuevo en el plásmido pRHB612.

La secuencia de todas las construcciones fue comprobada mediante secuenciación antes de ser transformada en BL21.

5.3.2 Clonajes en *A. vinelandii*

5.3.2.1 Mutante MGGAV2 por inserción de un casete de kanamicina

Para la generación del mutante MGGAV2 se amplificó la zona aguas arriba (421 pb) (digerida con *NcoI* y *XbaI*) y abajo (429 pb) (digerida con *XhoI* y *NcoI*) del gen *grxD* del ADN genómico de *A. vinelandii*. Se usaron los oligonucleótidos 5Gdx*XbaI*Up y 3 Gdx*NcoI*Up para a zona aguas arriba, mientras que para la zona aguas abajo se utilizaron 5Gdx*NcoI*Down y 3Gdx*XhoI*Down (Tabla 10). Esta construcción se ligó al plásmido pBLUEScript (digerido con *XbaI* y *XhoI*) y se transformó en *E. coli* DH5 α . Posteriormente, esta construcción fue digerida con *NcoI* con el objetivo de introducir el casete de la kanamicina entre las zonas aguas arriba y abajo del gen de la GrxD. Para ello, el casete de la kanamicina fue amplificada con los oligonucleótidos 5Kn*NcoI* y 3Kn*NcoI* (Tabla 10) usando el plásmido pUC4K como molde. El producto de PCR fue digerido con la enzima de restricción *NcoI*. Tras esto, este fragmento se ligó junto con el plásmido pBLUEScript digerido con la construcción con los fragmentos colindantes al gen *grxD* (Fig. 12).

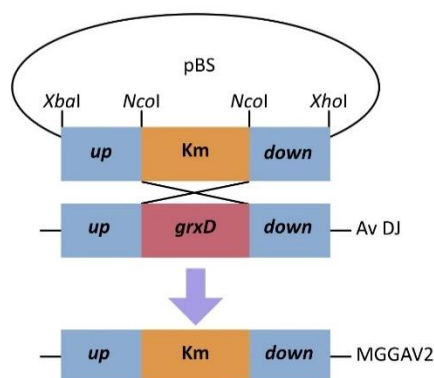


Figura 12. Esquema del proceso de delección del gen *grxD* en *A. vinelandii*. El mutante MGGAV2 se generó transformando de *A. vinelandii* con la construcción pBlueScript::Up-Km-Down. De esta forma, por recombinación homóloga se intercambié el gen *grxD* por el casete de la kanamicina.

5.3.2.2 Complementación del mutante MGGAV2

La complementación del mutante MGGAV2 se realizó amplificando el gen *grxD* junto con 700 pb aguas arriba y aguas abajo para incrementar la tasa de recombinación homóloga usando los oligonucleótidos FW-NotI-700UpGrxD y 700DownGrxD_{EcoRI}-RV (Tabla 10). Este fragmento fue amplificado desde ADN genómico de *A. vinelandii* insertando los sitios de restricción para las enzimas NotI y EcoRI. Tras esto se ligó en el plásmido pBlueScript, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción (Fig. 13). La nueva cepa recibió el nombre de MGGAV4.

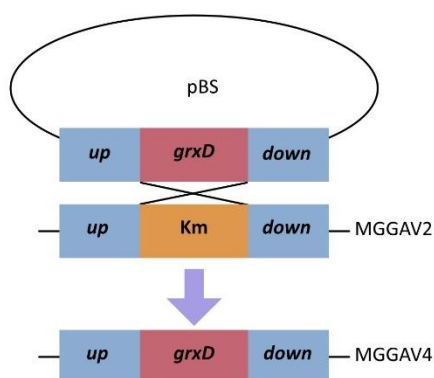


Figura 13. Esquema del proceso de inserción del gen *grxD* en el mutante MGGAV2. Mediante recombinación homóloga, se realizó el proceso contrario al de la generación del mutante. El mutante MGGAV2 se transformó con el plásmido pBlueScript que llevaba la secuencia codificante de la GrxD junto con 700 pb aguas arriba y abajo de la misma para aumentar la tasa de transformación. En la transformación de *A. vinelandii* se usó el plásmido pDB303 como garantía del proceso de transformación.

5.3.2.3 Mutante *grxD* en fase

Para asegurar que el fenotipo del mutante *grxD* producido al sustituir este por el casete de kanamicina es debido a la propia delección y no al hecho de la inserción de la kanamicina, se generó un nuevo mutante usando otra aproximación. Para ello, se clonó, mediante enzimas de restricción, la región Up-*grxD*-Down usada para la complementación del mutante en el plásmido pCU18, denominándose pDB2678. Posteriormente, se realizó una delección de 144 pb con la enzima de restricción *EcoRV*; produciéndose una delección en fase desde el codón del aminoácido 2 al 50. Este plásmido con la delección (pDB2679) fue introducido junto con pDB1416 (resistencia a gentamicina) en *A. vinelandii* para generar el mutante DJ3045.

5.3.2.4 Mutante MGGAV6

Para la obtención del doble mutante *bfrAgrxD* (MGGAV6) se usó el mutante *bfrA* (MGGAV5), generado por el laboratorio del Dr. Dennis Dean (Virginia Tech, EE. UU.). Este mutante tiene un casete de kanamicina en el lugar del gen *bfrA*. Este mutante fue usado para producir el nuevo doble mutante. Para ello, se usó el plásmido pBlueScript con las zonas arriba y abajo de *grxD* (realizado para poder

hacer el mutante simple MGGAV2) con un sitio de restricción *NcoI* entre ambas zonas. Por otro lado, el casete de la gentamicina (incluyendo su promotor y terminador) fue amplificado del plásmido pN2LP42 y se insertaron sitios de corte para la enzima *NcoI* usando los oligonucleótidos 5*NcoI*/Gm y 3*NcoI*/Gm (Tabla 10). De esta forma, el casete de la gentamicina, después de ser digerido, podía ser insertado en el plásmido entre las zonas colindantes a *grxD*. Esta construcción fue introducida en el mutante MGGAV5, de manera que los dobles mutantes podían ser seleccionados debido a su resistencia a ambos antibióticos: kanamicina y gentamicina (Fig. 14).

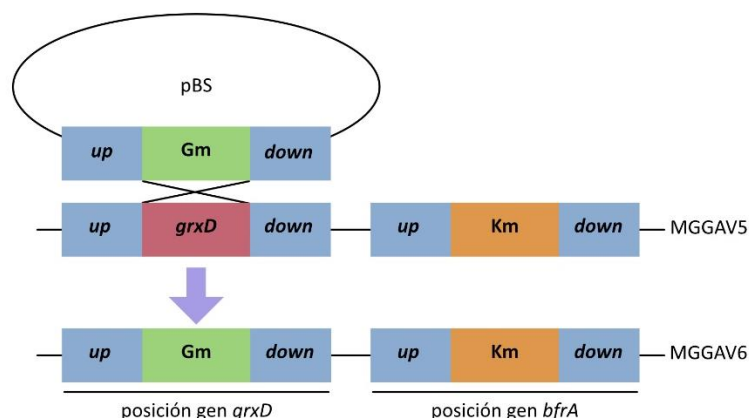


Figura 14. Esquema de la generación del doble mutante MGGAV6. El mutante MGGAV5, con resistencia a kanamicina, se usó como fondo genético para la obtención del doble mutante MGGAV6.

6. TRANSFORMACIÓN

6.1 Transformación de células de *E.coli*

6.1.1 Preparación de células quimiocompetentes

6.1.1.1 *E. coli* DH5α quimiocompetentes

Se inocularon 250 ml de SOB a 18 °C en agitación durante 48 horas hasta una $OD_{600}=0,6-0,7$. A partir de este momento, el resto del proceso se realizó a 4 °C y todos los utensilios necesarios (tubos de centrifuga, probetas, eppendorfs, etc.) habían sido previamente enfriados. Los cultivos se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 5.000 x g y se descartó el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en 80 ml de TB. Tras esto, se volvió a centrifugar usando las mismas condiciones y se volvió a descartar el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 ml de 20% glicerol (v/v) en TB. Estas células fueron separadas en partes proporcionales y se congelaron en nitrógeno líquido antes de ser guardadas a -80 °C hasta el momento de su utilización.

6.1.1.2 *E. coli* BL21 quimiocompetentes

Para la preparación de células BL21 quimiocompetentes se usó una variación del protocolo de Hanahan para bacterias TOP10 (Hanahan, 1983). Una colonia aislada de células BL21 fue resuspendida en 2 ml de medio SOB e incubada a 23 °C durante toda la noche para luego añadir un 15 % (v/v) de glicerol y ser almacenada a -80 °C en criotubos. Estas células fueron usadas como *seed-stock* para preparar los inóculos de las nuevas células quimiocompetentes.

Un matraz con 250 ml de medio SOB fue inoculado usando 1 ml de *seed-stock* para crecer a 20 °C hasta una OD₆₀₀=0,3 (aproximadamente 16 h). Se sedimentaron las células centrifugando a 3000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 80 ml de tampón CCMB80 (4 °C). Tras una incubación de 20 minutos, se volvió a centrifugar a 4 °C y se resuspendió el sedimento en 10 ml del mismo tampón. Tras otra incubación de 20 minutos, se hicieron alícuotas que se almacenaron a -80 °C.

6.1.2 Transformación de células quimiocompetentes (Choque térmico)

Las células de *E.coli* DH5 α /BL21, conservadas a -80°C, fueron descongeladas lentamente en hielo. Se añadió 50 ng de plásmido o la reacción de ligación/In-Fusion a 100 μ l de células DH5 α o 50 μ l de células BL21. Después de 20 minutos de incubación en hielo, esta mezcla fue sometida a un choque térmico de 42 °C durante 45 segundos. Inmediatamente después, el tubo fue incubado en hielo durante 2 minutos. Para recuperar las células se añadió un mililitro de SOC y se incubó a 37 °C durante 1 hora en agitación. Las células se plaquearon, usando dos concentraciones diferentes, en placas de LB con los antibióticos necesarios para la selección de colonias positivas.

6.1.3 Preparación de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes de *E.coli* DH5 α se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Dobrowolski (1992). Se inoculó un litro de LB usando un cultivo saturado de *E. coli* para dejarlo a una OD₆₀₀ inicial de 0,02. Este cultivo creció a 37 °C hasta alcanzar su fase exponencial. Una vez alcanzada una OD₆₀₀ de 0,6, las células se traspasaron a tubos estériles y se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 4.000 x g. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento fue resuspendido en 200 ml de agua estéril. Estas células resuspendidas volvieron a ser centrifugadas en las mismas condiciones y el sedimento obtenido se volvió a resuspender en 100 ml de agua estéril. A continuación, se repitió el proceso de centrifugación para luego resuspender el sedimento en 50 ml de glicerol estéril al 10 % (v/v). Tras un último proceso de centrifugación usando las mismas condiciones, las células fueron finalmente resuspendidas en 2 ml de glicerol estéril al 10 % (v/v) y se prepararon alícuotas que fueron congeladas en nitrógeno líquido. Estas células se conservaron a -80 °C. Durante todo el proceso se usaron materiales que habían sido enfriados previamente a 4 °C.

6.1.4 Transformación de células electrocompetentes (Electroporación)

Las alícuotas de células electrocompetentes DH5 α almacenadas a -80 °C se descongelaron lentamente en hielo y se añadió 50 ng de plásmido por cada 50 μ l de células. Tras esto, la mezcla se transfirió a una cubeta fría de electroporación. Los parámetros de descarga para la electroporación fueron 25 μ F de capacitancia, un voltaje de 2,5 kV y una resistencia de 200 Ω en el electroporador ECM630 de BTX (Harvard Bioscience, Inc, Reino Unido). La mezcla se transfirió a un tubo de 1,5 ml al cual se le añadió 1 ml de SOC para recuperar las células. Tras una hora de incubación a 37 °C en agitación, las células se plaquearon en LB con los antibióticos correspondientes según el plásmido empleado.

6.2 Transformación de células de *A. vinelandii*

Para obtener células competentes de *A. vinelandii* se siguieron protocolos basados en los descritos previamente por Page & von Tigerstrom (1979) y Dos-Santos *et al.* (2011). Para ello, *A. vinelandii* creció en una placa de medio Burk sin molibdeno a 28 °C. Tras 2-3 días, se resuspendió una pequeña proporción en 1 ml de medio Burk sin metales (sin hierro y sin molibdeno), que se mezclaron con vortex hasta estar totalmente disuelto. Este mililitro se usó para preparar diferentes diluciones de células en suspensión. Así, se añadieron distintos volúmenes (500 μ l, 100 μ l, 50 μ l y 20 μ l) a tubos “Falcon” de 50 ml con 12,5 ml del medio Burk sin metales. Estos cultivos crecieron toda la noche a 28 °C, 180 rpm. A la mañana siguiente se eligió el cultivo con una OD₆₀₀= 0,8-1,2. Se combinaron 200 μ l de las células seleccionadas con 200 μ l del tampón de transformación (16 mM MgSO₄, 20 mM MOPS, pH 7,4) y 10 μ l del plásmido a transformar (700-1000 ng/ μ l). Esta mezcla se incubó durante 45 minutos a 28 °C y 180 rpm. A continuación, se transfirió a 12,5 ml del medio Burk completo en un matraz de 100 ml, y creció toda la noche a 28 °C y 180 rpm. Para seleccionar las células recombinantes en medio sólido, se plaquearon diferentes volúmenes en placas con los antibióticos correspondientes.

7. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE *E. COLI*

Las proteínas (GrxD, NifU, NifS, NifQ, BfrA), expresadas en *E.coli* BL21, se indujeron con 1 mM isopropil β -D-tiogalactosido (IPTG) durante 6 horas a 30 °C y 105 rpm, excepto IscU cuyo tiempo de inducción fue de 3 horas en las mismas condiciones. Para inducir 9 l de células, previamente se puso un cultivo de 1 l en LB con sus correspondientes antibióticos que creció toda la noche a 37 °C y 200 rpm. A la mañana siguiente, usando este cultivo, se prepararon los 9 l de LB a una OD₆₀₀ inicial de 0,2. Las células crecieron a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀=0,6-0,7 (aproximadamente 1-2 horas); momento en el cual se procedió a su inducción. Además del agente inductor, se añadieron 2 mM de

cisteína y 0,2 mM de citrato amónico férrico para facilitar la formación de grupos Fe-S. Tras el tiempo óptimo de inducción, las células se centrifugaron durante 15 minutos y a 4 °C a 5000 x g, tras lo cual se congeló el sedimento usando N₂ líquido y se almacenó a -80 °C hasta el momento de su purificación.

Todas las proteínas usadas en esta tesis doctoral, excepto la BfrA, fueron purificadas en anaerobiosis (< 5,0 ppm O₂) usando tampones que habían sido previamente desgasificados usando N₂ durante la noche anterior en una cámara de guantes (CoyLabs, Míchigan, EE. UU.). Las células recombinantes de *E. coli* BL21 (15-20 g) fueron resuspendidas durante 30 minutos en el tampón de lavado correspondiente a su etiqueta en una proporción 1:3 (p/v). En el caso de las proteínas fusionadas al epítipo Strep se usó el tampón W (100 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl) como tampón de lavado, mientras que aquellas proteínas fusionadas a una cola de histidinas se resuspendieron en tampón A (100 mM Tris pH 8,0, 250 mM NaCl). En ambos casos, se añadió 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 0,5 µg/ml de DNasa. Las células resuspendidas se lisaron bajo presión (1500 psi) usando una prensa de French (SLM-AMINCO, Spectronic Instruments, Laguna Hills, EE. UU.). El homogenizado fue centrifugado una hora a 69.000 x g y 10 °C.

La fracción soluble de las proteínas fusionadas al epítipo de Strep fue cargada en una columna de gravedad Strep-Tactin XT de 5 ml (IBA Life Sciences) o una columna de 5 ml Strep-Tactin XT Superflow (IBA Life Sciences) usando una velocidad de 2 ml/min, previamente equilibradas con 20 volúmenes de columna. Una vez cargado el extracto libre de células, la columna se lavó con 20 volúmenes de columna del tampón W, para luego eluirse con 5 volúmenes de columna (o hasta que visualmente se dejó de ver proteína unida a la resina) del tampón E (100 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 50 mM biotina).

En el caso de las proteínas fusionadas a histidinas, la fracción libre de extractos celulares fue suplementada con 5 mM de imidazol antes de ser cargada en una columna de 5 ml Ni-IMAC (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) previamente equilibrada. Después, fue lavada en primer lugar con 10 volúmenes del tampón A suplementado con 6 mM imidazol y luego con 10 volúmenes de tampón A con mayor concentración de imidazol (18 mM imidazol). Posteriormente se eluyó usando 5 volúmenes de columna (o hasta que se dejó de observar proteína en la columna) del tampón B (100 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 400 mM imidazol).

En todos los casos, las proteínas eluidas fueron concentradas con una unidad de filtrado (Amicon Ultra, Millipore, MA, EE. UU) con diferente tamaño de poro según el peso molecular de cada proteína (3 kDa para la GrxD, 10 kDa para IscU y NifQ y 30 kDa para la BfrA, NifU y NifS). Se realizaron centrifugaciones consecutivas a 4.400 x g durante 15 minutos. Después se eliminó la biotina o imidazol usando columnas de desalado PD-10. La columna de desalado PD-10 se equilibró con 20 ml del tampón

de lavado. El volumen final de la muestra a la que se le quería cambiar el tampón en el que se encontraba fue de 2,5 ml. Por último, la proteína fue eluida en 3,5 ml del tampón de interés. Por último, la proteína fue concentrada de nuevo con una unidad de filtrado.

Las proteínas puras fueron congeladas y almacenadas en N₂ líquido. Los métodos BCA (Pierce, IL, USA) y bipiridilo (Moss & Mellon, 1942) fueron usados para determinar la concentración de proteína y hierro, de forma respectiva.

8. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS DE *A. VINELANDII*

Para la purificación de células de *A. vinelandii* se cultivaron 300 l en un fermentador (Bioprocess Bioengineering, Boston, EE. UU.) en dos procesos de 150 l de medio Burk suplementado con acetato de amonio (2,8 mM). La derepresión de las células se produjo cuando los cultivos alcanzaron OD₆₀₀=4,5 de la siguiente manera: el cultivo fue concentrado a 10-15 l usando un sistema de fibras huecas (GE Healthcare, Massachusetts, EE. UU.) y el concentrado de células fue retirado. Se añadió al fermentador medio Burk fresco sin acetato de amonio, se devolvió el concentrado de células y se incubaron en medio sin nitrógeno combinado durante 4 horas. Tras este proceso, las células fueron recogidas y almacenadas a -80 °C hasta el momento de su purificación.

Las purificaciones de H^{NifQ} desde las células de UW300 y MGGAV1 se llevaron a cabo en cámaras de guantes (CoyLabs, Michigan, EE. UU.) con aparatos de purificación GE AKTA Prime Plus (GE Healthcare, IL, Massachusetts, EE. UU.). Las purificaciones se realizaron a 14 °C. Para ello, 115 g de células fueron resuspendidas en una proporción 1:1 (p/v) en tampón C (50 mM Tris pH 7,9, 150 mM NaCl) suplementado con 1 mM PMSF y 0,5 µg/ml DNAsa I dentro de una cámara de guantes (Hernandez *et al.*, 2008). Las células resuspendidas fueron lisadas a 1200 bares de presión usando el sistema de homogenización IKA HPH 2000/4 DH (IKA, Staufen, Alemania). Tras centrifugar a 69.000 xg durante una hora a 10 °C se obtuvo un sobrenadante que corresponde al extracto libre de células. Este extracto fue cargado en una columna empaquetada de Ni²⁺-IMAC de 5 ml (Cytiva, WY, EE. UU.), previamente equilibrada con el tampón C. Una vez que las columnas fueron totalmente cargadas con el extracto libre de células se lavaron en primer lugar usando 20 volúmenes de columna (CV) con el tampón C y después con otros 20 CV del tampón D (50 mM Tris pH 7,9, 500mM NaCl, 25 mM de imidazol). Para la elución de las proteínas se usó un gradiente de 0-300 mM de imidazol en un volumen de 20 ml. Las eluciones más abundantes en H^{NifQ} fueron seleccionadas después de visualizarlas en geles SDS-Coomasie con un 15 % de acrilamida. La proteína H^{NifQ} fue concentrada usando unidades de filtración de 10 kDa (Amicon Ultra, Millipore, MA, EE. UU.) y desalada usando una columna de

desalado Hiprep 26/10, anteriormente equilibrada con el tampón C (Cytiva, Wyoming, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. La proteína purificada fue guardada en pequeñas esferas en nitrógeno líquido. Los métodos BCA (Pierce, IL, USA) y bipyridilo (Moss & Mellon, 1942) fueron usados para determinar la concentración de proteína y hierro, de forma respectiva.

9. ELIMINACIÓN GRUPOS SULFOFÉRRICOS

Los grupos Fe-S de la proteína GrxD fueron eliminados incubando esta proteína con 100 mM EDTA pH 8,0 durante 30 minutos en condiciones aeróbicas. A continuación, la proteína fue desalada en una columna PD-10, siguiendo las indicaciones del fabricante, para eliminar el contenido de EDTA y el hierro liberado en este proceso, y concentrada, posteriormente, con una unidad de filtración de 3 kDa (Amicon Ultra, Millipore, Massachusetts, EE. UU.).

En el caso de NifQ, IscU y los mutantes de NifU, estas proteínas se llevaron a una concentración final de 20 μ M y se incubaron durante 40 minutos con 200 μ M de DTH y 800 μ M de EDTA pH 7,8. Tras esto, el hierro libre fue eliminado en una columna de desalado PD-10 y las proteínas fueron concentradas en la unidad de filtración correspondiente a su tamaño (10 kDa para NifQ, IscU y todos los mutantes de NifU exceptuando C_{35,62,106,272,275}A-NifU, para el cual se usó 30 kDa).

10. RECONSTITUCIÓN DE LOS GRUPOS FE-S DE LAS PROTEÍNAS

Para la reconstitución de GrxD se cambió el tampón en el que se encontraba por el tampón R (50 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM DTT), utilizándose 80 μ M de la proteína. A continuación, se añadió NifS-Strep hasta una concentración de 900 nM. Posteriormente, se fueron añadiendo, en 8 pasos cada 10 minutos, (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ y L-cisteína hasta unas concentraciones de 0,8 mM y 1 mM, respectivamente. Tras toda la noche de incubación a temperatura ambiente y condiciones anaeróbicas se eliminó el hierro no unido usando una columna PD-10 y se concentró con una unidad de filtración de 3 kDa (Amicon Ultra, Millipore, Massachusetts, EE. UU.). El DTT se eliminó mediante diferentes pasos de concentración/dilución con el tampón R.

La reconstitución de la proteína NifU se llevó a cabo usando una concentración final de 20 μ M con 100 mM tampón MOPS pH 7,5. Luego se incorporó DTT hasta 9 mM y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió NifS-Strep hasta 225 nM. Posteriormente, se añadió 1 mM de L-cisteína y 0,4 mM de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂. Ambos, fueron incorporados en 10 pasos esperando entre cada una de ellas 15 minutos para evitar la precipitación del hierro y se incubó 4 horas en hielo desde el comienzo de las adiciones. Tras esto, se diluyó más de 25.000 veces para eliminar el

hierro no unido a la proteína usando una unidad de filtración de 30 kDa (Amicon Ultra, Millipore, Massachusetts, EE. UU.).

Para la reconstitución de la proteína IscU se siguió el mismo procedimiento que con la proteína NifU, salvo que la concentración de NifS fue de 500 nM y la incubación de 4 horas se llevó a cabo a temperatura ambiente. En este caso, la unidad de filtración usada para la eliminación de hierro libre fue de 10 kDa (Amicon Ultra, Millipore, Massachusetts, EE. UU.).

11. RECONSTITUCIÓN DE LA BACTERIOFERRITINA

La reconstitución de la proteína BfrA se llevó a una concentración de 12 μ M en tampón P (100 mM KH_2PO_4 , 10 % de glicerol, 20 mM ácido ascórbico, 5 mM DTT, pH 7,6). Tras 40 minutos de incubación, se eliminó el ácido ascórbico y DTT con una columna PD-10. Posteriormente, en condiciones aerobias, se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ en 10 pasos hasta una concentración de 1,5 mM. Tras toda una noche de incubación, a temperatura ambiente y condiciones aeróbicas, se usó una unidad de filtración de 30 kDa (Amicon Ultra, Millipore, Massachusetts, EE. UU.) para eliminar el hierro no unido a la proteína.

12. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

12.1.1 Espectroscopía de ultravioleta-visible (UV-Vis)

Las proteínas fueron preparadas anaeróbicamente ($< 0,1$ ppm O_2) dentro de la cámara de guantes MBraun en cubetas de cuarzo selladas con septum para evitar la contaminación de O_2 durante las medidas en el espectrofotómetro. Se añadieron 0,25 mg de la proteína purificada en un volumen final de 1 ml en el mismo tampón de lavado que se usó para su purificación. Las muestras fueron escaneadas desde 225 nm hasta 800 nm empujando el espectrofotómetro Shimadzu UV-2600 (Tokio, Japón). El espectro de absorción ultravioleta fue referenciado con otra cubeta con el mismo tampón y sin la proteína. Se restó la absorbancia a 800 nm y el espectro fue normalizado a 280 nm.

12.1.2 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína fue determinada usando el kit BCA Protein Assay (Pierce, IL, USA) o usando el método de Bradford (Kruger, 2009; Smith *et al.*, 1985). En ambos casos se usó una curva de calibración con cantidades conocidas de la proteína BSA (1mg/ml). En el primer caso la proteína se incubó a 37 °C durante 30 minutos con la solución de BCA (98 % compuesto A y 2 % compuesto B). La absorbancia fue determinada a 562 nm. En el Bradford, la proteína fue incubada con este compuesto durante 5 minutos y luego se midió la absorbancia a 595 nm. El método estándar para cuantificar las

proteínas fue BCA, mientras que Bradford únicamente se usó cuando había compuestos, como DTT o Fe, que interferían con el primer abordaje.

12.1.3 Cuantificación de hierro

12.1.3.1 Ensayo de biperidilo

El contenido de hierro fue estimado usando el ensayo de biperidilo (Moss & Mellon, 1942). Este ensayo requiere de una solución estándar de hierro (1 g/l Fe) y agua miliQ para poder realizar una curva de calibración hasta 35 μ M en 200 μ l. Se añadieron 100 μ l de una solución de HCl 0,1 N, tras lo que las muestras fueron incubadas 10 minutos a 80 °C para favorecer la desnaturalización de la proteína y la liberación de hierro. Posteriormente, se añadieron 588 μ l de H₂O MilliQ, 50 μ l de hidroxilamina 20 % (v/v) y 62 μ l de 20 mM de biperidilo. Tras una incubación de una hora a temperatura ambiente, la absorbancia fue determinada a 520 nm. Con la concentración de proteína se estimó el número de átomos de hierro por molécula de proteína.

12.1.3.2 Espectrometría de absorción atómica

Se utilizó el espectrómetro de alta resolución con fuente de radiación continua contrAA800 (Analytikjena, Jena, Alemania), como método más preciso de cuantificación de hierro. La curva de calibración abarca el rango desde 0 hasta 20 ppb de hierro. Para la mineralización de las proteínas en solución, se mezclaron 50 μ l de la proteína en el mismo tampón en el que se encontraba disuelta y 50 μ l de 67 % HNO₃ (v/v) y se incubó la muestra a 80 °C durante una hora. Por último, se enrasó el tubo hasta un volumen final de 1 ml. El protocolo seguido para la atomización de las muestras se encuentra en la Tabla 13:

Tabla 13. Protocolo atomización de hierro

Fase	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Hold (s)	Tiempo (s)
Secado	100	3	25	50
Pirólisis	350	50	10	15
Pirólisis	1100	300	20	22,5
Adaptación del gas	1100	0	5	5
Atomización	2000	1500	10	10,6
Limpieza	2500	500	5	6
Tiempo total/muestra: 146 s				

13. ENSAYOS DE COPURIFICACIÓN

Estos ensayos de copurificación se realizaron bajo condiciones anaeróbicas (COY Laboratories). Para las interacciones GrxD-NifU (incluyendo los mutantes) se usó 10 μ M de cada una de ellas en tampón 100 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl. Ambas proteínas fueron incubadas juntas durante 10 minutos y luego pasadas por la columna Strep-Tactin XT previamente equilibrada con el mismo tampón (100 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl). Para confirmar las interacciones en las fracciones eluyentes se hizo una inmunodetección usando anticuerpos específicos. En las interacciones GrxD-BfrA se usó 10 μ M de GrxD y 240 μ M de BfrA en un tampón 100 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl. La mezcla de ambas proteínas se pasó a través de una columna Strep-Tactin XT tras 10 minutos de incubación. Las interacciones en las fracciones eluyentes fueron verificadas usando anticuerpos específicos en la misma membrana con una inmunodetección. De igual modo, también se comprobó la interacción de la proteína GrxD con IscU usando 10 μ M de cada una de ellas. Las condiciones y tampones usados son los mismos que en las interacciones anteriores (Fig. 15A).

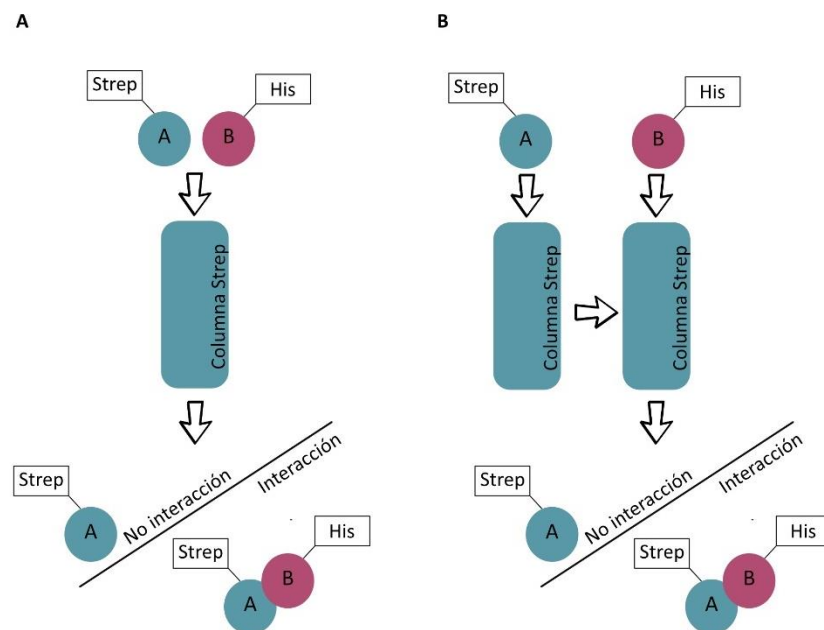


Figura 15. Ensayos de copurificación. A. Estrategia seguida para los ensayos de copurificación de la proteína GrxD. Las dos proteínas (A y B) eran incubadas durante 5 minutos antes de pasar por una columna Streptactin. En el caso de una interacción, ambas proteínas aparecían en las fracciones de elución. **B.** Estrategia seguida para los ensayos de copurificación de la proteína NifQ. En primer lugar, la proteína A, etiquetada con Strep era retenida en la columna Streptactin. A continuación, tras el lavado de la columna, se añadía la proteína B, con un epítipo de His, y se incubaba en la columna durante 5 minutos. La interacción era positiva cuando ambas proteínas eluían al añadir 50 mM de biotina.

Los ensayos de interacción con NifQ (Fig. 15B) se llevaron a cabo usando 10 μ M de NifQ y 10 μ M de NifU/IscU durante 5 minutos en condiciones anaeróbicas. El tampón usado fue 100 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl. Las columnas de Streptactin-XT fueron equilibradas previamente con dicho tampón. En primer lugar, se cargó la proteína fusionada al epítipo Strep (NifU/IscU) y luego se realizaron dos lavados de 2 CV. A continuación, se cargó la proteína $_{\text{H}}$ NifQ y se realizaron 3 lavados de 3 CV. Por último, se eluyó usando el mismo tampón con 50 mM de biotina.

14. INMUNODETECCIÓN

14.1 SDS-PAGE

Las proteínas fueron desnaturalizadas a 95 °C durante 5 minutos con tampón de carga Laemmli para ser desnaturalizadas (Laemmli, 1970). Las proteínas se cargaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) preparados con una zona de enfoque (4 % poliacrilamida) y una zona de separación (12 % o 15 % de acrilamida dependiendo del tamaño de la proteína de interés). La electroforesis se llevó a cabo utilizando el sistema Mini-PROTEAN tetra vertical Electrophoresis Cell (BioRad, Hercules, California, EE. UU.) empleando el tampón desnaturalizante de electroforesis (0,192 M glicina, 0,025 M Tris, 0,1 % SDS (p/v)). La electroforesis se realizó a 20 mA por gel hasta que las muestras pasaron al gel separador, tras lo cual la velocidad se incrementó a 30 mA por gel; manteniendo en todo momento el amperaje constante.

14.2 Tinción del gel de poliacrilamida

Tras la electroforesis, los geles se incubaron con la tinción de *Coomassie Brilliant Blue* (30 % metanol (v/v), 10 % ácido acético, 0,6 mM Coomassie Brilliant Blue R-250) durante al menos 2 horas. Después se destiñeron, en diferentes pasos consecutivos, con la solución de desteñido (40 % metanol (v/v), 10 % ácido acético (v/v)).

14.3 Transferencia de proteínas

Una vez que las proteínas habían sido separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m empleando el sistema Trans-Blot Turbo (BIO-RAD, California, EE. UU.). El gel se transfirió a 2,5 V (voltaje constante) durante 30 minutos. En este proceso se usó el tampón de transferencia (0,192 M glicina, 0,025 M Tris, 20 % metanol (v/v)). Para confirmar la presencia de proteínas en la membrana, esta se tiñó con rojo Ponceau (0,1 % Ponceau S (p/v), 5 % ácido acético (v/v)) durante 5 minutos. La membrana fue desteñida usando en primer lugar agua destilada y luego tampón fosfato.

14.4 Inmunodetección de proteínas

14.4.1 *Proteínas conjugadas a un epítipo de Strep*

La membrana de nitrocelulosa se bloqueó en 5 % de BSA (p/v) en tampón PBS (40 mM KH_2PO_4 , 160 mM Na_2HPO_4 , 1,15 M NaCl, pH 7,4). Se siguieron dos variantes diferentes, dependiendo si se querían ver proteínas puras o proteínas tras un ensayo de copurificación, donde la concentración de proteínas era menor. En el primer caso se usó un anticuerpo antiStrep conjugado a la peroxidasa de rábano (Strep-Tactin HRP conjugate, IBA, Gotinga, Alemania). En este caso, tras el bloqueo de 4 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, se lavó la membrana 3 veces, siendo los dos primeros lavados con PBS con un 0,05 % Tween 20 (v/v) y el último con PBS. Después, se bloqueó la membrana durante 30 minutos con el tampón de bloqueo de biotina (Biotin blocking buffer, IBA). Tras un lavado de un minuto con PBS se usó el anticuerpo con una concentración 1:8000 durante media hora y se volvieron a realizar los 3 lavados previamente mencionados.

En el segundo caso, el bloqueo fue de una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, tras lo cual la membrana de nitrocelulosa fue lavada 3 veces (dos veces con PBS-0,05 % Tween 20 (v/v) y una vez con PBS) y luego se conjugó con el anticuerpo primario StrepMAB (IBA LifeScience) durante 1 h y a una concentración de 1:2000. Tras realizarse el mismo proceso de lavado, se incubó con el anticuerpo secundario monoclonal anti-ratón producido en conejo (Amersham NA934V, Darmstadt, Alemania) durante 1 h y a una concentración de 1:10.000. Tras volver a lavar la membrana se pasó a la detección de la proteína.

En ambos protocolos la detección quimioluminiscente se llevó a cabo empleando el sustrato ECL para el revelado de la inmunodetección (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) en un sistema iBright FL1000 Imaging System (ThermoFisher Scientific).

14.4.2 *Proteínas conjugadas a un epítipo de histidinas*

La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 5 % de leche desnatada en polvo (p/v) en tampón 229 (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2 M NaCl) durante 20 minutos en agitación. Posteriormente se incubó con un anticuerpo primario monoclonal anti-His de ratón (Sc-804, Santacruz, Heidelberg, Alemania) a una concentración 1:1000 durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C con agitación. Luego, la membrana se lavó tres veces durante 5 minutos, siendo los dos primeros lavados con 0,05 % (v/v) de Tween20 en tampón 229 y el último lavado con B229. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario monoclonal anti-ratón producido en conejo y conjugado con la peroxidasa de rábano (Amersham NA934V, Darmstadt, Alemania). El anticuerpo se usó en una concentración 1:1000 y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Se repitieron los mismos 3 lavados

que se realizaron con anterioridad y se detectó, por último, la proteína de interés como se ha explicado en el apartado anterior.

14.4.3 Proteínas NifU, NifQ y NifDK

La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada en tampón PBS con un 5 % de leche desnatada en polvo (p/v) durante 45 minutos. A continuación, se lavó la membrana con 0,05 % Tween20 (v/v) en PBS durante 10 minutos dos veces, para después continuar con otro lavado de 10 minutos con PBS. La membrana se incubó con un anticuerpo específico anti-*A. vinelandii* NifU/ NifQ/ NifDK (1:2500), cedidos por el laboratorio del Dr. Luis Rubio, durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno de ellos, siendo los dos primeros con PBS-Tween 20 (0,05 %) y el último con PBS. Después, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario monoclonal anti-conejo (Goat anti-mouse IgG-HRP conjugated Agrisera) con una concentración 1:5000 (NifU, NifDK y NifS) o 1:15.000 (NifQ) durante una hora. Por último, se volvieron a realizar 3 lavados de 5 minutos (PBS-Tween 20, PBS-Tween 20, PBS) y se reveló la inmunodetección.

14.4.4 Deshibridación de anticuerpos de la membrana

Cuando dos anticuerpos se revelaron en la misma membrana de nitrocelulosa, se realizó un proceso de deshibridación del primer anticuerpo antes de usar el segundo. Para ello, se cubrió la membrana con el tampón de deshibridación (0,2 M glicina, 3,47 mM SDS, 1 % Tween 20 (v/v), pH 2,2) durante 10 minutos dos veces. A continuación, se realizaron dos lavados de 10 minutos con el tampón PBS y, finalmente, se lavó la membrana durante 5 minutos con PBS-0,05 % Tween20 (v/v) dos veces. Posteriormente, se bloqueó la membrana y se continuó con el procedimiento de inmunodetección correspondiente.

15.DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD NITROGENASA EN *A. VINELANDII*

Para el ensayo de actividad nitrogenasa, todos los matraces estriados usados para el cultivo de *A. vinelandii* y los viales de 9 ml para la reacción con el acetileno, fueron incubados durante toda la noche con una solución de 0,2 N HCl para eliminar impurezas de metales. A la mañana siguiente, se realizaron 10 lavados consecutivos con H₂O milliQ antes de ser autoclavados.

El día previo al ensayo se inició un cultivo de 250 ml de cada uno de los genotipos a estudiar, todos ellos cultivados en medio Burk (Strand & Wilson, 1968) (con o sin hierro) (Fig. 16). Al día siguiente, tras refrescar los cultivos en el mismo medio durante 2 horas, se llevaron a medio Burk sin fuente de nitrógeno (condiciones diazotróficas) y con distintas condiciones de hierro: 18 µM (condición estándar), 6 µM y 0 µM; dejándolos crecer durante 4 horas. La actividad nitrogenasa se estudió a través

de la reducción de acetileno (Stewart *et al*, 1967). Un mililitro de cultivo fue incubado con 0,5 ml de acetileno (6 %) a 30 °C durante 15 min en viales cerrados con tapones de goma. Tras parar la reacción con 0,1 ml 8 M NaOH se cogió una muestra de 50 µl por duplicado para analizarla en el cromatógrafo de gases Shimadzu GC-8A (Tokio, Japón). La cantidad de etileno producido fue determinada referenciándolo a la OD₆₀₀ de cada cultivo.

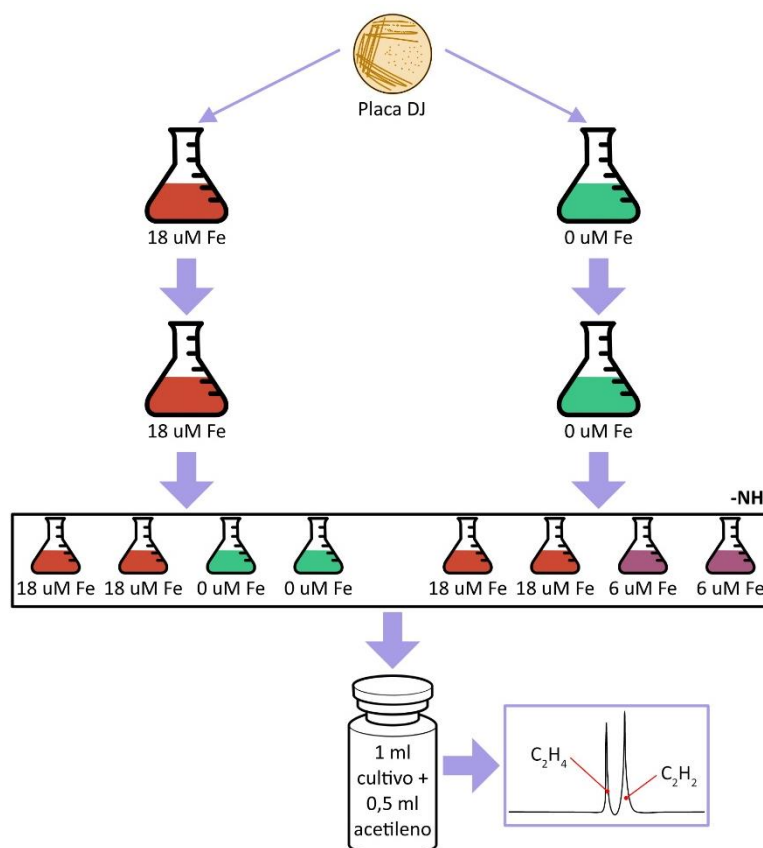


Figura 16. Esquema representativo del ensayo de actividad nitrogenasa dependiente de la concentración de hierro en el medio de cultivo. De una misma placa se cultivaron, de forma paralela, la cepa estudiada en medio Burk con (18 µM) y sin hierro (0 µM). Tras crecer toda la noche estos cultivos se refrescaron en el mismo medio. Tras dos horas de crecimiento, estos medios pasaron a condiciones diazotróficas por replicado. Se estudiaron 4 condiciones: 1) condición control (18 µM Fe), 2) desde un medio con la concentración estándar de hierro (18 µM) a otro sin hierro, 3) desde un medio sin hierro a otro con la cantidad óptima de hierro y, 4) desde un medio sin hierro a otro con un tercio de la concentración estándar de hierro (6 µM).

16. BIOINFORMÁTICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

16.1.1 Búsqueda, comparación y análisis de secuencias

- Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)
- KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) Visualizador genoma *A. vinelandii*
- Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) Alinear secuencias

- Expasy para la traducción de proteínas (<https://web.expasy.org/translate/>) y el cálculo del peso molecular (https://web.expasy.org/compute_pi/)
- BioCyc (https://biocyc.org/organism-summary?object=GCF_000021045). Colección de rutas y genomas específicos que proporcionan información de rutas metabólicas y genómicas para miles de organismos. En esta Tesis Doctoral ha sido utilizada para la predicción de operones.
- Benchling: <https://www.benchling.com/> Diseño de oligonucleótidos y análisis de resultados de secuenciación
- Fiji-ImageJ: Cuantificación de proteínas en membranas
- Affinity Designer 2

Las secuencias usadas en este trabajo aparecen detalladas en la siguiente tabla (Tabla 14):

Tabla 14. Secuencias de proteínas empleadas en esta Tesis Doctoral

Nombre	Organismo	Número de acceso
AvGrxD	<i>A. vinelandii</i>	Avin_14040
AvBfrA	<i>A. vinelandii</i>	Avin_14050
AvNifU	<i>A. vinelandii</i>	Avin_01620
AvlscU	<i>A. vinelandii</i>	Avin_40390
AvNifS	<i>A. vinelandii</i>	Avin_01630
AvNifQ	<i>A. vinelandii</i>	Avin_51040

16.1.2 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se diseñaron con las siguientes herramientas bioinformáticas:

Descarga de secuencias:

- De *A. vinelandii* DJ: <https://www.genome.jp/kegg/>

Análisis de secuencias:

- Clustal Omega: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- Benchling: <https://www.benchling.com/>

Diseño y análisis de oligonucleótidos

- NCBI pimer BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- Primer3Plus: <http://primer3.ut.ee>
- Reverse Complement: http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

16.1.3 Comparación de secuencias y construcción del dendrograma

Para obtener las secuencias homólogas de las glutarredoxinas encontradas en *A. vinelandii* en otros organismos se empleó la base de datos NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Se buscaron proteínas en lugar de genes para poder encontrar homólogos relacionados más distantes. Los parámetros para la búsqueda fueron el uso de una base de datos de proteínas no redundante (*non-redundant protein database*) y un máximo de secuencias (*max target sequence*) de 5000 para que existiera una gran variedad. De entre todas las proteínas encontradas como posibles homólogos no se escogieron más de 4 especies por cada género. Las secuencias obtenidas fueron seleccionadas en base a su *query cover* y valor *e*. La secuencia codificante (CDS) de cada una de las proteínas seleccionadas se añadió al alineamiento del programa informático MEGA. Este alineamiento se hizo en base a la secuencia codónica, de forma que los gaps incorporados no interrumpieran o cambiasen la pauta de lectura. El modelo utilizado en la realización del árbol fue GTR+G+I. Todas las secuencias usadas en dendrograma aparecen detalladas en la siguiente tabla (Tabla 15):

Tabla 15. Códigos de las proteínas empleadas en el dendrograma. Las dos primeras columnas indican al número de acceso (código) y nombre que aparecen en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). En la tercera columna se especifica el organismo en el que se encuentran las diferentes glutarredoxinas. Estas proteínas aparecen en la Figura 23.

Código	Nombre	Organismo
ACO76723	<i>Dithiol-glutarredoxin protein (GrxC)</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ
ACO77621	<i>Glutarredoxin4 protein (GrxD)</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ
ACO81193	<i>Glutarredoxin-related protein (Grx^{nif})</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ
AHY41072	<i>Glutarredoxin</i>	<i>Stutzerimonas decontaminans</i>
AJE22291	<i>Monothiol glutaredoxin, Grx4 family</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i>
AOS98630	<i>Glutarredoxin-4</i>	<i>Microbulbifer aggregans</i>
AQZ94416	<i>Glutarredoxin 3</i>	<i>Halopseudomonas phragmitis</i>
CAH0993411	<i>Glutarredoxin 4</i>	<i>Sinobacterium norvegicum</i>
CJK95748	<i>Monothiol glutaredoxin</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
EAQ97197	<i>Monothiol glutaredoxin, Grx4 family</i>	<i>Congregibacter litoralis</i> KT71
EXD64519	<i>Monothiol glutaredoxin, Grx4 family</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
GJB80990	<i>Glutarredoxin</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
HAN28065	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Haliea salexigens</i>
HBM84841	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Haliaceae bacterium</i>
KAA1188535	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Pseudohalioglobus sediminis</i>

KIL04564	<i>Glutaredoxin</i>	<i>Stutzerimonas stutzeri</i>
KXU38622	<i>Glutaredoxin</i>	<i>Ventosimonas gracilis</i>
MBA1183728	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Stutzerimonas stutzeri</i>
MBB1518969	<i>Glutaredoxin 3</i>	<i>Pseudomonas guryensis</i>
MBC7197734	<i>Glutaredoxin 3</i>	<i>Stutzerimonas balearica</i>
MBE8716958	<i>Arsenate reductase (glutaredoxin)</i>	<i>Cellvibrio polysaccharolyticus</i>
MBF6622680	<i>Glutaredoxin 3</i>	<i>Stutzerimonas stutzeri</i>
MBN0989734	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Amphritea pacifica</i>
MBO2510237	<i>Monothiol glutaredoxin, Grx4 family</i>	<i>Gammaproteobacteria bacterium</i>
MBT11103	<i>Monothiol glutaredoxin, Grx4 family</i>	<i>Oceanospirillaceae bacterium</i>
MBU0838200	<i>Glutaredoxin 3</i>	<i>Gammaproteobacteria bacterium</i>
MBU0884950	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Gammaproteobacteria bacterium</i>
MBU3059062	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Pseudomonas indica</i>
MBV2133133	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Pseudomonas aromaticivorans</i>
MBW4941974	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MCC6076235	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Pseudomonas oryzagri</i>
MCE2029677	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Sessilibacter corallicola</i>
MCJ0972131	<i>Glutaredoxin 3</i>	<i>Pseudomonas marianensis</i>
MCO2198629	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MCP5167772	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Pseudomonadales bacterium</i>
MCQ2042035	<i>Glutaredoxin 3</i>	<i>Stutzerimonas kunmingensis</i>
MCQ4346800	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Stutzerimonas stutzeri</i>
MDF3933573	<i>Glutaredoxin 3</i>	<i>Pseudomonas citronellolis</i>
MDP1519576	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Porticoccus litoralis</i>
MDT3710494	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Pseudomonadaceae bacterium</i>
MDV7210951	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Azotobacter beijerinckii</i>
MDV7211777	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Azotobacter beijerinckii</i>
MRF43150	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Escherichia coli</i>
NHN39712	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Pseudomaricurvus alcaniphilus</i>
ONM42385	<i>Monothiol glutaredoxin, Grx4 family</i>	<i>Halopseudomonas pachastrellae</i>
PLW67504	<i>Monothiol glutaredoxin, Grx4 family</i>	<i>Pseudohalioglobus lutimaris</i>
PLW84085	<i>Monothiol glutaredoxin, Grx4 family</i>	<i>Kineobacterium sediminis</i>
PMR73763	<i>Monothiol glutaredoxin, Grx4 family</i>	<i>Halomonas endophytica</i>
POB03563	<i>Monothiol glutaredoxin, Grx4 family</i>	<i>Halopseudomonas oceani</i>
PTU75817	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Pseudomonas mangrovi</i>
QCW83777	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Methylovulumicrobium buryatense</i>

SAJ13425	<i>Glutaredoxin 3 (Grx3)</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
SCZ17104	<i>Monothiol glutaredoxin</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
SDG62210	<i>Glutaredoxin 3</i>	<i>Pseudomonas benzenivorans</i>
SDS72040	<i>Monothiol glutaredoxin</i>	<i>Pseudomonas oryzae</i>
SDZ90749	<i>Monothiol glutaredoxin</i>	<i>Microbulbifer marinus</i>
SEJ79775	<i>Monothiol glutaredoxin</i>	<i>Pseudomonas linyingensis</i>
SER20092	<i>Monothiol glutaredoxin</i>	<i>Amphritea atlantica</i>
SHE91082	<i>Monothiol glutaredoxin</i>	<i>Microbulbifer donghaiensis</i>
SVJ74738	<i>Glutaredoxin-4</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
TBU98797	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Stutzerimonas kirkiae</i>
TBW10095	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i>
TCK08344	<i>Monothiol glutaredoxin</i>	<i>Marinobacterium mangrovicola</i>
TDG12524	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Seongchinamella unica</i>
TLX55925	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Stutzerimonas nosocomialis</i>
TWH77428	<i>Monothiol glutaredoxin</i>	<i>Azomonas agilis</i>
TXS95135	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Parahalaea aestuarii</i>
UAW97316	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Halopseudomonas nanhaiensis</i>
VTS54647	<i>Monothiol glutaredoxin</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
WOC78798	<i>Grx4 family monothiol glutaredoxin</i>	<i>Stutzerimonas frequens</i>

16.1.4 Análisis estadístico, realización de gráficas y diseño de figuras

GraphPad prism 8 fue usado para los análisis estadísticos y realización de gráficas. Los datos fueron comparados usando análisis de varianza one-way (ANOVA) seguido de un test de comparación múltiple Bonferroni ($p < 0,01$). El programa Affinity Designer 2 fue utilizado para la realización de todas las figuras mostradas en esta Tesis Doctoral.

Resultados

1. DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN DE ISCU EN EL PROCESO DE DONACIÓN DE GRUPOS SULFOFÉRRICOS A NIFQ

1.1 NifQ interacciona con IscU

NifQ proporciona el molibdeno para la síntesis de FeMo-co en muchas bacterias, incluyendo *A. vinelandii* (Hernandez *et al.*, 2008). Para ello, se ha de formar un grupo Mo-3Fe-4S sobre la proteína (Hernandez *et al.*, 2008). Esto requiere de la presencia de grupos sulfoférricos proporcionados por NifU (Barahona *et al.*, 2021). Sin embargo, este resultado no excluye que la otra proteína andamio de *A. vinelandii*, IscU, pueda realizar también esta función. De hecho, la mutación de NifU produce una severa reducción, aunque no la pérdida total, de la actividad nitrogenasa, lo cual implica que IscU puede complementar de forma parcial la actividad de NifU (Dos Santos *et al.*, 2007).

En una primera aproximación se determinó si NifQ e IscU interaccionaban. Para ello, se transformó *E. coli* BL21 con plásmidos que expresaban estas dos proteínas simultáneamente. Para poder diferenciarlos mediante inmunodetección se fusionó a NifQ una cola de histidinas en su extremo C-terminal (NifQ_H) y un epítipo de Strep, en el extremo C-terminal, a IscU (IscU_S). De este modo, un mismo extracto celular pudo ser utilizado para la purificación de ambas proteínas a la vez. Estos transformantes fueron usados para purificar NifQ_H o IscU_S por separado. Sin embargo, en la fracción de la elución de cada proteína se podía detectar la otra (Fig. 17), sugiriendo que ambas interaccionan.

No obstante, este ensayo de copurificación no indica si la interacción es directa (NifQ-IscU) o si es mediada por otras proteínas. Para identificar si la interacción era directa se realizaron ensayos de copurificación a partir de proteínas previamente aisladas de forma independiente. Dado que la interacción de NifQ con NifU ocurre de forma mayoritaria entre la forma apo de NifQ y la reconstituida con grupos Fe-S de NifU (Barahona *et al.*, 2021), se combinaron apo-NifQ_H con IscU_S reconstituida (R-IscU_S). Al igual que ocurría a partir del extracto de *E. coli*, NifQ_H e IscU_S coeluyen (Fig. 18A). Asimismo, esta interacción es específica y no es resultado de una interacción inespecífica con la matriz de la columna de cromatografía ya que la proteína no se queda retenida en la columna (Fig. 18B).

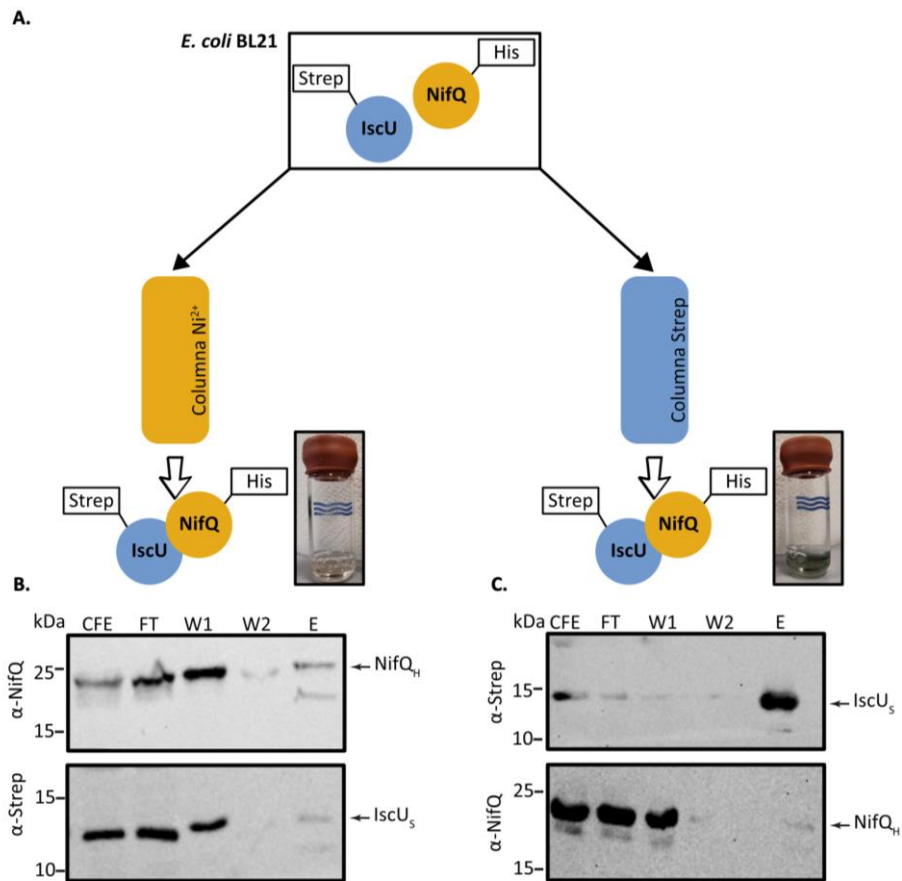


Figura 17. NifQ_H e IscU_S coeluyen al ser coexpresadas en *E. coli*. **A.** Esquema del proceso de purificación de ambas proteínas. En la parte derecha de cada esquema aparece la fracción de elución obtenida al pasar el extracto de *E. coli* por una columna Strep-tactin (izquierda) o de níquel (derecha). **B.** IscU_S coeluye junto con NifQ_H cuando pasan por una columna de Ni^{2+} . En el panel superior se muestran las fracciones correspondientes con el extracto libre de células (*cell free extract*, CFE), flowthrough (FT), lavados (W1, W2) y elución de la inmunodetección con un anticuerpo anti-NifQ. En el panel inferior se observan las mismas fracciones detectadas con un anticuerpo anti-Strep. **C.** NifQ_H coeluye con IscU_S al pasar por una columna Strep-tactin. En el panel superior se muestran las fracciones correspondientes con el extracto libre de células (*cell free extract*, CFE), flowthrough (FT), lavados (W1, W2) y elución de la inmunodetección con un anticuerpo anti-Strep. En el panel inferior se observan las mismas fracciones detectadas con un anticuerpo anti-NifQ. La figura muestra un ensayo representativo (n=2).

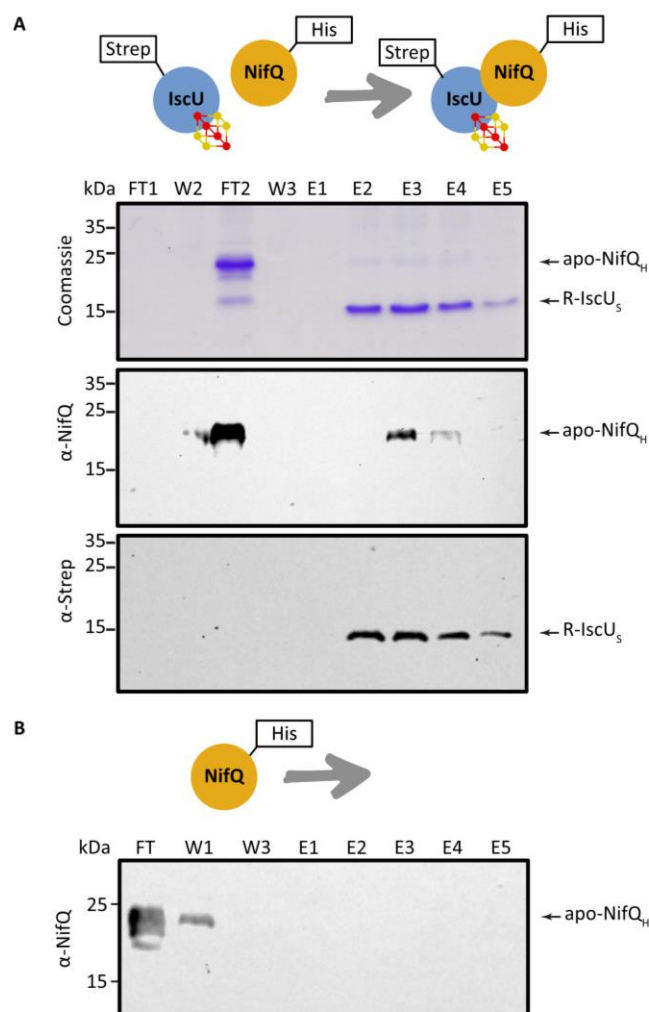


Figura 18. R-IscU₅ interacciona con apo-NifQ_H. **A.** El panel superior muestra la tinción de Coomassie de SDS-PAGE de la separación por cromatografía de afinidad de una solución que contenía R-IscU₅ y apo-NifQ_H. FT1 representa la fracción del flowthrough tras cargar R-IscU₅ en la columna de Strep. W2 representa al segundo lavado. FT2 es la fracción del flowthrough tras cargar en la misma columna apo-NifQ_H. La siguiente fracción es el tercer lavado que se realizó a continuación (W3). Las eluciones están representadas como E1-E5. Los dos paneles inferiores representan las mismas fracciones detectadas con anticuerpos anti-NifQ y anti-Strep, respectivamente. **B.** La proteína NifQ con un epítipo de histidinas no se une a la columna de Strep. Se observan las fracciones del flowthrough (FT), lavados (W1, W3) y eluciones (E1-E5) detectadas con un anticuerpo anti-NifQ. La figura muestra un ensayo representativo (n=3).

1.2 NifU es el principal donador de grupos Fe-S a NifQ *in vivo*

Para comprobar *in vivo* si la proteína NifQ recibe el hierro desde IscU, se expresó la proteína _HNifQ (NifQ con una cola de 9 histidinas en N-terminal) bajo el promotor del gen *nifH* en el mutante *nifU* de *A. vinelandii* DJ105 (Jacobson *et al.*, 1989). Para ello, se generó el mutante MGGAV1 transformando DJ105 (delección desde el aminoácido 115 al 231 de la proteína NifU) con el plásmido pRHB272 (P_{nifH}::his₉-*nifQ*) (Hernandez *et al.*, 2008) mediante selección por ampicilina. Para comprobar que la transformación había funcionado, previo a la purificación, se

detectó la proteína NifQ con un anticuerpo anti-His y un anticuerpo anti-NifDK para comprobar que las células expresaban la nitrogenasa bajo condiciones diazotróficas (Fig. 19).

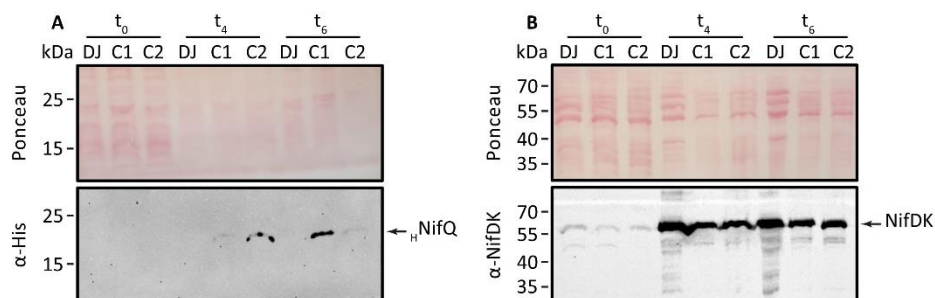


Figura 19. NifQ se expresa en condiciones diazotróficas en MGGAV1. En esta figura se muestra DJ (control *A. vinelandii*) y dos colonias diferentes procedentes de la transformación del plásmido pRHB272 en DJ105 (C1 y C2). Los tres cultivos crecieron de forma simultánea en medio Burk recogiendo una fracción del mismo a distintos tiempos: t_0 (antes de eliminar el acetato de amonio del medio), t_4 (4 horas creciendo en condiciones diazotróficas) y t_6 (6 horas). **A.** En el panel superior se observa la tinción con Ponceau, mientras que en el panel inferior se observa la misma membrana revelada con un anticuerpo anti-His. **B.** Inmunodetección de las proteínas NifDK como control de inducción de las células. En el panel superior se muestra la tinción con Ponceau de las mismas fracciones reveladas con un anticuerpo anti-NifDK en el panel inferior. El resto de los experimentos se realizaron con la colonia 2 de MGGAV1 bajo 4 horas en condiciones diazotróficas.

La proteína NifQ se purificó de forma simultánea en la cepa UW300 (fondo silvestre) (Hernandez *et al.*, 2008) y MGGAV1. La pureza de la purificación y el rendimiento fueron similares: 113 mg NifQ /kg de células UW300 y 165 mg NifQ /kg de células MGGAV1 (Fig. 20A y 20B). No obstante, mediante espectrometría de absorción atómica, se observó que la concentración de hierro obtenida en la cepa silvestre UW300 ($2,58 \pm 0,07$) fue 3 veces superior a la obtenida en la proteína purificada desde el fondo mutante MGGAV1 ($0,8 \pm 0,05$), lo cual queda reflejado en el color de la proteína purificada (Fig. 20C). Este último parámetro indica que la proteína NifU es la principal responsable de la donación de los grupos sulfoferricos a NifQ. La presencia de los grupos Fe-S en una proteína afecta al espectro UV-visible. En la Figura 20D, se observa que el hombro formado en 420 nm en la proteína NifQ procedente de MGGAV1 es inferior al observado en la cepa silvestre UW300.

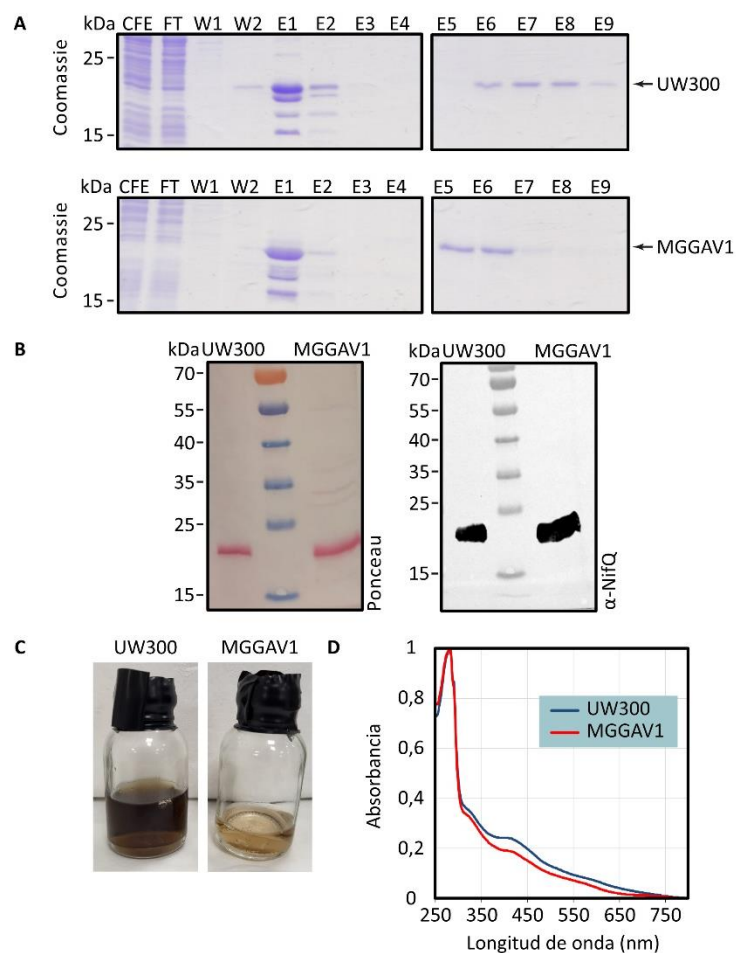


Figura 20. Purificación de NifQ_H de UW300 y MGGAV1. **A.** Tinción de Coomassie correspondiente con la purificación de NifQ_H usando una columna Ni^{2+} de los extractos celulares de *A. vinelandii* UW300 y MGGAV1. Las fracciones observadas son el extracto libre de células (CFE), flowthrough (FT), lavados (W1, W2) y eluciones (E1-E9). Las eluciones seleccionadas para continuar con los siguientes análisis fueron E6-E8 en UW300 y E5-E6 en MGGAV1. **B.** Tinción de Ponceau y detección de NifQ_H procedente de UW300 y MGGAV1 usando el anticuerpo anti-NifQ. **C.** Elución de la proteína NifQ_H procedente de UW300 y MGGAV1. **D.** Espectro UV-visible de NifQ_H procedente de UW300 (azul) y MGGAV1 (rojo).

2. GRXD EN LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

2.1 GrxD en el tráfico de hierro en *A. vinelandii*

Antes de dar comienzo a esta Tesis Doctoral se realizó un ensayo de *pull-down* usando NifU como cebo y un extracto de *A. vinelandii* DJ crecido en condiciones diazotróficas. En este ensayo se identificó a BfrA (Avin_14050) como uno de los interactores. Esto fue validado en un ensayo inverso, en el que usando BfrA como cebo se retenía a NifU. Además, en ambos ensayos se encontró una glutarredoxina, GrxD (Abreu *et al.*, sin publicar). Esta conexión GrxD-NifU-BfrA podría reflejar algún mecanismo de homeostasis de hierro en condiciones diazotróficas.

2.2 Glutarredoxinas en *A. vinelandii* DJ

Con el objetivo de conocer cuántas glutarredoxinas existen en *A. vinelandii* se analizó su genoma (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Uniprot). Se encontraron 3 Grxs: Avin_04690, Avin_14040 y Avin_51060. Debido a que el nombre que reciben cada una de ellas varía en función de la base de datos estudiada, en esta Tesis Doctoral se han anotado como se indica en la Tabla 16. En concreto, dos de ellas forman parte de las glutarredoxinas monotiol, GrxD y Grx^{nif}, mientras que GrxC es de la familia de glutarredoxinas ditiol.

Tabla 16. Genes de las glutarredoxinas en *A. vinelandii*

Nombre del gen	Código del gen	Sitio activo
<i>grxC</i>	Avin_04690	CPYC
<i>grxD</i>	Avin_14040	CGFS
<i>grx^{nif}</i>	Avin_51060	CGFS

Al estudiar el entorno genético de las Grxs, las dos más llamativas son las monotioles (Fig. 21). Grx^{nif} forma parte del grupo menor de los genes *nif* (*nifLAB*, *fdx*, *nifOQ*, *rhDN* y *grx^{nif}*). Aun así, estudios previos en el laboratorio del Dr. Dennis Dean (Virginia Tech, EE. UU.) indican que esta proteína no tiene un fenotipo en actividad nitrogenasa (Dean *et al.*, comunicación personal). Lo que sí se ha demostrado es que existe una transferencia de grupos 2Fe-2S desde IscU a apoGrx^{nif} (Shakamuri *et al.*, 2012). Esta reacción es más rápida en presencia de las cochaperonas HscA y HscB, lo que sustentaría que Grx^{nif} tuviera un papel fisiológico en el tráfico de 2Fe-2S. GrxD se encuentra contigua en el genoma a BfrA, proteína con la coelúa en el *pull-down*. Sin embargo, hasta el momento, no existen datos que establezcan que GrxD tenga un papel en la fijación de nitrógeno.

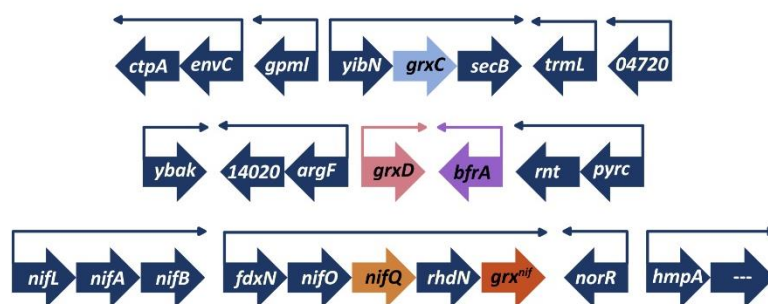


Figura 21. Entorno genético de las glutaredoxinas en *A. vinelandii*. En el esquema se representan los tres genes que codifican para glutaredoxinas y sus correspondientes entornos genéticos. En la parte superior se encuentra *grxC* (Avin_04690). Las otras dos glutaredoxinas pertenecen a la clase II: *grxD* (Avin_14040) y *grx^{nif}* (Avin_51060). Las flechas indican la dirección de la transcripción. Los operones han sido obtenidos desde la base de datos BioCyc.

Al comparar las secuencias de aminoácidos de las 3 glutaredoxinas presentes en *A. vinelandii* no se observa una gran similitud entre ellas, ni aun cuando se comparan las dos Grxs pertenecientes a la familia de las monotiol (Fig. 22A). Para estudiar su estructura terciaria se usó AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021), un programa capaz de predecir de forma precisa, mediante algoritmos de inteligencia artificial, la estructura de las proteínas basándose en datos experimentales procedentes de *Protein Data Bank* (PDB). Así, al comparar las 3 glutaredoxinas se observa que todas ellas contienen 4 láminas beta. En cuanto al número de hélices alfa, GrxC contiene 4 y las dos Grxs monotioles, GrxD y Grx^{nif}, tienen 5 (Fig. 22B).

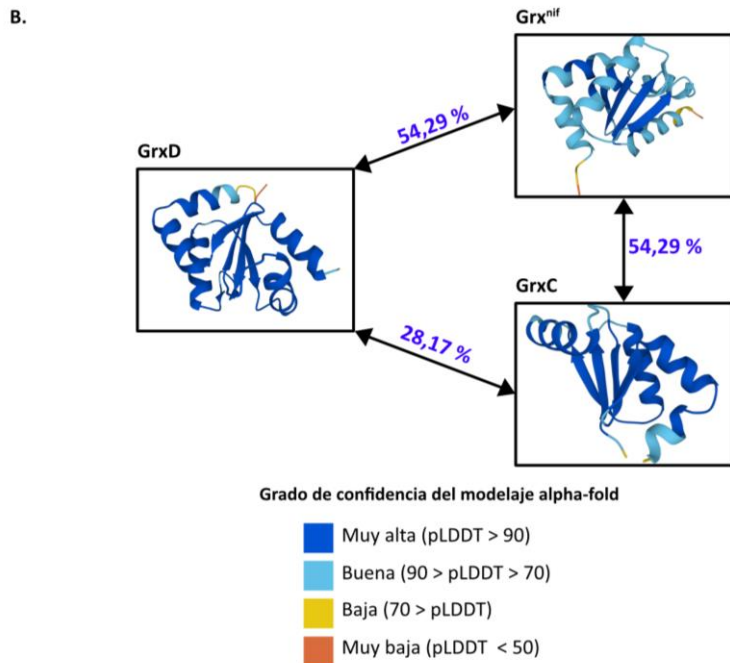


Figura 22. Estructura y homología de las glutarredoxinas existentes en *A. vinelandii*. **A.** Alineamiento de las secuencias de las tres glutarredoxinas. En color verde está señalado el sitio activo de GrxC y en azul el sitio activo de las dos glutarredoxinas monotiol (GrxD y Grx^{nif}). **B.** Estructura terciaria de las AvGrxs. Los colores que comprenden las estructuras obtenidas de AlphaFold hacen referencia al grado de confianza denominada *per-residue confidence score* (pLDDT) (Jumper *et al.*, 2021). Los valores se engloban entre 1-100. En la figura también se encuentra el % correspondiente al grado de similitud a nivel proteico existente entre las tres glutarredoxinas.

Debido a que las tres Grxs encontradas en *A. vinelandii* tienen una baja similitud en su secuencia, se realizó un dendrograma para agrupar las glutarredoxinas de otras bacterias. El algoritmo BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*) fue utilizado con el propósito de encontrar secuencias que alineasen a la secuencia de aminoácidos de cada una de las glutarredoxinas. En el dendrograma (Fig. 23) se observan tres grupos claramente diferenciados. Las tres Grxs encontradas en *A. vinelandii* se localizan en tres grupos diferentes. Las AvGrxs son más similares a las encontradas en otros organismos que entre sí mismas.

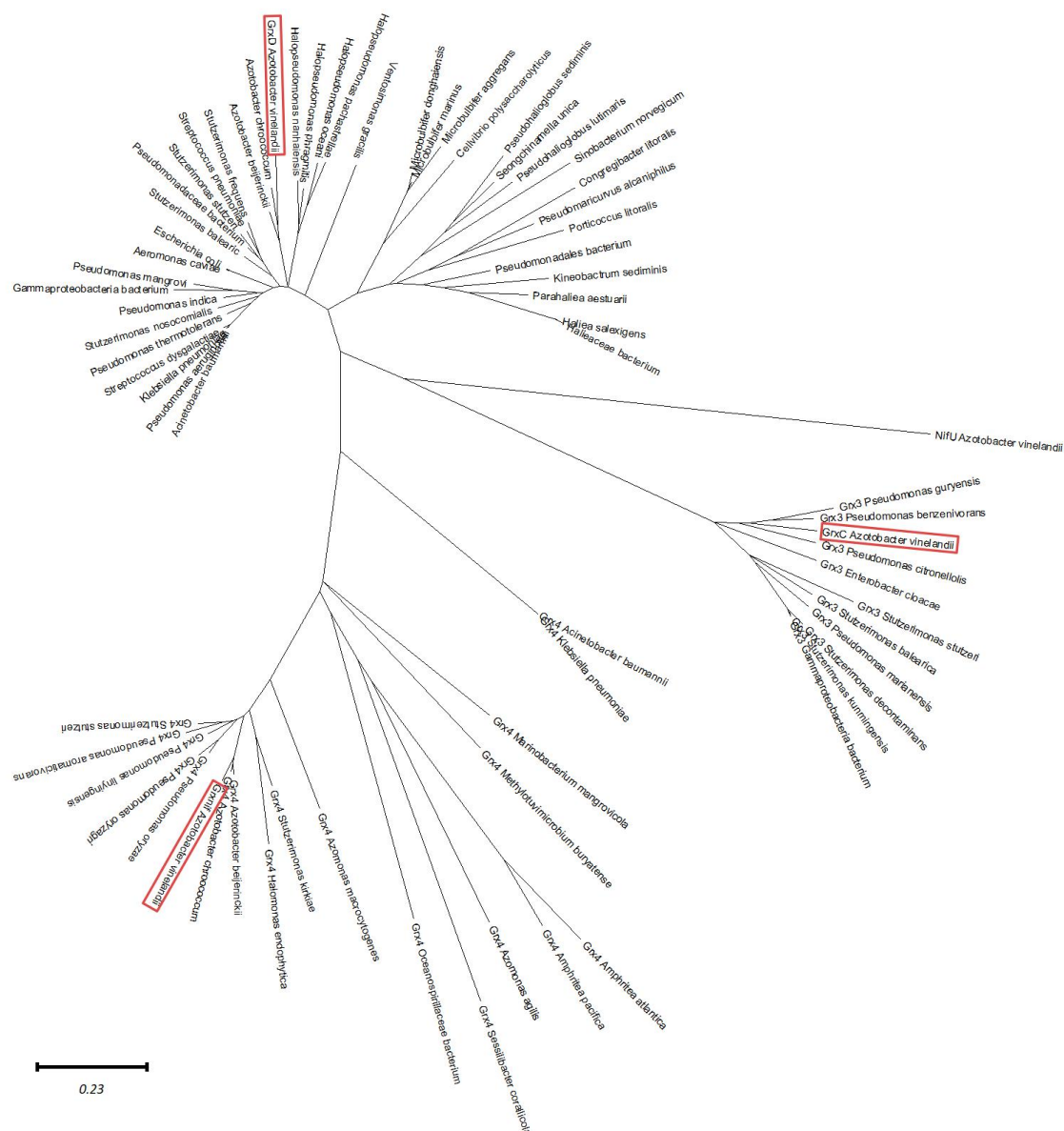


Figura 23. Dendrograma de las glutarredoxinas encontradas en *A. vinelandii*. Árbol de las glutarredoxinas GrxC, GrxD y Grx^{nif} encontradas en *A. vinelandii*. En el dendrograma se observan tres grupos diferenciados pertenecientes a cada una de las Grxs encontradas en *A. vinelandii*. De todos los grupos, el más diverso parece ser al que pertenece la Grx^{nif}. Los códigos de las proteínas empleadas en este dendrograma aparecen en la Tabla 15.

2.3 GrxD interacciona con la proteína BfrA

Para confirmar la interacción GrxD-BfrA se realizaron ensayos de copurificación. En ellos, se fusionó a la BfrA un epítipo Strep en su extremo N-terminal (_sBfrA). Únicamente se podía marcar dicho extremo debido a que es el que queda expuesto al formarse la esfera constituida por las 24 subunidades típica de las bacterioferritinas (Rivera, 2017). La GrxD, por su parte, se fusionó a una cola de histidinas (_HGrxD). Se realizaron ensayos de copurificación entre ambas proteínas en sus distintas formas apo o reconstituidas (Fig. 24). En el caso de la BfrA se utilizó

en su estado apo, en el que solo contiene el hierro correspondiente a los grupos hemo (apo-BfrA) o reconstituida (R-BfrA), con al menos 400 átomos de hierro dentro de su cavidad. Las dos formas usadas de GrxD fueron apo (sin hierro) o reconstituida con dos hierros por monómero (probablemente un grupo 2Fe-2S). De las cuatro condiciones resultantes de combinar los dos estados de estas proteínas, únicamente se observó interacción cuando la BfrA estaba reconstituida y la GrxD no poseía su grupo sulfoférico (Fig. 24A). En el resto de las condiciones (cuando ambas estaban reconstituidas, cuando ambas estaban en su estado apo o cuando únicamente estaba reconstituida la GrxD) no se observó interacción alguna (Fig. 24B, 24C y 24D). Estos datos sugieren que cuando la proteína GrxD posee el grupo sulfoférico 2Fe-2S o cuando la BfrA no está cargada con hierro, no existe interacción o es tan reducida que se encuentra por debajo del límite de detección. Como control de estos ensayos se verificó que la proteína $_H$ GrxD no se uniera a la columna de Strep (Fig. 24E y 24F).

2.4 GrxD interacciona con la proteína NifU

Al igual que con la proteína BfrA, también se confirmó la interacción entre las proteínas GrxD y NifU observada en el *pull-down*. En este caso GrxD estaba fusionada a un epítipo de Strep (GrxD_s) y NifU a un epítipo de histidinas ($_H$ NifU). GrxD se utilizó con (R-GrxD) y sin su grupo sulfoférico (apo-GrxD), mientras que NifU se utilizó únicamente con su grupo 2Fe-2S permanente (apo-NifU) o reconstituida (R-NifU). Esta última forma hace referencia a cuando la proteína NifU une grupos sulfoféricos en sus dominios N- y C- terminales. GrxD y NifU son capaces de interaccionar independientemente del estado de metalación de ambas proteínas (Fig. 25A-D). Esta interacción no se debe a una interacción inespecífica con la columna dado que al pasar la proteína $_H$ NifU por una columna de Strep no se detecta proteína en las fracciones de elución (Fig. 25E y 25F).

A pesar de que se observa interacción en las cuatro condiciones estudiadas, se aprecia que es más intensa cuando una de las dos proteínas está reconstituida. Para poder confirmar este aspecto, se compararon las eluciones de las cuatro posibles interacciones en el mismo gel y se cuantificó la intensidad de cada banda por densitometría (Fig. 26). Al analizar la intensidad de las bandas obtenidas en la inmunodetección se observa que la proporción del área de los píxeles es mayor cuando solo una de las proteínas implicadas en la interacción se encuentra reconstituida. Esto podría deberse a que existe un intercambio de hierro entre ellas.

Esta interacción no es consecuencia de los epítopos fusionados a cada proteína. Cuando estos se intercambian los epítopos la interacción se sigue observando (Fig. 27A). Esta interacción

no se debe tampoco a una unión inespecífica de GrxD en la columna de Strep debido a que cuando se repite el mismo ensayo de copurificación sin añadir γ NifU no se obtiene ninguna proteína en las fracciones de elución (Fig. 27B).

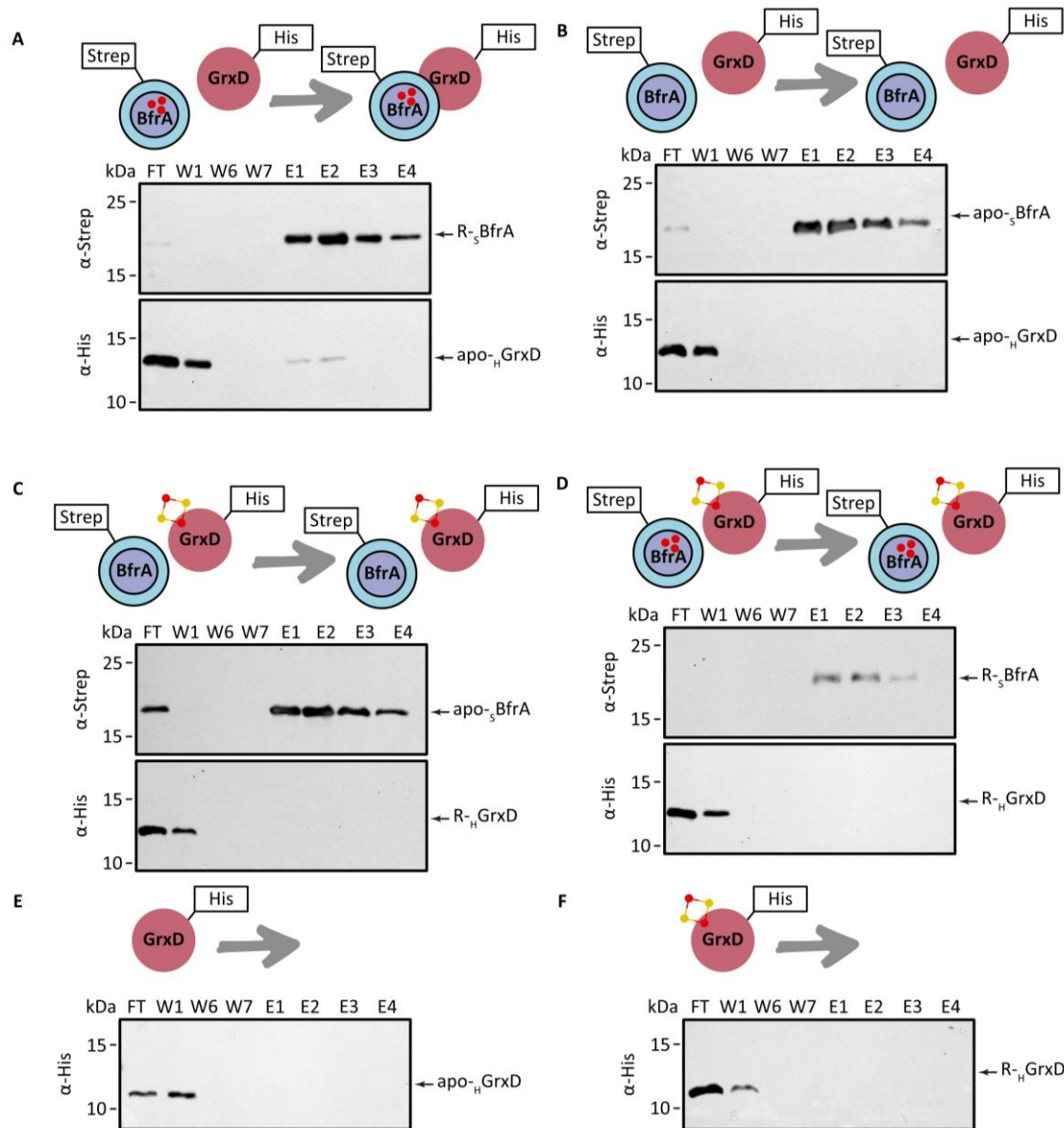


Figura 24. R_5 BfrA interacciona con $apo-HGrxD$. En el panel superior se encuentra la inmunodetección con un anticuerpo anti-Strep de las fracciones del flowthrough (FT), primer lavado (W1), últimos lavados (W6, W7) y eluciones (E1-E4), mientras que en el panel inferior se observan las mismas fracciones detectadas con un anticuerpo anti-His. **A.** Interacción de las proteínas R_5 BfrA y $apo-HGrxD$ tras pasar por una columna Strep-tactin. **B.** Copurificación de las proteínas $apo-5BfrA$ y $apo-HGrxD$. **C.** Copurificación de las proteínas $apo-5BfrA$ y $R-HGrxD$. **D.** Copurificación de las proteínas R_5 BfrA y $R-HGrxD$. **E.** Control de unión de $apo-HGrxD$ a una columna Strep-tactin. Se muestra la detección con un anticuerpo anti-His de las fracciones del flowthrough (FT), primer lavado (W1), últimos lavados (W6, W7) y eluciones (E1-E4). **F.** Control de unión de $R-HGrxD$ a una columna Strep-tactin. La figura muestra un ensayo representativo (n=3).

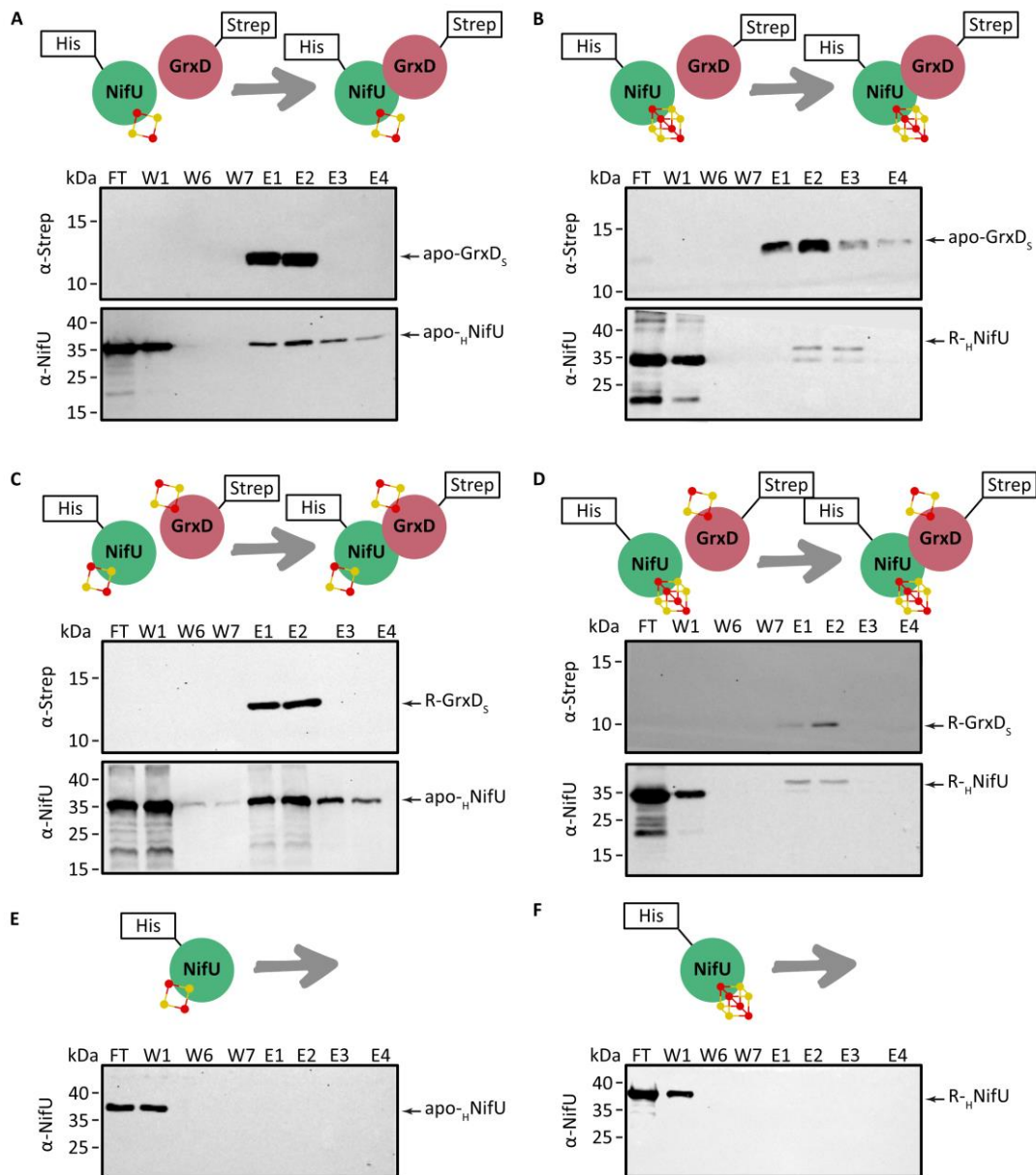


Figura 25. Las proteínas GrxD y NifU interactúan independientemente de su contenido de hierro. A. Ensayo de copurificación entre apo-GrxD₅ y AS-HNifU. Están representadas las fracciones correspondientes al flowthrough (FT), primer lavado (W1), últimos lavados (W6, W7) y fracciones de elución (E1-E4). En el panel superior se encuentra la inmunodetección con un anticuerpo anti-Strep, mientras que en el panel inferior se usó un anticuerpo anti-NifU. **B.** En el panel superior se observa la inmunodetección con un anticuerpo anti-Strep del ensayo de interacción entre las proteínas apo-GrxD₅ y R-HNifU. Además, en el panel inferior se muestran las mismas fracciones usando un anticuerpo anti-NifU. **C.** Interacción entre R-GrxD₅ y AS-HNifU. **D.** Interacción entre R-GrxD₅ y R-HNifU. **E.** La proteína apo-HNifU no se une a la columna Strep-tactin. Inmunodetección con un anticuerpo anti-NifU de la proteína AS-HNifU. **F.** Detección de la proteína R-HNifU con un anticuerpo anti-NifU. La figura muestra un ensayo representativo (n=3).

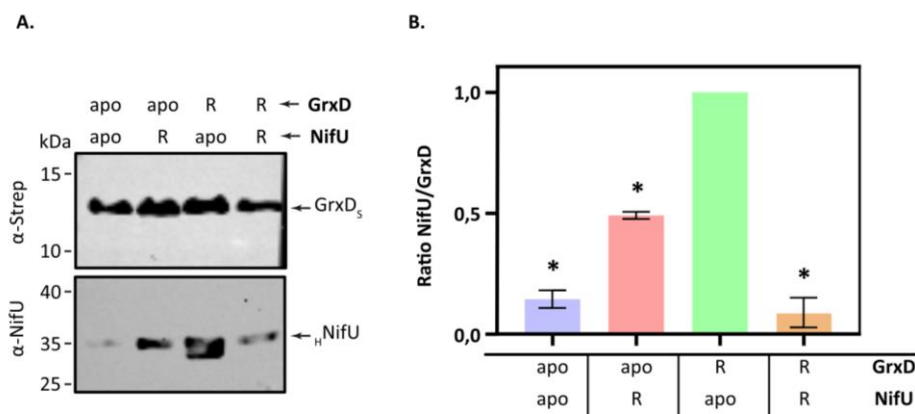


Figura 26. Comparación de la interacción GrxD-NifU en función del estado de metalación de cada una. A. Immunodetección con los anticuerpos anti-Strep y anti-NifU de la segunda fracción de elución obtenida en los ensayos de copurificación entre las proteínas GrxD_s y _HNifU. Las condiciones estudiadas fueron apo-GrxD + apo-NifU; apo-GrxD + R-NifU; R-GrxD + apo-NifU y R-GrxD + R-NifU. La figura muestra un ensayo representativo (n=3). **B.** Cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas en el panel A. El programa ImageJ fue usado para calcular el área correspondiente cada una de las bandas obtenidas en la inmunodetección. Los resultados obtenidos fueron referenciados en base a la tercera condición (R-GrxD + apo-NifU). La gráfica muestra la media ± desviación estándar (n=3).

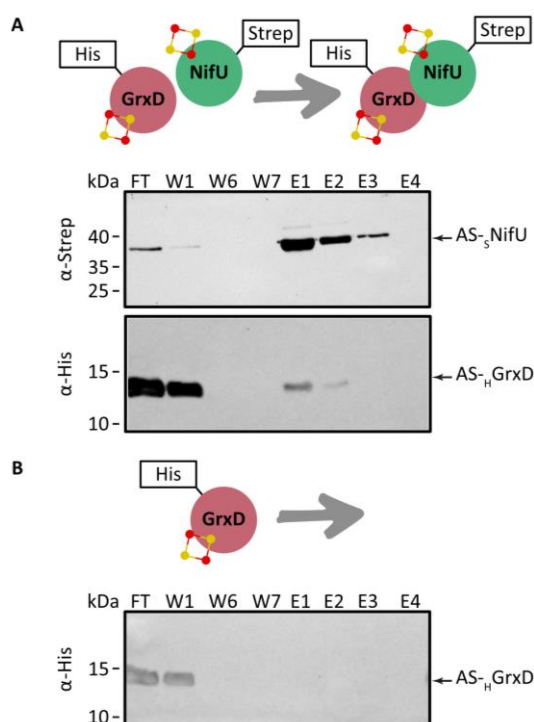


Figura 27. Las proteínas _sNifU y _HGrxD interaccionan. A. En la figura se muestran las fracciones correspondientes con el flowthrough (FT), primer lavado (W1), los últimos lavados (W6, W7) y fracciones de elución (E1-E4) del ensayo de copurificación de las proteínas AS-_sNifU y AS-_HGrxD. En el panel inferior se observa la inmunodetección de las fracciones con un anticuerpo anti-Strep, mientras que en el panel inferior se usó un anticuerpo anti-His. **B.** La proteína AS-_HGrxD no se une a la columna de Strep-tactin. Se muestra la inmunodetección con un anticuerpo anti-His de las fracciones correspondientes con el flowthrough (FT), primer lavado (W1), últimos lavados (W6, W7) y fracciones de elución (E1-E4). La imagen representa un ensayo representativo (n=2).

2.5 Caracterización de la interacción GrxD-NifU

Una vez confirmada la interacción GrxD-NifU, el siguiente paso fue profundizar en la caracterización de la misma. Para ello, era importante comprobar con qué dominio de la proteína NifU estaba interaccionando GrxD, ya que cada dominio tiene una función diferente (Fu *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1998; Agar *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2003). Se generaron dos mutantes de NifU: Δ N-NifU (NifU sin el dominio N-terminal) y Δ C-NifU (NifU sin el dominio C-terminal). GrxD interacciona con ambos mutantes de NifU (Fig. 28A y 28B). Sin embargo, esta interacción parece ser más intensa cuando GrxD interacciona con el mutante Δ C-NifU. Como control negativo de estos ensayos de interacción se pasó cada uno de los mutantes, Δ C-NifU y Δ N-NifU, por una columna de Strep-tactin. No se obtuvo ninguna señal en las fracciones de elución al hacer la inmunodetección con un anticuerpo anti-His, lo que indica que la interacción de los mutantes con GrxD es específica (Fig. 28C y 28D).

El hecho de que GrxD interaccionase con ambos mutantes implicaba dos posibilidades. Por un lado, GrxD interaccionaba con ambos dominios (N y C) o GrxD interaccionaba con el dominio central. Para validar la segunda opción, se generó un mutante de la proteína NifU que solo contenía el dominio central (*core*-NifU). Sin embargo, al realizarse los ensayos de copurificación de la proteína GrxD con el mutante *core* de NifU no se obtuvo interacción entre ambas proteínas, independientemente de si el mutante *core* se encontraba en su forma apo- o *as-isolated* (AS). Esta última es la forma en la que se obtiene el mutante al realizarse la purificación (Fig. 29A y 29B), con una cantidad de $0,7 \pm 0,01$ Fe/monómero.

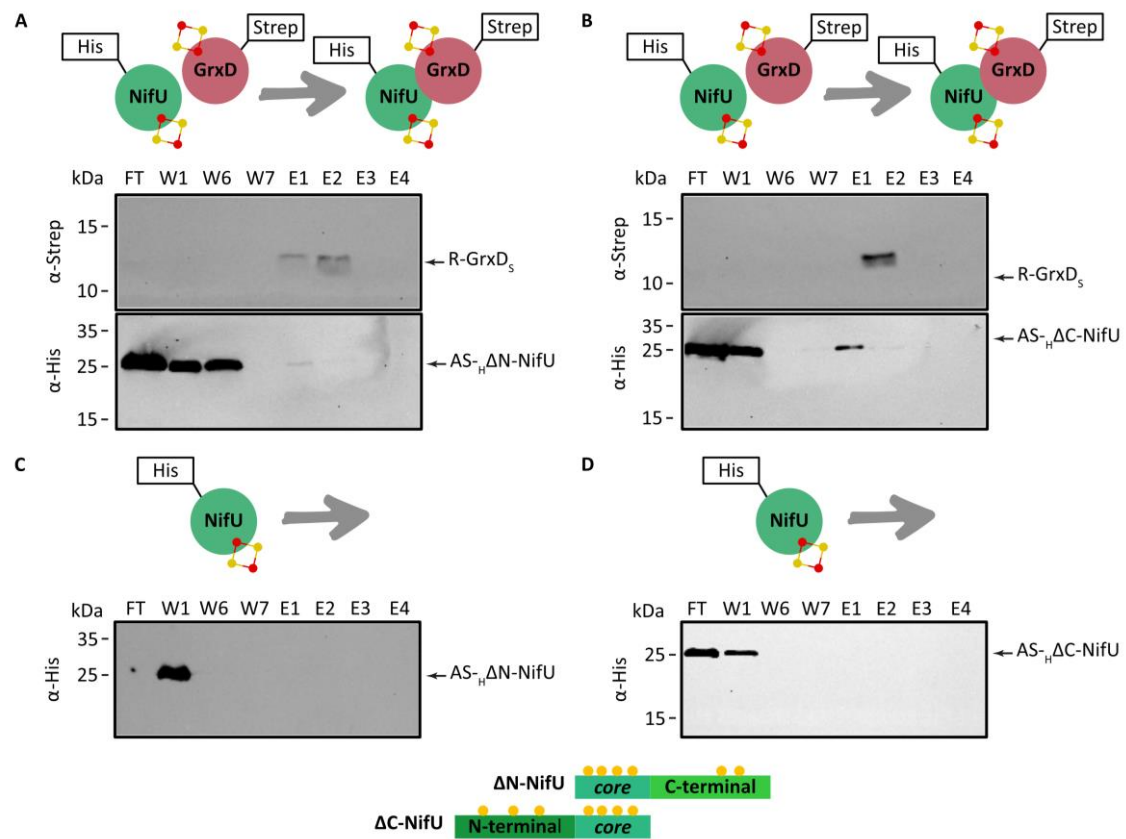


Figura 28. GrxD interacciona con ΔN -NifU y ΔC -NifU. **A.** GrxD interacciona con el mutante sin el dominio N-terminal de NifU (ΔN). Se representan las fracciones correspondientes con el flowthrough (FT), primer lavado (W1), últimos lavados (W6, W7) y las fracciones de elución (E1-E4) del ensayo de copurificación entre las proteínas R-GrxD_s y AS-H ΔN -NifU. En el panel superior se encuentra la inmunodetección con un anticuerpo anti-Strep, mientras que el panel inferior se ha usado un anticuerpo anti-His. **B.** GrxD interacciona con el mutante de NifU sin el dominio C-terminal (ΔC). En el panel superior se observan las fracciones detectadas con un anticuerpo anti-Strep, mientras que en el inferior se observan las mismas fracciones observadas con un anticuerpo anti-His. **C.** El mutante ΔN -NifU con un epítipo de His no se une a la columna de Strep-tactin. Inmunodetección con un anticuerpo anti-His de las fracciones correspondientes con el flowthrough (FT), primer lavado (W1), últimos lavados (W6, W7) y fracciones de elución (E1-E4) del mutante de NifU sin el dominio N-terminal ΔN . **D.** Control negativo del panel B. Mismas fracciones detectadas con un anticuerpo anti-His del mutante de NifU sin el dominio C-terminal (ΔC). La figura muestra un ensayo representativo (n=2).

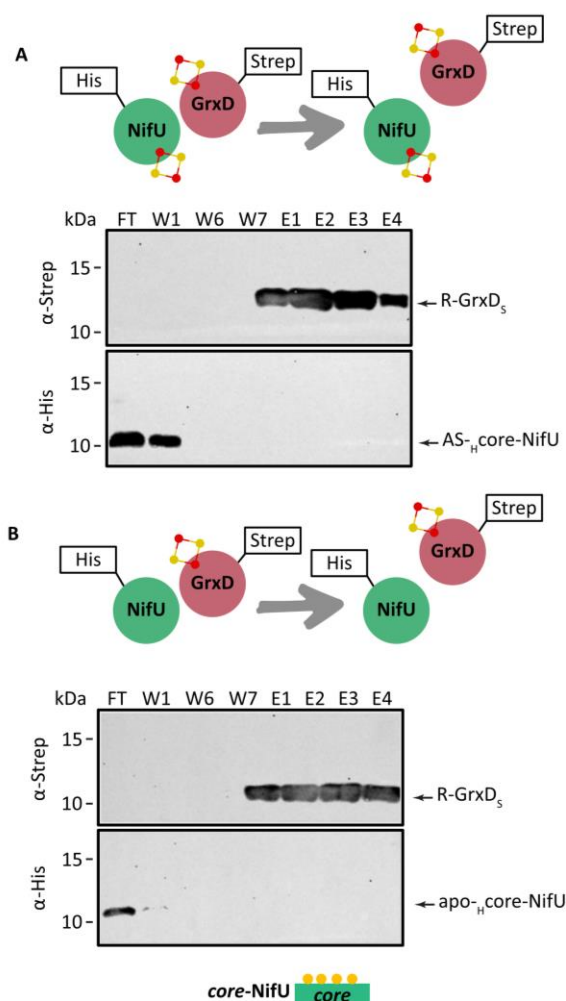
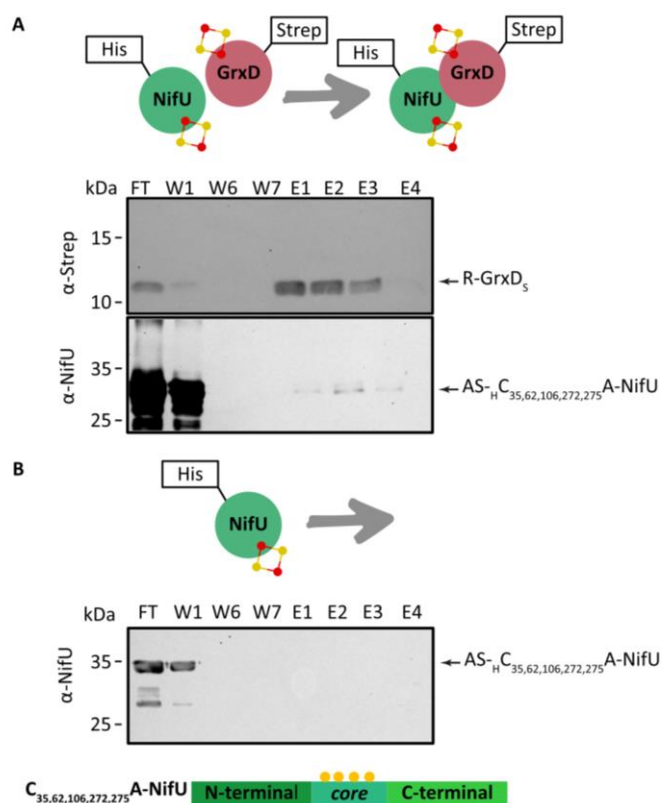


Figura 29. GrxD no interacciona con el dominio central de la proteína NifU. **A.** Fracciones del flowthrough (FT), primer lavado (W1), últimos lavados (W6, W7) y fracciones eluyentes del ensayo de copurificación de las proteínas R-GrxD₅ y AS_{-H}core-NifU. En el panel superior se observan las fracciones detectadas con un anticuerpo anti-Strep, mientras que el panel inferior se usó un anticuerpo anti-His. **B.** Mismo ensayo de copurificación que en el panel A pero usando en este caso el mutante *core* de NifU sin hierro (apo). En el panel superior se observan las fracciones detectadas con un anticuerpo anti-Strep, mientras que en el panel inferior se observan las mismas fracciones observadas con un anticuerpo anti-His. La figura muestra un ensayo representativo (n=3).

Bajo el supuesto de que esta interacción podría deberse a un intercambio de grupos sulfoferricos entre GrxD y NifU, si GrxD interaccionaba con los dominios N- y C- terminal de NifU esta interacción debería producirse en los residuos de cisteína que coordinan los grupos sulfoferricos en los dominios N o C de NifU. Por ello, se generó un nuevo mutante de NifU: C_{35,62,106,272,275}A-NifU. Este mutante tenía mutados los residuos de cisteína por alanina en los dominios N y C. No obstante, sí se observó interacción entre GrxD y el mutante C_{35,62,106,272,275}A-NifU (Fig. 30A). La presencia de la proteína mutante C_{35,62,106,272,275}A-NifU en las fracciones de elución es debida a la interacción con GrxD porque cuando GrxD₅ no está presente no se detecta C_{35,62,106,272,275}A-NifU en las fracciones de elución (Fig. 30B).



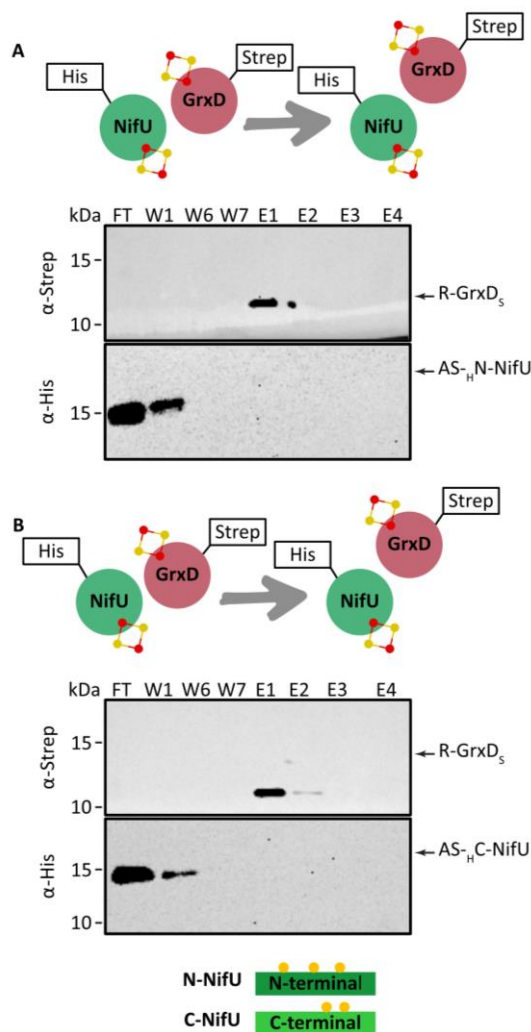


Figura 31. La proteína GrxD no interacciona con los dominios N y C de la proteína NifU de forma individual. A. Ensayo de copurificación de la proteína GrxD_S en su estado holo y el mutante del dominio N-terminal *as-isolated* (AS-N_HNifU). En el panel superior se observan las fracciones del flowthrough (FT), primer lavado (W1), últimos lavados (W6, W7) y las fracciones de elución (E1-E4) detectadas con un anticuerpo anti-Strep. Por otro lado, en el panel inferior se observan las mismas fracciones detectadas con un anticuerpo anti-His. **B.** Ensayo de interacción entre R-GrxD_S y el mutante del dominio C-terminal de NifU (AS-C_HNifU). En el panel superior se observa la inmunodetección con un anticuerpo anti-Strep, mientras que en el panel inferior con un anticuerpo anti-His, de las mismas fracciones mencionadas en el panel A. Las imágenes muestran un ensayo representativo (n=2).

Ninguna de las interacciones de GrxD con los dominios aislados (N-NifU, *core*-NifU y C-NifU) han sido positivas. Esto podría significar que los dominios de forma independiente no son funcionales. Una manera de comprobar la funcionalidad de los dominios fue someterlos a un proceso de reconstitución en el que adquirirían los grupos sulfotérricos correspondientes, donde el incremento de hierro se cuantificó mediante espectrometría de absorción atómica. De todos ellos, solo se observó un incremento en el contenido de hierro en el mutante N-NifU (Fig. 32). El *core* de NifU no se pudo reconstituir de forma independiente, pero sí se logró reconstituir

el mutante $C_{35,62,106,272,275}$ A-NifU, lo que indica que el dominio *core* aislado no tiene el plegamiento correcto. De este modo, solo podemos concluir de forma sólida que GrxD no interacciona con el dominio N de NifU aislado, pero los datos negativos en la interacción con los otros dos motivos pueden deberse simplemente a un plegamiento incorrecto de los dominios aislados.

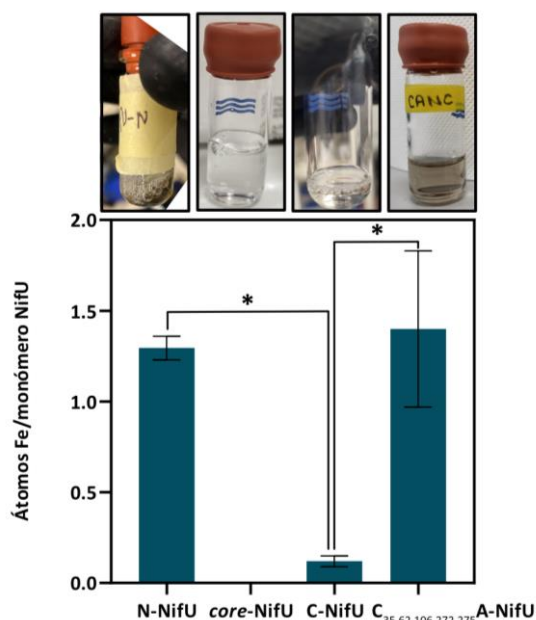


Figura 32. Reconstitución de los mutantes de NifU. En la parte superior del panel se observan los mutantes de NifU tras toda la noche de incubación. El panel inferior representa la media $\pm$ desviación estándar procedente de la cuantificación de hierro obtenida por monómero de la proteína mutada de NifU ($n=2$). El asterisco (*) indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

2.6 Grx5 interacciona con la proteína IscU

Al igual que en el caso de la interacción NifU-NifQ, también se quería confirmar si NifU-GrxD es una interacción específica o si GrxD también puede interaccionar con IscU. Para ello, se realizaron ensayos de copurificación entre ${}_H$ GrxD en su estado apo y reconstituida e ${}_S$ IscU en su forma apo tras eliminar los grupos sulfoferricos y su forma reconstituida. GrxD también interacciona con la proteína andamio IscU (Fig. 33). Esta interacción solo ocurre cuando la IscU está reconstituida, independientemente del estado metálico de la proteína GrxD. Este no es el resultado de una interacción inespecífica de la proteína ${}_H$ GrxD con la columna Strep-tactin ya que no se observa dicha proteína cuando no se añade ${}_S$ IscU a la mezcla (Fig. 24E y 24F).

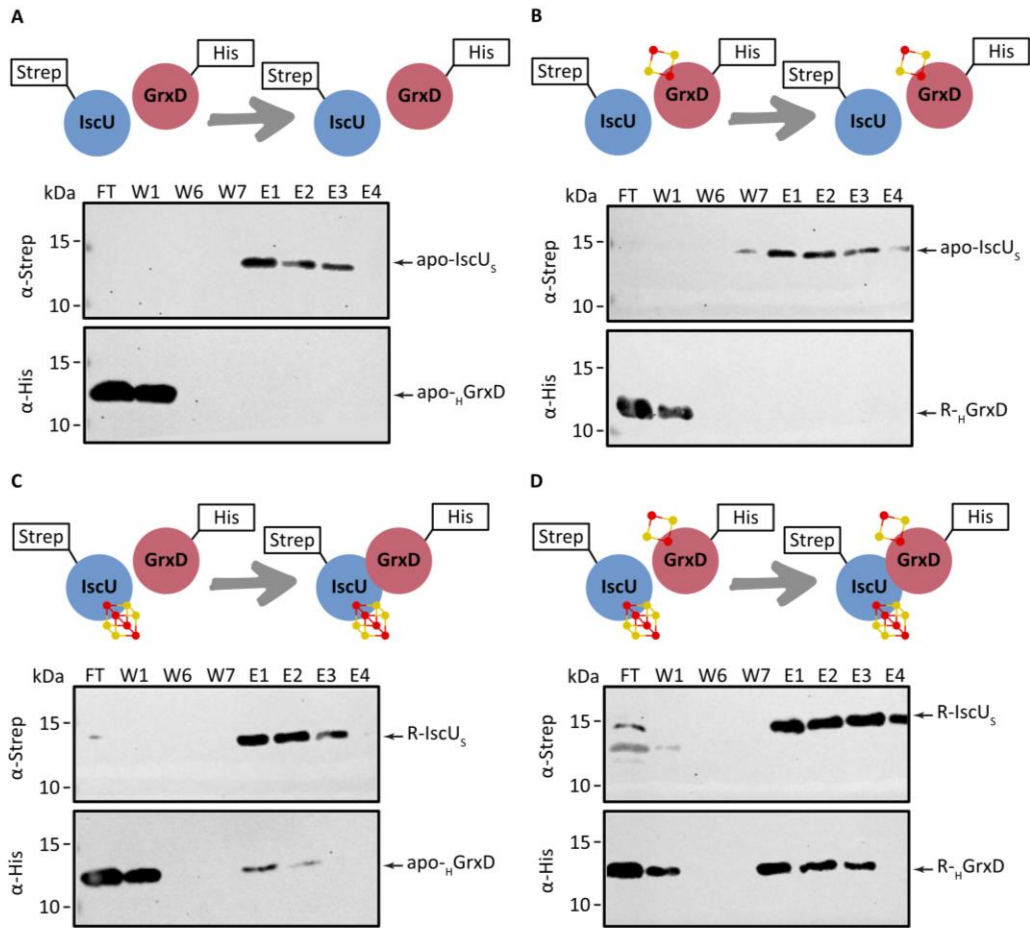


Figura 33. R-IscU₅ interacciona con apo-HGrxD y R-HGrxD. **A.** IscU₅ y HGrxD no interaccionan cuando ambas proteínas se encuentran en su estado apo. En el panel superior se muestran las fracciones del flowthrough (FT), el primer lavado (W1), los últimos lavados (W6, W7) y las diferentes fracciones de elución (E1-E4) de una mezcla de las proteínas apo-IscU₅ y apo-HGrxD detectadas un anticuerpo anti-Strep. En el panel inferior se observan las mismas fracciones detectadas con un anticuerpo anti-His. **B.** apo-IscU₅ no interacciona con la proteína HGrxD reconstituida. En el panel superior se observan las fracciones FT, W1, W6, W7, E1-E4 obtenidas tras la incubación de las proteínas apo-IscU₅ y R-HGrxD detectadas con un anticuerpo anti-Strep. En el panel inferior se observan las mismas fracciones tras la inmunodetección con un anticuerpo anti-His. **C.** Las proteínas R-IscU₅ y apo-HGrxD interaccionan. En el panel superior se observa la proteína IscU detectada con el anticuerpo anti-Strep tras ser incubada con apo-HGrxD. Las fracciones que se observan son las mismas que en los apartados A y B. En el panel inferior se muestra la inmunodetección de las mismas fracciones con el anticuerpo anti-His. **D.** Las proteínas IscU₅ y HGrxD interaccionan cuando ambas están reconstituidas. En el panel superior se observa la inmunodetección con un anticuerpo anti-Strep de las fracciones FT, W1, W6, W7, E1-E4 tras la incubación de 5 minutos de ambas proteínas. En el panel inferior se observan las mismas fracciones detectadas con un anticuerpo anti-His.

A continuación, en la Tabla 17, se encuentran detalladas todos los ensayos de interacción realizados con la proteína GrxD.

Tabla 17. Resumen de los ensayos de interacción con la proteína GrxD realizados en una columna Strep-tactin. La proteína 1 es la proteína con un epítipo de Strep (S) y la proteína 2 es la proteína marcada con un epítipo de histidina (H).

Mezcla	Proteína 1	Proteína 2	Interacción
GrxD + BfrA	AS-sBfrA	apo-HGrxD	No
	holo-sBfrA	apo-HGrxD	Sí
	AS-sBfrA	holo-HGrxD	No
	holo-sBfrA	holo-HGrxD	No
GrxD + NifU	apo-GrxD _s	AS-HNifU	Sí
	apo-GrxD _s	holo-HNifU	Sí
	holo-GrxD _s	AS-HNifU	Sí
	holo-GrxD _s	holo-HNifU	Sí
	holo-NifU _s	apo-HGrxD	Sí
GrxD + mutantes NifU	holo-GrxD _s	AS-ΔC-HNifU	Sí
	holo-GrxD _s	AS-ΔN-HNifU	Sí
	holo-GrxD _s	AS-CANC-HNifU	Sí
	holo-GrxD _s	AS-core-HNifU	No
	holo-GrxD _s	apo-core-HNifU	No
	holo-GrxD _s	AS-C-HNifU	No
	holo-GrxD _s	AS-N-HNifU	No
GrxD + IscU	apo-IscU _s	apo-HGrxD	No
	holo-IscU _s	apo-HGrxD	Sí
	apo-IscU _s	holo-HGrxD	No
	holo-IscU _s	holo-HGrxD	Sí

2.7 GrxD es necesaria para una óptima actividad nitrogenasa

2.7.1 El gen *AvgrxD* es preciso para una idónea actividad nitrogenasa

GrxD interacciona con NifU e IscU, proteínas implicadas en la biosíntesis de los grupos sulfoférricos (Agar *et al.*, 2000a, 2000b; Johnson *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005), y con BfrA, proteína que actúa como almacenaje y fuente de hierro (Abdul-tehrani *et al.*, 1999; Yasmin *et al.*, 2011; Rivera, 2017, 2023). Por ello, se hipotetizaba que GrxD podría tener un papel en la homeostasis de hierro en *A. vinelandii*. Para comprobarlo, se generó el mutante MGGAV2 mediante la inserción de un casete de kanamicina en el lugar del gen *grxD*. Ambas cepas, DJ y MGGAV2, fueron sometidas a 4 horas de derepresión de nitrogenasa antes de iniciar los ensayos de actividad de reducción de acetileno.

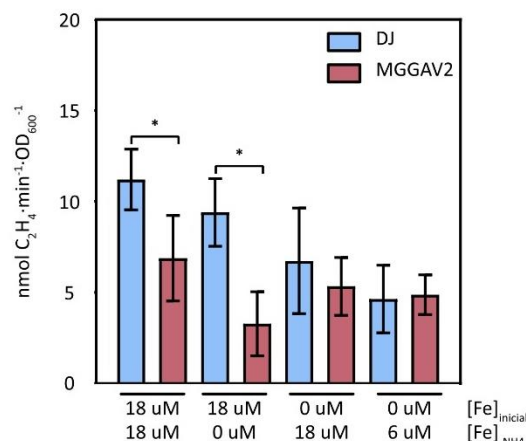


Figura 34. El mutante MGGAV2 tiene afectada su actividad nitrogenasa. En la gráfica se muestra que el mutante en *grxD* tiene menor actividad nitrogenasa que la cepa DJ en condiciones estándar. En la segunda condición (+Fe/-Fe), cuando las cepas tienen que usar las reservas de hierro obtenidas antes de pasar a condiciones diazotróficas, el mutante tiene un mayor defecto para fijar nitrógeno que en las condiciones control. En las dos últimas condiciones (-Fe/+Fe y -Fe/+1/3 Fe) no se aprecian diferencias significativas entre ambas cepas. Las gráficas muestran la media $\pm$ SD (n=3). El asterisco (*) indica diferencias significativas (P < 0,05).

En estos ensayos se cultivaron las cepas a distintos niveles de hierro, tanto en los precultivos como en los cultivos. De este modo, se podía evaluar no solo la existencia de un fenotipo sino también su demanda del hierro presente en el cultivo y el guardado en sus reservas (precultivo). Así se realizaron dos condiciones de precultivo (con suficiencia de hierro, 18 μ M, o en deficiencia, 0 μ M de hierro añadido) y tres de cultivo (18 μ M, 6 μ M y 0 μ M de hierro) (Fig. 16). En la Figura 34 se muestra que en condiciones control (+Fe/+Fe) se observan diferencias significativas entre la cepa silvestre y el mutante, teniendo este último una menor actividad nitrogenasa. Además, este fenotipo fue más pronunciado cuando los cultivos crecieron en medio Burk con las condiciones óptimas de hierro (18 μ M) y luego pasaron a un medio sin hierro y en condiciones diazotróficas. Sin embargo, cuando estas cepas se cultivaron en un medio Burk sin hierro para luego seguir creciendo en condiciones diazotróficas en medio Burk con hierro o un tercio del mismo (6 μ M), no se aprecian diferencias significativas entre ambos genotipos. Esto puede deberse a la dificultad que tienen las células de *A. vinelandii* para crecer sin hierro. Cuando se probó la condición -Fe/-Fe no se obtuvieron niveles cuantificables de actividad nitrogenasa en ambas cepas.

2.7.2 El fenotipo del mutante MGGAV2 es debido a la delección de gen *grxD*

Basado en programas informáticos de predicción de operones, *grxD* no comparte operón con ningún otro gen (Fig. 21). Aun así, se encuentra contiguo a otro gen relacionado con el metabolismo de hierro, *bfrA*. Para poder asegurar que el fenotipo observado en el mutante

MGGAV2 es debido a la ausencia del gen *grxD*, y no a la inserción del casete de la kanamicina o a la afección de *bfrA*, se realizaron dos aproximaciones diferentes. Por un lado, se generó un nuevo mutante con una delección en fase (MGGAV3) con el objetivo de comparar el fenotipo observado previamente con el mutante insercional con kanamicina (MGGAV2). Por otro lado, se transformó MGGAV2 con la secuencia codificante de *grxD* como otro método para confirmar que el fenotipo es debido a la delección de este gen al complementar el fenotipo mutante.

En la Figura 35A se observa que el nuevo mutante MGGAV3 tiene, al igual que MGGAV2, menor actividad nitrogenasa que la cepa silvestre DJ en condiciones estándar de crecimiento. Asimismo, el mutante complementado con la región codificante de *AvgrxD* (MGGAV4) vuelve a tener unos niveles de actividad nitrogenasa similares a los de la cepa silvestre DJ. Resultados similares se obtuvieron cuando los cultivos pasan de un medio con hierro a otro sin añadirle este metal (Fig. 35B).

2.7.3 *Los genes grxD y bfrA parecen intervenir en la misma ruta en la actividad nitrogenasa*

Se generó un doble mutante *bfrAgrxD* (MGGAV6) para estudiar si la función de *grxD* y *bfrA* eran acumulativas. El mutante simple en *bfrA* (MGGAV5) y MGGAV6 se usaron para repetir los mismos ensayos realizados con el mutante simple *grxD* (MGGAV2); obteniendo resultados similares (Fig. 36). Los tres mutantes fijan menos nitrógeno que la cepa silvestre. Esto sugiere que ambos genes, *grxD* y *bfrA*, además de encontrarse en el mismo entorno genético, podrían estar actuando en la misma vía de donación de hierro a la nitrogenasa.

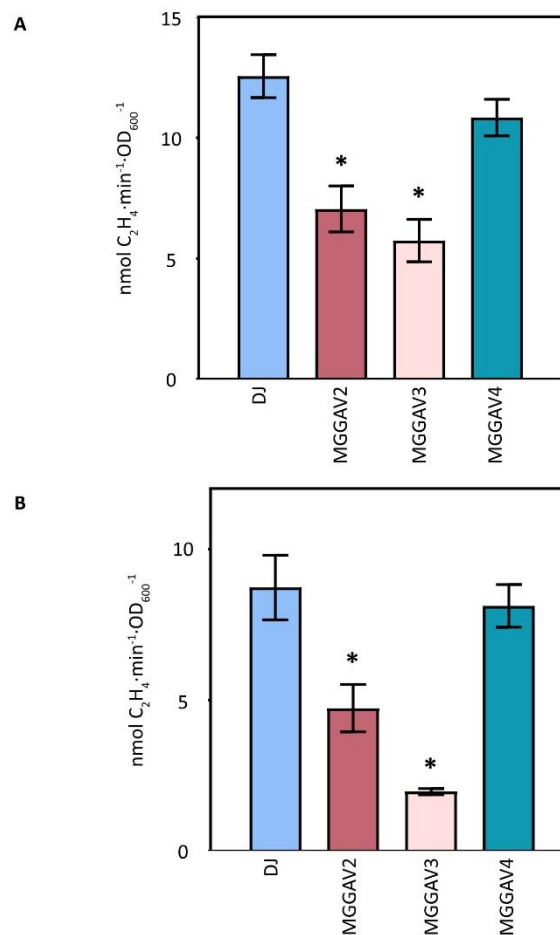


Figura 35. Ensayo de actividad nitrogenasa con las cepas DJ y los mutantes MGGAV2, MGGAV3 y MGGAV4. A. Condiciones estándar. En esta imagen se muestra que los mutantes en *grxD* (MGGAV2, MGGAV3) tienen menos actividad que la cepa silvestre y que al complementarse (MGGAV4) se adquieren valores similares al DJ. La gráfica muestra la media $\pm$ desviación estándar (n=3). **B.** Fenotipo de actividad nitrogenasa en el mutante MGGAV2 cuando pasa de un medio con hierro a otro sin el mismo. En la gráfica se observa que los mutantes MGGAV2 y MGGAV3 tienen menor actividad nitrogenasa que la cepa silvestre DJ. Además, al complementarse MGGAV2 se recuperan los niveles de actividad nitrogenasa. La gráfica muestra la media $\pm$ desviación estándar (n=3). El asterisco (*) indica diferencias significativas (P < 0,05).

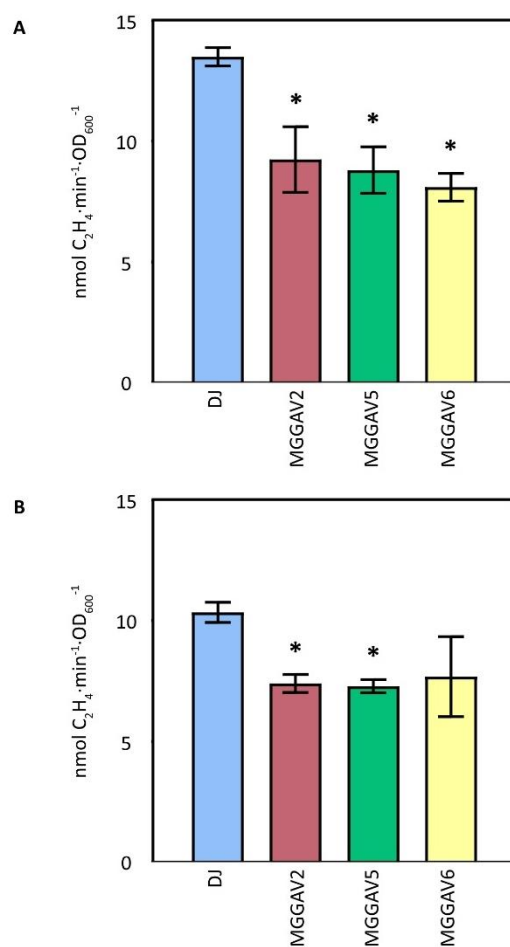


Figura 36. Los genes *grxD* y *bfrA* podrían estar actuando en la misma vía de donación de hierro a la nitrogenasa. A. Ensayo de actividad nitrogenasa de las cepas DJ y los mutantes MGGAV2, MGGAV5 y MGGAV6 en condiciones estándar. La gráfica muestra la media $\pm$ desviación estándar (n=3). **B.** Ensayo de actividad nitrogenasa cuando las cepas pasan de un medio con hierro a otro sin el mismo. En la gráfica se observa que ambos mutantes simples (MGGAV2 y MGGAV5) tienen menor actividad nitrogenasa que la cepa silvestre DJ. En el caso del doble mutante MGGAV6 la disminución en la actividad nitrogenasa no es significativa. La gráfica muestra la media $\pm$ desviación estándar (n=2). El asterisco (*) indica diferencias significativas (P < 0,05).

Discusión

El hierro es un nutriente esencial para la vida. Este metal de transición actúa como cofactor en numerosas enzimas, ya sea solo, como parte de un grupo hemo o formando un grupo sulfoférico (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Layer, 2021). Aunque el hierro es imprescindible, puede llegar a ser tóxico cuando desplaza a otros metales de su sitio activo o cuando se producen radicales libres por la reacción de Fenton (Winterbourn; Tang *et al.*, 2021; Stanbury, 2022).

A. vinelandii, al igual que muchos otros organismos diazotrofos, ha evolucionado para compaginar la captación de hierro necesario para los procesos fisiológicos mientras evita la toxicidad producida por este metal en la célula. Entre ellos, ha desarrollado mecanismos que le permiten producir, secretar y recuperar sideróforos, sintetizar transportadores específicos de hierro, la transferencia de hierro a la inmensidad de proteínas que lo necesitan para ser activas y mecanismos de almacenaje y detoxificación del exceso de este metal (Andrews *et al.*, 2013). Además, produce grandes cantidades de la enzima nitrogenasa. Dado que esta bacteria Gram negativa es fácil de crecer y manipular genéticamente, se utiliza como organismo modelo para estudiar la genética y bioquímica que se esconden tras la fijación del nitrógeno (Hoffman *et al.*, 2014; Martín del Campo *et al.*, 2022).

La nitrogenasa de molibdeno, la más estudiada por ser la más extendida entre los diazotrofos (Dos Santos *et al.*, 2012; Addo & Dos Santos, 2020), tiene el cofactor FeMo-co que la diferencia del resto de nitrogenasas. Lo que hace especial al FeMo-co con respecto al FeFe-co y al FeV-co es el átomo de molibdeno. La proteína donadora de este molibdeno es NifQ, que a su vez requiere de un grupo Mo-3Fe-4S (Hernández *et al.*, 2008; Simon J. George *et al.*, 2019). Estudios previos del laboratorio habían demostrado que el precursor Fe-S para formar el grupo metálico de NifQ era entregado por la proteína andamio NifU (Barahona *et al.*, 2021). Ambas proteínas, NifU y NifQ interactúan cuando la primera se encuentra reconstituida y la segunda no tiene grupos sulfoféricos. Esto fue un primer indicio de la transferencia del grupo 4Fe-4S desde NifU que fue confirmado tras observar que la cantidad de hierro en apo-NifQ incrementaba tras ser incubada con R-NifU (Barahona *et al.*, 2021).

Debido a que la proteína IscU puede reemplazar la función de NifU (Dos Santos *et al.*, 2007), un interrogante que se planteó fue si la proteína IscU también era capaz de ceder sus grupos 4Fe-4S a NifQ. Aunque se ha confirmado que IscU y NifQ interactúan (Fig. 17 y Fig. 18), ensayos *in vivo* han demostrado que NifU es el principal donador de grupos Fe-S a NifQ (Fig. 20). Al purificar NifQ desde un mutante de *A. vinelandii* con una mutación manteniendo marco de lectura de NifU (MGGAV1) se observa que la proteína obtenida tiene un tercio de hierro que la obtenida desde la cepa silvestre (UW300). Por tanto, aunque IscU es capaz de ceder grupos sulfoféricos parece tener una menor capacidad que NifU.

Una vez que NifQ adquiere el grupo 4Fe-4S desde NifU principalmente, este grupo debe perder en algún momento un átomo de hierro para generar el grupo 3Fe-4S, al que luego se incorporará el molibdeno (Hernandez *et al.*, 2008). Por tanto, aún faltan por descubrir proteínas implicadas en al menos tres procesos de la formación de Mo-3Fe-4S: eliminación del átomo de hierro, transferencia del molibdato y su inclusión en el precursor 3Fe-4S. La proteína MoSto es la principal candidata como proteína que ceda molibdeno a NifQ (Navarro-Rodríguez, 2019), aunque esta transferencia no tiene por qué ser directa, sino que podría estar mediada por metalochaperonas de molibdeno. El hecho de que NifU transfiera hierro a NifQ suma una proteína más a las ya conocidas como receptoras de grupos sulfoferricos desde NifU: NifH y NifB (Fig. 37) (Zhao *et al.*, 2007; Burén *et al.*, 2020).

Como se ha indicado en la introducción, ante un exceso de hierro libre en el citoplasma, este puede quedar almacenado en las ferritinas para ser liberado cuando exista una demanda del mismo. Uno de los destinos del hierro es NifU, principal proteína andamio donde se formarán los grupos sulfoferricos que serán destinados a la enzima nitrogenasa (Fu *et al.*, 1994; Dos Santos *et al.*, 2004). Otra proteína andamio que recibe hierro es IscU, cuyos grupos sulfoferricos se destinan a proteínas de forma genérica (Dos Santos *et al.*, 2007). No obstante, entre ambos procesos el hierro no puede encontrarse libre en el citoplasma, sino que siempre debe encontrarse unido a un quelante soluble o a proteínas, de manera que se evita la producción de especies ROS tóxicas para la célula. La función de los quelantes, como el citrato o la nicotianamina es unir el hierro para prevenir que actúe como catalizador de reacciones redox (Morrissey & Gueriot, 2009). Por ello, los transportadores de hierro que se encuentran en la membrana interna de la célula, como FeoB o transportadores ABC, no pueden simplemente liberar el hierro al interior del citosol. Ha de haber una transferencia a una molécula aceptora.

Debido al gran número de ferroproteínas existentes en la célula, todas ellas con una afinidad similar por el hierro, tienen que existir chaperonas de hierro que actúen no solo como *carriers*, sino que sean específicas para ciertas proteínas. Las metalochaperonas pueden definirse como proteínas capaces de unir un metal y mediar su transferencia, mediante interacción proteína-proteína, a una apo-proteína (Waldron *et al.*, 2009). En bacterias no se han descrito hasta el momento chaperonas de hierro, hecho que sí ha sucedido en mamíferos, donde se han descrito las proteínas *poly r(C)-binding proteins* (PCBPs) y el complejo Glrx3-BolA2 (Yanatori *et al.*, 2016; Philpott *et al.*, 2017). La función de las Grxs como *carriers* de grupos 2Fe-2S ha sido muy estudiada (Rouhier *et al.*, 2010), al igual que su papel en el ensamblaje de grupos sulfoferricos (Rodríguez-Manzanque *et al.*, 2002; Wingert *et al.*, 2005), homeostasis de hierro y mantenimiento de actividad de ferroproteínas (Mühlenhoff *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012).

Una estrategia para identificar proteínas involucradas en el tráfico de hierro en *A. vinelandii* es caracterizar proteínas que interaccionen con transportadores de hierro, proteínas andamio de grupos Fe-S, como NifU, ferroquelatasas o proteínas de almacenaje de hierro como bacterioferritinas/ferritinas. Previo al comienzo de esta Tesis Doctoral, en el laboratorio se realizaron ensayos *pull-down* con el fin de caracterizar nuevos elementos en la homeostasis de hierro en *A. vinelandii*. Como proteínas cebo se utilizaron las proteínas NifU y BfrA. De entre las muchas proteínas encontradas tras analizar los datos obtenidos de proteómica, como se ha mencionado en el apartado de resultados, GrxD era común en ambos ensayos. GrxD es una glutarredoxina de tipo monotiol. Glutarredoxinas de esta clase se ha visto que son capaces de unir grupos Fe-S en su sitio activo CGFS y que pueden reparar grupos sulfoféricos (Alves *et al.*, 2009; Couturier *et al.*, 2009; Boutigny *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

La estrategia seguida para confirmar los datos obtenidos en el *pull-down* fue ensayos de copurificación. En estos ensayos se ha observado que las proteínas BfrA y GrxD interaccionan únicamente cuando BfrA está cargada de hierro y GrxD no tiene su grupo sulfoférico (Fig. 24). El hecho de que la interacción se produzca en unas condiciones concretas presenta dos explicaciones posibles. Por un lado, puede haber una transferencia de hierro en dirección BfrA-GrxD. Por otro lado, puede que GrxD esté actuando como una ferredoxina para movilizar el hierro almacenado en la cavidad de BfrA. En otras bacterias, como *E. coli*, se ha observado que para que se produzca la movilización de hierro desde Bfr se requiere de la interacción con una ferredoxina, con un grupo 2Fe-2S, llamada Bfd (Andrews *et al.*, 1989; Quail *et al.*, 1996). En *P. aeruginosa* se ha demostrado que las ferredoxinas *ferredoxin NADP reductase* (Fpr) y Bfd promueven la movilización del Fe³⁺ almacenado en BfrB en forma de mineral. Los electrones de Fpr son lanzados al interior de BfrB. En este proceso el grupo 2Fe-2S de Bfd es requerido para entregar los electrones al grupo hemo de BfrB (Weeratunga *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2012; Rivera, 2017). En la interacción BfrB-Bfd no existe una reorganización estructural que facilite la liberación de Fe²⁺ (Wijerathne *et al.*, 2018). En ausencia de Bfd, o cuando se bloquea la interacción BfrB-Bfd se acumula el hierro en el interior de BfrB, causando una deficiencia de hierro en el citosol (Eshelman *et al.*, 2017).

En un gran número de bacterias Gram negativas los genes que codifican a las proteínas Bfr y Bfd se encuentran adyacentes (Wang *et al.*, 2015). En el genoma de *A. vinelandii* *grxD* (avin_14040) y *bfrA* (avin_14050) se encuentran contiguas, sin estar anotado ningún gen *bfd* contiguo a *bfrA* (Fig. 21). En bacterias patógenas, incluyendo *P. aeruginosa*, se ha observado que en la interacción BfrB-Bfd participan unos residuos conservados en Bfd: Arg26, Arg29 y Lys46, además de las 4 Cys que coordinan el grupo 2Fe-2S (Yao *et al.*, 2012; Rivera, 2017; Wijerathne *et al.*, 2018). Sin embargo, estos residuos

no se encuentran en la GrxD, descartando que esta proteína esté actuando como una ferredoxina en la liberación de hierro de BfrA. Al hacer un BLASTp contra el genoma de *A. vinelandii* DJ usando la secuencia de PaBfd, se encuentra una proteína, no anotada, con un 75% *query cover* (WP_072432620.1) de 73 aminoácidos. El gen que codifica a esta proteína se encuentra 296 pb aguas arriba de BfrA. En este caso sí se encuentran los residuos conservados en las proteínas Bfd, descartando que GrxD sea el homólogo a Bfd con función en la liberación de hierro desde la cavidad de BfrA. Además, no se observa interacción entre holo-BfrA y GrxD-[2Fe-2S].

Si GrxD no está actuando como una Bfd, la interacción BfrA-GrxD podría implicar una transferencia de hierro desde BfrA a GrxD (Fig. 37). Esto significaría que GrxD, además de ser capaz de formar un grupo sulfoférico 2Fe-2S también sería capaz de recibir hierro libre. A falta de realizar ensayos de transferencia de hierro entre ambas proteínas, en el laboratorio se han realizado experimentos preliminares de unión de hierro libre a la proteína GrxD. Estos resultados parecen indicar que GrxD es capaz de unir hierro libre en sus dos formas, siendo su capacidad de unir Fe^{2+} superior a la observada con Fe^{3+} (Collantes-García *et al.*, sin publicar).

La interacción GrxD-NifU observada en los *pull-downs* también ha sido confirmada (Fig. 25). En este caso, sin embargo, se observa interacción entre ambas proteínas independientemente de su estado metálico. No obstante, sí se ha observado que la interacción GrxD-NifU es más fuerte cuando solo una de ellas se encuentra reconstituida, sugiriendo una transferencia de grupos sulfoféricos entre ellas (Fig. 26 y Fig. 37). Esta hipótesis tiene cabida ya que en eucariotas existen ejemplos de transferencia de grupos Fe-S en los que están implicadas las glutarredoxinas. En humanos, existe una transferencia entre Isu, proteína andamio para la formación de los grupos sulfoféricos, y Grx2 (ditiol), aunque en este caso no interviene el sistema de cochaperonas de biogénesis de grupos Fe-S (HSPA9 y HSC20) (Rouault & Tong, 2008). En cloroplastos de plantas también se ha visto una transferencia de grupos 2Fe-2S desde GrxS14 (monotiol) a apo-Fdx (ferredoxina) (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Otras Grxs, como Grx5 en *S. cerevisiae*, intervienen en la propia formación de los grupos Fe-S. El mutante *grx5* es hipersensible a oxidantes externos y muestra hipercarbonilación proteica (Rodríguez-Manzanque *et al.*, 1999). Para el correcto funcionamiento del mutante eran necesarios los requerimientos auxotróficos de la leucina, lisina y ácido glutámico. Una característica común a estos aminoácidos es que requieren de enzimas con grupos Fe-S para su síntesis. En el mutante *grx5* las enzimas aconitasa y succinato deshidrogenasa se encontraban inactivas, provocando una acumulación de hierro intracelular que impedía el buen crecimiento de la levadura (Rodríguez-Manzanque *et al.*, 2002).

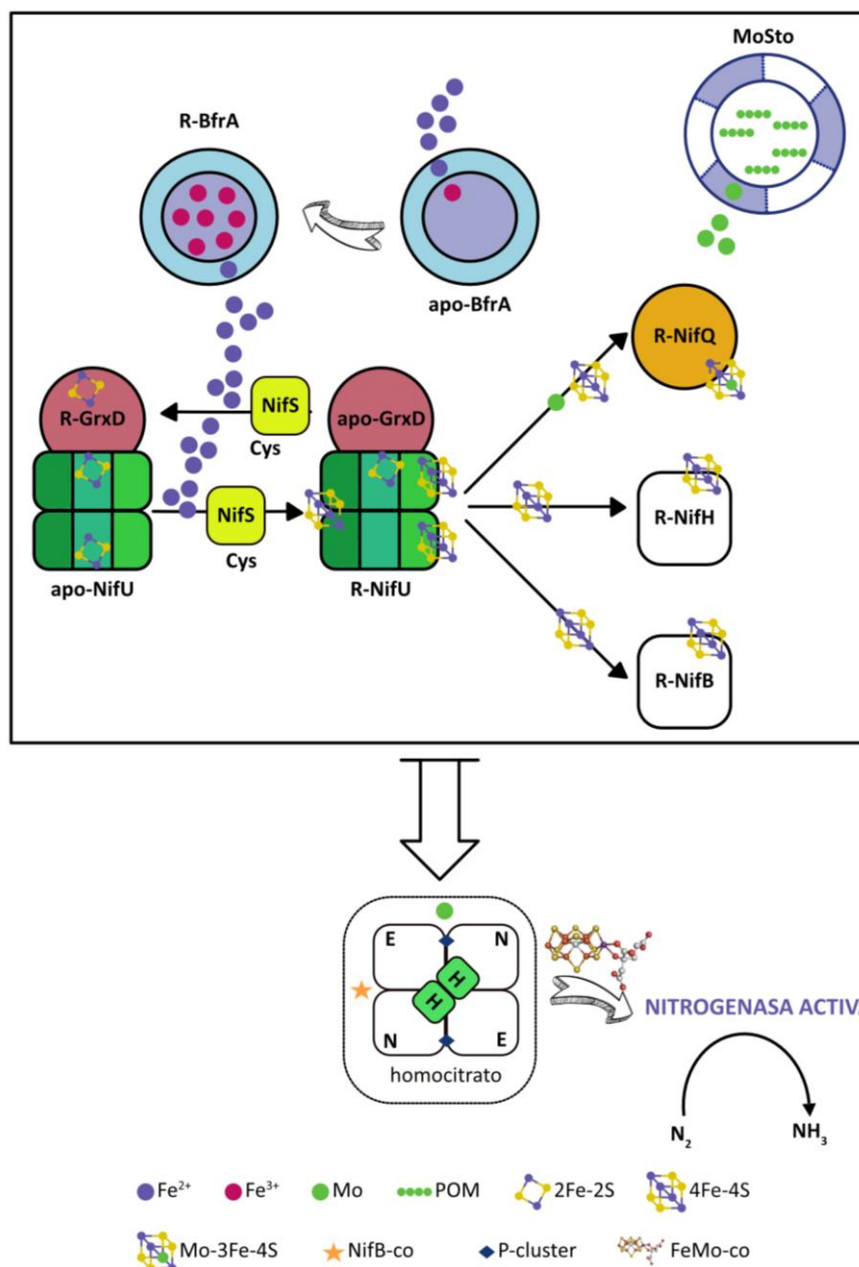


Figura 37. Modelo propuesto como ruta de donación de hierro a la nitrogenasa. La proteína de almacenaje BfrA cuando se encuentra cargada de hierro (R-BfrA) es capaz de interaccionar con GrxD y NifU en su estado apo-, sugiriendo una posible transferencia de hierro. A su vez, GrxD, independientemente de su estado de metalación, interacciona con la proteína andamio NifU (apo-NifU y R-NifU). En el esquema solamente se encuentran representadas las interacciones más fuertes: apo-GrxD/R-NifU y R-GrxD/apo-NifU. La proteína encargada de donar el molibdeno para la formación del grupo FeMo-co, NifQ, recibe un grupo 4Fe-4S principalmente de R-NifU, aunque esta función podría ser substituida en menor medida por R-IscU. Así, NifU cede su grupo sulfoférico a NifQ, NifH y NifB para obtener una enzima nitrogenasa catalíticamente activa capaz de reducir el N_2 a NH_3 .

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de la interacción NifU-GrxD se estudiaron las consecuencias resultantes de mutar los diferentes dominios de NifU, al igual que al mutar los residuos de cisteína. Agar *et al.* (2000) observaron el efecto producido por la sustitución de los residuos de cisteína en el dominio N-terminal (Cys35, Cys62, Cys106), en el central (Cys137, Cys139, Cys172, Cys175) y en C-terminal (Cys272, Cys275) por Ala en la proteína NifU. Las mutaciones en los dominios N- y *core* de NifU provocaron un crecimiento más lento en condiciones diazotrofas y menor actividad de NifH y NifDK. Sin embargo, la sustitución de las cisteínas en el extremo C-terminal no tuvo efectos diferenciados de la cepa silvestre. La proteína NifU con los residuos Cys35, Cys62, Cys106, Cys272 y Cys275 reemplazados por Ala seguía conteniendo el grupo sulfoférico 2Fe-2S. Sin embargo, este grupo no se encontraba cuando los residuos mutados eran Cys137, Cys139, Cys172 y Cys175. También se generaron dos mutantes: N-NifU y Δ N-NifU. De estos mutantes, solo Δ N-NifU contiene un grupo 2Fe-2S (Agar *et al.*, 2000).

Los ensayos de interacción de los mutantes de NifU con GrxD indican que esta interacción no se produce en el dominio N-terminal de NifU. Esta afirmación se sustenta en que el dominio N-terminal es capaz de actuar como proteína andamio de forma independiente al resto de dominios. Esto no se observa en los ensayos de reconstitución realizados con los distintos dominios de NifU (Fig. 32). Por tanto, el ensayo de copurificación negativo observado entre el dominio N (N-NifU) y GrxD es real y no es el resultado de un mal plegamiento del dominio N-terminal (Fig. 31A).

El resto de los ensayos de interacción indican que GrxD está interaccionando con el dominio central de NifU. Esta hipótesis se basa en diferentes ítems, donde la principal asunción es que si GrxD no está interaccionando con el dominio N-terminal de NifU significa que debe estar interaccionando con el dominio central o el dominio C-terminal. Además, solo se observa interacción de GrxD con tres mutantes de NifU: Δ N-NifU, Δ C-NifU y $C_{35,62,106,272,275}$ A-NifU (Tabla 17). La característica común entre ambos mutantes es el dominio central. Además, al descartar el dominio N-terminal en la interacción, la explicación más plausible para explicar la interacción GrxD- Δ C-NifU es que la interacción se produzca en el dominio central. El resultado negativo en la copurificación entre GrxD y *core*-NifU se explica en base a que el dominio central por sí solo no es capaz de reconstituirse. Cuando este mismo ensayo se realizó con el mutante $C_{35,62,106,272,275}$ A-NifU, con capacidad de adquirir grupos sulfoféricos únicamente en el dominio central, sí se observó un incremento en los niveles de hierro (Fig. 32). Esto indica que el mutante *core*-NifU no es funcional, siendo una posible razón del resultado negativo de la copurificación (Fig. 29). Por otro lado, el dominio C-terminal de NifU no es capaz de reconstituirse de forma independiente (Fig. 32). Sin embargo, no existen razones para pensar que sí debería hacerlo ya que este dominio funciona como una proteína *carrier*, con capacidad de unir los grupos sulfoféricos

previamente formados. Por ello, el resultado negativo del ensayo de copurificación entre GrxD y C-terminal podría implicar que ambas proteínas realmente no interaccionan (Fig. 31B) ya que no se han encontrado evidencias sólidas sobre el mal plegamiento del dominio C-terminal. Por último, el hecho de que se observe interacción entre las proteínas NifU y GrxD de forma independiente al estado metálico de ambas (Fig. 25) puede explicarse si GrxD está interaccionando con el dominio central. Los dos estados metálicos estudiados en NifU tienen en común el grupo sulfoférico 2Fe-2S presente en el dominio central. El estado metálico del dominio C-terminal de NifU varía entre su forma apo- y reconstituida.

De forma paralela también se ha observado que existe interacción entre GrxD y R-IscU (Fig. 33). Se encuentran características similares entre las interacciones GrxD-NifU y GrxD-IscU. En ambos casos parece que el condicionante para que se produzca la interacción es el grupo sulfoférico en la proteína andamio: NifU siempre tiene un grupo 2Fe-2S en el dominio central e IscU tiene que estar reconstituida para ser capaz de interaccionar con GrxD. En ambos casos, parece que el estado metálico de GrxD es irrelevante para que se produzca la interacción.

En los *pull-downs* donde se ha identificado GrxD también se ha observado una interacción entre BfrA y NifU (Abreu *et al.*, sin publicar). Estudios paralelos en el laboratorio han demostrado que esta interacción únicamente sucede cuando BfrA está cargada de hierro y NifU no tiene sus grupos sulfoféricos lábiles (Armas *et al.*, sin publicar). Por tanto, quizás, la primera hipótesis que decía que la interacción GrxD-NifU se debe a una transferencia de grupos sulfoféricos sea incorrecta. Los datos obtenidos de los ensayos de copurificación sugieren que BfrA es la donadora de hierro a GrxD y NifU. A su vez, GrxD puede estar interaccionando con IscU y NifU porque sea la encargada de reparar los grupos sulfoféricos esenciales para la actividad de estas proteínas. No obstante, datos recientes del laboratorio sugieren que existe una transferencia de hierro desde GrxD al dominio *core* de NifU, dando paso a una nueva probabilidad (Collantes-García *et al.*, sin publicar). Existe la posibilidad de que BfrA done hierro al dominio N-terminal de NifU de forma directa y que también done hierro al dominio central de NifU a través de la proteína GrxD.

Por último, se ha observado que GrxD es necesaria para una óptima actividad nitrogenasa (Fig. 34 y Fig. 35). Esto no es un hecho aislado de *A. vinelandii*, sino que también se ha observado en la bacteria diazotrofa *S. meliloti* (Benyamina *et al.*, 2013). Este rizobio codifica tres Grxs: ditiol SmGrx1, monotiol SmGrx2 y la atípica SmGrx3. Mutantes en *SmGrx1* producen nódulos abortivos y las bacterias no son capaces de diferenciarse en bacteroides. Por otro lado, *SmGrx2* está implicada en el metabolismo de grupos Fe-S, teniendo los mutantes *Smgrx2* menor capacidad para fijar nitrógeno. Por último, SmGrx3 no parece tener un papel relevante en la fijación de nitrógeno (Benyamina *et al.*, 2013).

GrxD tiene un fenotipo parecido a SmGrx2. Se ha observado que en bacterias genes que comparten una función suelen encontrarse en un mismo operón o cercanos en el genoma y además interaccionan. Por ello, también se estudió la actividad nitrogenasa en el mutante simple *bfrA* (MGGAV5) y el doble *bfrAgrxD* (MGGAV6), obteniéndose resultados similares a los del mutante en *grxD* (MGGAV2) (Fig. 36). Estos datos indican que *bfrA* y *grxD* deben estar actuando en la misma ruta de donación/reparación de grupos sulfoferricos destinados a la nitrogenasa. La existencia de otras tres ferritinas y dos Grxs adicionales a GrxD en el genoma de *A. vinelandii* podría explicar que la delección de *grxD* y *bfrA* no sea letal.

La fijación de N₂ industrial por el proceso de Haber-Bosch consume sobre el 2 % de la energía no renovable mundial y contribuye al 1,6 % de las emisiones mundiales de CO₂. Además, como consecuencia del proceso de denitrificación microbiana por el uso de fertilizantes nitrogenados, se produce el gas de efecto invernadero N₂O (Zhang *et al.*, 2020). Este gas tiene 300 veces más efecto en el calentamiento global que las emisiones de CO₂ y se estima que un 75 % de los niveles de emisión de N₂O se deben al uso de fertilizantes en agricultura. Otro inconveniente, no menos importante, es el coste económico asociado al transporte y aplicación de estos fertilizantes (Erisman *et al.*, 2013). Estos costes económicos tienen aún mayor impacto en países en vías de desarrollo. Por estas razones, en los últimos años, se están destinando muchos esfuerzos en la transferencia de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno desde microorganismos diazotrofos a cereales (Oldroyd & Dixon, 2014; Burén & Rubio, 2018).

El desarrollo de la agricultura y la revolución neolítica implementaron una dieta basada en un alto contenido de cereales como el trigo, el arroz o el maíz en lugar de una alimentación basada en la caza (Aziz *et al.*, 2015; Bressan & Kramer, 2016). Este cultivo de cereales no solo se destina al consumo humano, sino que gran parte, 56 % en países desarrollados y 23 % en países en vías de desarrollo, se destina a la alimentación del ganado (Wik *et al.*, 2008). Una alternativa para paliar los costes económicos y medioambientales de los fertilizantes nitrogenados es el uso de la biología sintética para obtener cereales capaces de fijar N₂. Para ello se han de introducir en la mitocondria o plastos vegetales genes que se encuentran en bacterias fijadoras de nitrógeno. Esto es un proceso muy complejo ya que requiere de muchas proteínas sensibles al oxígeno. Por ejemplo, la coexpresión de NifU con NifH es esencial para la actividad de NifH cuando se purifica esta proteína desde cloroplastos (Eseverri *et al.*, 2020), al igual que con NifB cuando se obtiene de mitocondrias de levadura (Burén *et al.*, 2019).

Los datos y conclusiones obtenidos en esta Tesis Doctoral podrían aportar nueva información en el desarrollo de cereales capaces de fijar nitrógeno. Se podría hipotetizar que la coexpresión de NifU y NifQ también sería esencial para producir NifQ funcional en plantas. Otro aspecto clave y esencial para

el correcto funcionamiento de la nitrogenasa es la entrega de hierro. Conocer cada una de las proteínas implicadas en la captación de este metal podría mejorar la tasa de fijación de nitrógeno. Datos obtenidos en esta Tesis Doctoral aportan, por lo pronto, dos nuevas proteínas implicadas en la fijación de nitrógeno e implicadas en el metabolismo de hierro: GrxD y BfrA. Ambas proteínas interactúan con la proteína andamio NifU, vía de entrada de hierro a la nitrogenasa. Además, los mutantes de ambos genes tienen una menor eficiencia en la fijación de nitrógeno. Esto hace de *grxD* y *bfrA* dos genes candidatos a transformar en plantas que produzcan una nitrogenasa funcional.

Aunque los organismos eucariotas poseen sistemas de biosíntesis de grupos Fe-S, como el sistema SUF en los cloroplastos, estos no parecen ser suficientes para proveer el hierro necesario para la nitrogenasa. Por ejemplo, al purificar NifU en hojas de *Nicotiana benthamiana*, el contenido de hierro es mucho más bajo que el esperado para un grupo 2Fe-2S (0,68 átomos de hierro/monómero) (Eseverri *et al.*, 2020). Por ello, no solo serían necesarias proteínas NIF, sino que proteínas implicadas en la transferencia de hierro en *A. vinelandii*, como GrxD y BfrA, podrían ser claves para reforzar los sistemas endógenos de síntesis de grupos sulfoferricos y así optimizar la fijación de nitrógeno en cereales.

Conclusiones

- 1) Las proteínas NifQ e IscU de *A. vinelandii* interactúan *in vitro*, indicando que la función de NifU podría ser parcialmente reemplazada por IscU. No obstante, NifU es el principal donador de grupos sulfoferricos a NifQ *in vivo*.
- 2) Las proteínas GrxD y BfrA interactúan únicamente cuando GrxD no posee hierro y BfrA está cargada con este metal, situando a BfrA como un posible donador de hierro para GrxD. Además, los genes *grxD* y *bfrA* podrían actuar en la misma ruta, siendo ambos necesarios para una óptima actividad nitrogenasa.
- 3) GrxD interactúa con las proteínas andamio de *A. vinelandii* NifU e IscU. Las proteínas NifU y GrxD interactúan independientemente de su estado metálico, aunque esta interacción es más fuerte cuando solo una de ellas se encuentra reconstituida. Por otro lado, la proteína IscU reconstituida es capaz de interactuar con GrxD.
- 4) GrxD interactúa principalmente con el tándem dominio N-terminal-*core* de la proteína NifU, en lugar de C-terminal-*core*, posicionando a GrxD en los pasos de síntesis de grupos sulfoferricos en vez de en la transferencia de grupos Fe-S a apo-proteínas.
- 5) GrxD tiene un papel en fijación biológica del nitrógeno debido a su asociación con BfrA y NifU.

Referencias

- Abdel-Ghany SE, Ye H, Garifullina GF, Zhang L, Pilon-Smits EAH, Pilon M. 2005.** Iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts. Involvement of the scaffold protein CplscA. *Plant Physiology* **138**: 161–172.
- Abdul-Tehrani H, Hudson AJ, Chang Y, Timms AR, Hawkins C, Williams JM, Harrison PM, Guest JR, Andrews SC. 1999.** Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *Journal of Bacteriology* **181**: 1415-1428.
- Addo MA, Dos Santos PC. 2020.** Distribution of nitrogen-fixation genes in prokaryotes containing alternative nitrogenases. *ChemBioChem* **21**: 1749–1759.
- Adluri RS, Thirunavukkarasu M, Zhan L, Dunna NR, Akita Y, Selvaraju V, Otani H, Sanchez JA, Ho YS, Maulik N. 2012.** Glutaredoxin-1 overexpression enhances neovascularization and diminishes ventricular remodeling in chronic myocardial infarction. *PLoS ONE* **7**: e344790.
- Agar JN, Yuvaniyama P, Jack RF, Cash VL, Smith AD, Dean DR, Johnson MK. 2000.** Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **5**: 167-177.
- Agar, JN., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, BH., Dean, DR., and Johnson, MK. 2000a.** IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: Sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* **39**: 7856–7862.
- Agar, JN., Zheng, L., Cash, VL., Dean, DR., and Johnson, MK. 2000b.** Role of the IscU protein in iron-sulfur cluster biosynthesis: IscS- mediated assembly of a [Fe₂S₂] cluster in IscU. *Journal of the American Chemical Society* **122**: 2136–2137.
- Aldea M, Garrido T, Hernandez-Chico C, Vicente M, Kushner SR. 1989.** Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of bolA, an *Escherichia coli* morphogene. *The EMBO journal* **8**: 3923-3931.
- Aldea M, Hernandez Chico C, Kushner SR, Vicente M. 1988.** Identification, cloning, and expression of bolA, an ftsZ-dependent morphogene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **170**: 5169-5176.
- Allen RM, Homer MJ, Chatterjee R, Ludden PW, Roberts GP, Shah VK. 1993.** Dinitrogenase reductase and MgATP dependent maturation of apodinitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 23670-23674.

- Alloing G, Mandon K, Boncompagni E, Montrichard F, Frendo P. 2018.** Involvement of glutaredoxin and thioredoxin systems in the nitrogen-fixing symbiosis between Legumes and Rhizobia. *Antioxidants* **7**: 182.
- Altendorf K, Stalz WD, Greie JC, Deckers-Hebestreit G. 2000.** Structure and function of the F_o complex of the ATP synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Biology* **203**: 19-28.
- Alves R, Vilaprinyo E, Sorribas A, Herrero E. 2009.** Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins. *BMC Evolutionary Biology* **9**: 1-14.
- Andreini C, Rosato A, Banci L. 2017.** The relationship between environmental dioxygen and iron-sulfur proteins explored at the genome level. *PLoS ONE* **12**: e0171279.
- Andrews S, Norton I, Salunkhe AS, Goodluck H, Aly WSM, Mourad-Agha H, Cornelis P. 2013.** Control of iron metabolism in bacteria. *Metal Ions in Life Sciences* **12**: 203–239.
- Andrews SC, Harrison PM, Guest JR. 1989.** Cloning, sequencing, and mapping of the bacterioferritin gene (bfr) of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **171**: 3940-3947.
- Arnold W, Rump A, Klipp W, Priefer UB, Pghler A. 1988.** Nucleotide sequence of a 24,206 base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology* **203**: 715-738.
- Arosio P, Elia L, Poli M. 2017.** Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life* **69**: 414–422.
- Ash MR, Maher MJ, Guss JM, Jormakka M. 2011.** The initiation of GTP hydrolysis by the g-domain of FeoB: Insights from a transition-state complex structure. *PLoS ONE* **6**.
- Aziz I, Branchi F, Sanders DS. 2015.** The rise and fall of gluten. *Proceedings of the Nutrition Society* **74**: 221-226.
- Bai L, Xie T, Hu Q, Deng C, Zheng R, Chen W. 2015.** Genome-wide comparison of ferritin family from Archaea, Bacteria, Eukarya and Viruses: its distribution, characteristic motif, and phylogenetic relationship. *Science of Nature* **102**: 1-10.
- Bandyopadhyay S, Chandramouli K, Johnson MK. 2008.** Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochemical Society Transactions* **36**: 1112–1119.

- Bandyopadhyay S, Gama F, Molina-Navarro MM, Gualberto JM, Claxton R, Naik SG, Huynh BH, Herrero E, Jacquot JP, Johnson MK, et al. 2008.** Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO Journal* **27**: 1122–1133.
- Bandyopadhyay S, Naik SG, O’Carroll IP, Huynh BH, Dean DR, Johnson MK, Dos Santos PC. 2008.** A proposed role for the *Azotobacter vinelandii* nfua protein as an intermediate iron-sulfur cluster carrier. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 14092–14099.
- Barahona E, Jiang X, Jiménez-Vicente E, Rubio LM, González-Guerrero M. 2021.** *Azotobacter vinelandii* scaffold protein NifU transfers iron to NifQ as part of the iron-molybdenum cofactor biosynthesis pathway for nitrogenase. *bioRxiv*, 2021-12. <https://doi.org/10.1101/2021.12.06.471366>
- Behera RK, Theil EC.** Moving Fe²⁺ from ferritin ion channels to catalytic OH centers depends on conserved protein cage carboxylates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 7925-7930.
- Behring JB, Kumar V, Whelan SA, Chauhan P, Siwik DA, Costello CE, Colucci WS, Cohen RA, McComb ME, Bachschmid MM. 2014.** Does reversible cysteine oxidation link the Western diet to cardiac dysfunction? *FASEB Journal* **28**: 1975–1987.
- Beinert H, Holm RH, Mü E. 1997.** Iron-sulfur clusters: nature’s modular, multipurpose structures. *Science* **277**: 653-659.
- Bellenger JP, Wichard T, Kustka AB, Kraepiel AML. 2008.** Uptake of molybdenum and vanadium by nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores. *Nature Geoscience* **1**: 243–246.
- Benyamina SM, Baldacci-Cresp F, Couturier J, Chibani K, Hopkins J, Bekki A, de Lajudie P, Rouhier N, Jacquot JP, Alloing G, Puppo A, Frendo P. 2013.** Two *Sinorhizobium meliloti* glutaredoxins regulate iron metabolism and symbiotic bacteroid differentiation. *Environmental Microbiology* **15**: 795–810.
- Benyamina, SM, Baldacci-Cresp, F, Couturier, J, Chibani, K., Hopkins, J, Bekki, A, de Lajudie, P, Rouhier, N, Jacquot, JP, Alloing, G, Puppo, A, Frendo, P. 2013.** Two *Sinorhizobium meliloti* glutaredoxins regulate iron metabolism and symbiotic bacteroid differentiation. *Environmental Microbiology* **15**: 795–810.
- Bertani G. 1951.** Studies on lysogenesis I: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62**: 293-300.

- Bishop PE, Joerger RD. 1990.** Genetics and molecular biology of alternative nitrogen fixation systems. *Annual Review of Plant Biology* **41**:109-125.
- Black KA, Dos Santos PC. 2015.** Shared-intermediates in the biosynthesis of thio-cofactors: mechanism and functions of cysteine desulfurases and sulfur acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1853**: 1470–1480.
- Boniecki MT, Freibert SA, Mühlenhoff U, Lill R, Cygler M. 2017.** Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nature Communications* **8**: 1287.
- Boutigny S, Saini A, Baidoo EEK, Yeung N, Keasling JD, Butland G. 2013.** Physical and functional interactions of a monothiol glutaredoxin and an iron sulfur cluster carrier protein with the sulfur-donating radical S-adenosyl-L-methionine enzyme MiaB. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 14200–14211.
- Boyd ES, Hamilton TL, Peters, JW. 2011.** An alternative path for the evolution of biological nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology* **2**, 1-11.
- Boyd ES, Peters JW. 2013.** New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology* **4**: 1-12.
- Bozzi AT, Gaudet R. 2021.** Molecular mechanism of Nramp-family transition metal transport. *Journal of Molecular Biology* **433**: 166.991.
- Braunschweig J, Bosch J, Heister K, Kuebeck C, Meckenstock RU. 2012.** Reevaluation of colorimetric iron determination methods commonly used in geomicrobiology. *Journal of Microbiological Methods* **89**: 41–48.
- Braymer JJ, Freibert SA, Rakwalska-Bange M, Lill R. 2021.** Mechanistic concepts of iron-sulfur protein biogenesis in Biology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1868**: 118.863.
- Bressan P, Kramer P. 2016.** Bread and other edible agents of mental disease. *Frontiers in Human Neuroscience* **10**: 130.
- Buchanan BB, Arnon DI. 1970.** Ferredoxins: chemistry and function in photosynthesis, nitrogen fixation, and fermentative metabolism. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **33**: 119-176.

- Bulen WA, LeCompte JR. 1966.** The nitrogenase system from azotobacter: two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution, and ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **56**: 979-986.
- Burén S, Jiménez-Vicente E, Echavarri-Erasun C, Rubio LM. 2020.** Biosynthesis of nitrogenase cofactors. *Chemical Reviews* **120**: 4921–4968.
- Burén S, Pratt K, Jiang X, Guo Y, Jimenez-Vicente E, Echavarri-Erasun C, Dean DR, Saaem I, Gordon DB, Voigt CA, Rubio LM.** Biosynthesis of the nitrogenase active-site cofactor precursor NifB-co in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**: 25078-25086.
- Burén S, Rubio LM. 2018.** State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. *FEMS Microbiology Letters* **365**: fnx274.
- Burschel S, Kreuzer DD, Nuber F, Stiller M, Hofmann M, Zupok A, Siemiatkowska B, Gorka M, Leimkühler S, Friedrich T. 2019.** Iron-sulfur cluster carrier proteins involved in the assembly of *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Molecular Microbiology* **111**: 31–45.
- Cai K, Tonelli M, Frederick RO, Markley JL. 2017.** Human mitochondrial ferredoxin 1 (FDX1) and ferredoxin 2 (FDX2) both bind cysteine desulfurase and donate electrons for iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochemistry* **56**: 487–499.
- Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG. 2010.** The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science* **330**: 192-196.
- Carpenter EJ, Price CC. 1976.** *Marine Oscillatoria (Trichodesmium)*: explanation for aerobic nitrogen fixation without heterocysts. *Science* **191**: 1278-1280.
- Ceci P, Ilari A, Falvo E, Chiancone E. 2003.** The Dps protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not bind to DNA but protects it toward oxidative cleavage. X-ray crystal structure, iron binding, and hydroxyl-radical scavenging properties. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 20319–20326.
- Cejudo FJ, González MC, Pérez-Ruiz JM. 2021.** Redox regulation of chloroplast metabolism. *Plant Physiology* **186**: 9–21.
- Chen P, De Meulenaere E, Deheyn DD, Bandaru PR. 2020.** Iron redox pathway revealed in ferritin via electron transfer analysis. *Scientific Reports* **10**: 4.033.

- Chisnell JR, Premakumar R, Bishop PE. 1988.** Purification of a second alternative nitrogenase from a nifHDK deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **170**:27-33.
- Cornish AS, Page WJ. 2000.** Role of molybdate and other transition metals in the accumulation of protochelin by *Azotobacter vinelandii*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:1580-1586.
- Couturier J, Jacquot JP, Rouhier N. 2009.** Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**: 2539–2557.
- Couturier J, Przybyla-Toscano J, Roret T, Didierjean C, Rouhier N. 2015.** The roles of glutaredoxins ligating Fe-S clusters: Sensing, transfer or repair functions? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1853**: 1513–1527.
- Curatti L, Brown CS, Ludden PW, Rubio LM. 2005.** Genes required for rapid expression of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 6291-6296.
- Curatti L, Hernandez JA, Igarashi RY, Soboh B, Zhao D, Rubio LM. 2007.** In vitro synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from iron, sulfur, molybdenum, and homocitrate using purified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 17626-17631.
- Curatti L, Ludden PW, Rubio LM. 2006.** NifB-dependent *in vitro* synthesis of the iron–molybdenum cofactor of nitrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 5297-5301.
- Ding H, Clark RJ, Ding B. 2004.** IscA mediates iron delivery for assembly of iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 37499–37504.
- Dobrowolski P. 1992.** Short protocols in molecular biology. A compendium of methods from “current protocols in molecular biology. Edited by Frederick M. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons. ISBN 0-471-57735-9.
- Dos Santos PC, Fang Z, Mason SW, Setubal JC, Dixon R. 2012.** Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC genomics* **13**, 1-12.
- Dos Santos PC, Johnson DC, Ragle BE, Unciuleac MC, Dean DR. 2007.** Controlled expression of nif and isc iron-sulfur protein maturation components reveals target specificity and limited functional replacement between the two systems. *Journal of Bacteriology* **189**: 2854–2862.

- Dos Santos PC, Smith AD, Frazzon J, Cash VL, Johnson MK, Dean DR. 2004.** Iron-sulfur cluster assembly: NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 19705–19711.
- Dos Santos PC. 2011.** Molecular biology and genetic engineering in nitrogen fixation. *Methods in Molecular Biology. Nitrogen Fixation: Methods and Protocols*, 81-92.
- Dos Santos, PC, Johnson, DC, Ragle, BE, Unciuleac, MC, Dean, DR. 2007.** Controlled expression of nif and isc iron-sulfur protein maturation components reveals target specificity and limited functional replacement between the two systems. *Journal of Bacteriology* **189**: 2854–2862.
- Downie JA. 2014.** Legume nodulation. *Current Biology* **24**: 184-190.
- Dutkiewicz R, Nowak M. 2018.** Molecular chaperones involved in mitochondrial iron–sulfur protein biogenesis. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **23**: 569–579.
- Eady RR. 1996.** Structure–function relationships of alternative nitrogenases. *Chemical Reviews* **96**: 3013-3030.
- Ebrahimi KH, Hagedoorn PL, Hagen WR. 2015.** Self-assembly is prerequisite for catalysis of Fe(II) oxidation by catalytically active subunits of ferritin. *Journal of Biological Chemistry* **290**: 26801–26810.
- Einsle, O. 2014.** Nitrogenase FeMo cofactor: an atomic structure in three simple steps. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **19**: 737-745.
- Emericht DW, Burris RH. 1978.** Complementary functioning of the component proteins of nitrogenase from several bacteria. *Journal of Bacteriology* **134**: 936-943.
- Erisman JW, Galloway JN, Seitzinger S, Bleeker A, Dise NB, Roxana Petrescu AM, Leach AM, de Vries W. 2013.** Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**.
- Esberg B, Leung H-CE, Tsui H-CT, Björk GR, Winkler ME. 1999.** Identification of the miaB gene, involved in methylthiolation of isopentenylated A37 Derivatives in the tRNA of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**: 7256-7265.
- Eseverri Á, López-Torrejón G, Jiang X, Burén S, Rubio LM, Caro E. 2020.** Use of synthetic biology tools to optimize the production of active nitrogenase Fe protein in chloroplasts of tobacco leaf cells. *Plant Biotechnology Journal* **18**: 1882–1896.

- Eshelman K, Yao H, Punchi HAN, Deay JJ, Chandler JR, Rivera M. 2017.** Inhibiting the BfrB:Bfd interaction in *Pseudomonas aeruginosa* causes irreversible iron accumulation in bacterioferritin and iron deficiency in the bacterial cytosol. *Metallomics* **9**: 646–659.
- Esquelin-Lebron K, Dubrac S, Barras F, Boyd J, Bacterial JB. 2021.** Approaches for assembling iron-sulfur proteins. *mBio* **12**: e02425-21.
- Fay P. 1992.** Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiological Reviews* **56**: 340–373.
- Fdez-Gubieda ML, García-Prieto A, Alonso J, Meneghini C. 2016.** 7 X-Ray absorption fine structure spectroscopy in Fe oxides and oxyhydroxides. *Iron Oxides: From Nature to Applications*, 397–422.
- Feng Y, Zhong N, Rouhier N, Hase T, Kusunoki M, Jacquot JP, Jin C, Xia B. 2006.** Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site. *Biochemistry* **45**: 7998–8008.
- Fenske D, Gnida M, Schneider K, Meyer-Klaucke W, Schemberg J, Henschel V, Meyer AK, Knöchel A, Müller A. 2005.** A new type of metalloprotein: The Mo storage protein from *Azotobacter vinelandii* contains a polynuclear molybdenum-oxide cluster. *ChemBioChem* **6**: 405–413.
- Fenske D, Gnida M, Schneider K, Meyer-Klaucke W, Schemberg J, Henschel V, Meyer AK, Knöchel A, Müller A. 2005.** A new type of metalloprotein: the Mo storage protein from *Azotobacter vinelandii* contains a polynuclear molybdenum-oxide cluster. *ChemBioChem* **6**: 405–413.
- Ferguson AD, Deisenhofer J. 2002.** TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1565**, 318–332.
- Fernandes AP, Holmgren, A. 2004.** Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants and Redox Signaling* **6**: 63–74.
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, Vitousek P, Leach A, Bouwman AF, Dentener F, Stevenson D, Amann M, Voss M. 2013.** The global nitrogen cycle in the Twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**.
- Fox NG, Yu X, Feng X, Bailey HJ, Martelli A, Nabhan JF, Strain-Damerell C, Bulawa C, Yue WW, Han S. 2019.** Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nature Communications* **10**: 2210.

- Freire P, Vieira HLA, Furtado AR, De Pedro MA, Arraiano CM. 2006.** Effect of the morphogene bolA on the permeability of the *Escherichia coli* outer membrane. *FEMS Microbiology Letters* **260**: 106–111.
- Fu W, Jack RF, Morgan TV, Dean DR, Johnson MK. 1994.** NifU gene product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains two identical [2Fe-2S] clusters. *Biochemistry* **33**: 13455-13463.
- Galloway JN, Bleeker A, Erisman JW. 2021.** The human creation and use of reactive nitrogen: a global and regional perspective. *Annual Review of Environment and Resources* **46**: 255-288.
- George SJ, Hernandez JA, Jimenez-Vicente E, Echavarri-Erasun C, Rubio LM. 2019.** EXAFS reveals two Mo environments in the nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthetic protein NifQ. *Chemical communications* **52**: 11811-11814.
- Georgiadis MM, Komiya H, Chakrabarti P, Woo D, Kornuc JJ, Rees DC. 1992.** Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* **257**: 1653-1659.
- Grass G, Franke S, Taudte N, Nies DH, Kucharski LM, Maguire ME, Rensing C. 2005.** The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *Journal of Bacteriology* **187**: 1604–1611.
- Gruber N, Galloway JN. 2008.** An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* **451**: 293–296.
- Grunden AM, Shanmugam KT. 1997.** Molybdate transport and regulation in bacteria. *Archives of Microbiology* **168**: 345-354.
- Guo M, Gao M, Liu J, Xu N, Wang H. 2022.** Bacterioferritin nanocage: structure, biological function, catalytic mechanism, self-assembly and potential applications. *Biotechnology Advances* **61**.
- Hall DO, Cammack R, Rao KK. 1971.** Role for ferredoxins in the origin of life and biological evolution. *Nature* **233**: 136-138.
- Hall DO, Evans MCW. 1969.** Iron-sulphur proteins. *Nature* **223**: 1432.
- Hanahan D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.
- Hernandez JA, Curatti L, Aznar CP, Perova Z, David Britt R, Rubio LM. 2008.** Metal trafficking for nitrogen fixation: NifQ donates molybdenum to NifEN/NifH for the biosynthesis of the nitrogenase

FeMo-cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 11679-11684.

Hernandez JA, Igarashi RY, Soboh B, Curatti L, Dean DR, Ludden PW, Rubio LM. 2007. NifX and NifEN exchange NifB cofactor and the VK-cluster, a newly isolated intermediate of the iron-molybdenum cofactor biosynthetic pathway. *Molecular Microbiology* **63**: 177–192.

Hernandez JA, Phillips AH, Erbil WK, Zhao D, Demuez M, Zeymer C, Pelton JG, Wemmer DE, Rubio LM. 2011. A sterile α -motif domain in NafY targets apo-NifDK for iron-molybdenum cofactor delivery via a tethered domain. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 6321–6328.

Herrero E, De La Torre-Ruiz MA. 2007. Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**: 1518–1530.

Hider RC, Kong XL. 2011. Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. *BioMetals* **24**: 1179–1187.

Hirsch PR, Mauchline TH. 2015. The Importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition. *Advances in Applied Microbiology* **93**: 45–71.

Hoffman BM, Lukoyanov D, Yang ZY, Dean DR, Seefeldt LC. 2014. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Chemical Reviews* **114**: 4041–4062.

Hofmann NR. 2009. Glutaredoxin functions in floral development. *The Plant Cell* **21**: 363–363.

Holland PL. 2020. Introduction: reactivity of nitrogen from the ground to the atmosphere. *Chemical Reviews* **120**: 4919–4920.

Holmgren A. 1976. Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 2275-2279.

Honarmand Ebrahimi K, Bill E, Hagedoorn PL, Hagen WR. 2012. The catalytic center of ferritin regulates iron storage via Fe(II)-Fe(III) displacement. *Nature Chemical Biology* **8**: 941–948.

Honarmand Ebrahimi K, Hagedoorn PL, Hagen WR. 2015. Unity in the biochemistry of the iron-storage proteins ferritin and bacterioferritin. *Chemical Reviews* **115**: 295–326.

Hu Y, Fay AW, Chi CL, Yoshizawa J, Ribbe MW. 2008. Assembly of nitrogenase MoFe protein. *Biochemistry* **47**: 3973–3981.

- Hu Y, Fay AW, Dos Santos PC, Naderi F, Ribbe MW. 2004.** Characterization of *Azotobacter vinelandii* nifZ deletion strains: Indication of stepwise MoFe protein assembly. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 54963–54971.
- Hu Y, Fay AW, Lee CC, Ribbe MW. 2007.** P-cluster maturation on nitrogenase MoFe protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 10424-10429.
- Hu Y, Fay AW, Ribbe MW. 2005.** Identification of a nitrogenase FeMo cofactor precursor on NifEN complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3236-3241
- Hu Y, Wu Q, Peng Z, Sprague SA, Wang W, Park J, Akhunov E, Jagadish KSV, Nakata PA, Cheng N, Hirschi KD, White FF, Park S. 2017.** Silencing of OsGRXS17 in rice improves drought stress tolerance by modulating ROS accumulation and stomatal closure. *Scientific Reports* **7**.
- Huyer M, Page WJ. 1989.** Ferric reductase activity in *Azotobacter vinelandii* and its inhibition by Zn²⁺. *Journal of Bacteriology* **171**: 4031-4037.
- Ito T, Tashiro K, Muta S, Ozawa R, Chiba T, Nishizawa M, Yamamoto K, Kuhara S, Sakaki Y. 2000.** Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1143-1147.
- Jacobs D, Mitchell D, Watt GD. 1995.** The concentration of cellular nitrogenase proteins in *Azotobacter vinelandii* whole cells as determined by activity measurements and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **324**: 317–324.
- Jacobson MR, Brigle KE, Bennett LT, Setterquist RA, Wilson MS, Cash VL, Beynon J, Newton WE, Dean DR. 1989b.** Physical and genetic map of the major nif gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **171**: 1017-1027.
- Jacobson MR, Cash VL, Weiss MC, Laird NF, Newton WE, Dean DR. 1989a.** Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Molecular and General Genetics* **219**: 49-57.
- Jiménez-Vicente E, Navarro-Rodríguez M, Poza-Carrión C, Rubio LM. 2014.** Role of *Azotobacter vinelandii* FdxN in FeMo-co biosynthesis. *FEBS Letters* **588**: 512–516.

- Jimenez-Vicente E, Yang ZY, Keith Ray W, Echavarri-Erasun C, Cash VL, Rubio LM, Seefeldt LC, Dean DR. 2018.** Sequential and differential interaction of assembly factors during nitrogenase MoFe protein maturation. *Journal of Biological Chemistry* **293**: 9812–9823.
- Jimenez-Vicente E, Yang ZY, Martin del Campo JS, Cash VL, Seefeldt LC, Dean DR. 2019.** The NifZ accessory protein has an equivalent function in maturation of both nitrogenase MoFe protein P-clusters. *Journal of Biological Chemistry* **294**: 6204–6213.
- Joerger RD, Bishop PE, Brigle KE, Weiss MC, Newton WE, Dean DR, Bacteriol J. 1988.** Nucleotide sequence and genetic analysis of the nifB-nifQ region from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **170**: 1475-1487.
- Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK. 2005.** Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry* **74**: 247–281.
- Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK. 2005.** Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry* **74**: 247–281.
- Johnson DC, Unciuleac MC, Dean DR. 2006.** Controlled expression and functional analysis of iron-sulfur cluster biosynthetic components within *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **188**: 7551–7561.
- Jones JD. 2020.** Iron availability and management considerations: A 4R Approach. *Crops & Soils* **53**: 32–37.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis, D. 2021.** Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**: 583–589.
- Kapoor D, Sharma R, Handa N, Kaur H, Rattan A, Yadav P, Gautam V, Kaur R, Bhardwaj R. 2015.** Redox homeostasis in plants under abiotic stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols. *Frontiers in Environmental Science* **3**: 13.
- Kim J, Rees DC. 1992.** Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science* **257**: 1677-1682.

- Kim S, Burgess BK. 1996.** Evidence for the direct interaction of the *nifW* gene product with the MoFe protein. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 9764–9770.
- Kim JH, Frederick RO, Reinen NM, Troupis AT, Markley JL. 2013.** [2Fe-2S]-ferredoxin binds directly to cysteine desulfurase and supplies an electron for iron–sulfur cluster assembly but is displaced by the scaffold protein or bacterial frataxin. *Journal of the American Chemical Society* **135**: 8117–8120.
- Klipp W, Masepohl B, Gallon JR, Newton WE. 2004.** Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Kneip C, Lockhart P, Voß C, Maier UG. 2007.** Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 1–12.
- Kraepiel AML, Bellenger JP, Wichard T, Morel FMM. 2009.** Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *BioMetals* **22**: 573–581.
- Krebs C, Agar JN, Smith AD, Frazzon J, Dean DR, Huynh BH, Johnson MK. 2001.** IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry* **40**: 14069–14080.
- Kruger NJ. 2009.** The Bradford method for protein quantitation. *The Protein Protocols Handbook*, 17–24.
- Kumánovics A, Chen OS, Li L, Bagley D, Adkins EM, Lin H, Dingra NN, Outten CE, Keller G, Winge D, Ward DM, Kaplan J. 2008.** Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 10276–10286.
- Kumar K, Mella-Herrera RA, Golden JW. 2010.** Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**: a000315.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Laghaei R, Evans DG, Coalson RD. 2013.** Metal binding sites of human H-chain ferritin and iron transport mechanism to the ferroxidase sites: a molecular dynamics simulation study. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **81**: 1042–1050.
- Lau CKY, Krewulak KD, Vogel HJ. 2016.** Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiology Reviews* **40**: 273–298.

- Layer G. 2021.** Heme biosynthesis in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1868**: 118861.
- Lee CC, Blank MA, Fay AW, Yoshizawa JM, Hu Y, Hodgson KO, Hedman B, Ribbe MW. 2009.** Stepwise formation of P-cluster in nitrogenase MoFe protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 18474-18478.
- Li H, Mapolelo DT, Randeniya S, Johnson MK, Outten CE. 2012.** Human glutaredoxin 3 forms [2Fe-2S]-bridged complexes with human BolA2. *Biochemistry* **51**: 1687–1696.
- Li H, Outten CE. 2012.** Monothiol CGFS glutaredoxins and bolA-like proteins: [2Fe-2S] binding partners in iron homeostasis. *Biochemistry* **51**: 4377–4389.
- Liermann LJ, Guynn RL, Anbar A, Brantley SL. 2005.** Production of a molybdophore during metal-targeted dissolution of silicates by soil bacteria. *Chemical Geology* **220**: 285–302.
- Lill R, Freibert SA. 2020.** Mechanisms of mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **89**: 471-499.
- Lillig CH, Berndt C, Holmgren A. 2008.** Glutaredoxin systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1780**: 1304-1317.
- Lillig HC, Berndt C, Vergnolle O, Elisabet Lönn M, Hudemann C, Bill E, Holmgren A, Richard Lerner by A. 2005.** Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: A possible role as redox sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8168-8173.
- Lim BL. 2010.** TonB-dependent receptors in nitrogen-fixing nodulating bacteria. *Microbes and Environments* **25**: 67–74.
- Liu HL, Zhou HN, Xing WM, Zhao JF, Li SX, Huang JF, Bi RC. 2004.** 2.6 Å resolution crystal structure of the bacterioferritin from *Azotobacter vinelandii*. *FEBS Letters* **573**: 93–98.
- Liu X, Kim K, Leighton T, Theil EC. 2006.** Paired *Bacillus anthracis* Dps (mini-ferritin) have different reactivities with peroxide. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 27827–27835.
- Loiseau L, Ollagnier-de-Choudens S, Nachin L, Fontecave M, Barras F. 2003.** Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial suf system. SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 38352–38359.

- Maathuis FJ. 2009.** Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 250–258.
- Makui H, Roig E, Cole ST, Helmann JD, Gros P, Cellier MFM. 2000.** Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Molecular Microbiology* **35**: 1065–1078.
- Marinoni EN, Deoliveira JS, Nicolet Y, Raulfs EC, Amara P, Dean DR, Fontecilla-Camps JC. 2012.** (IscS-IscU)₂ complex structures provide insights into Fe₂S₂ biogenesis and transfer. *Angewandte Chemie - International Edition* **51**: 5439–5442.
- Martin del Campo JS, Rigsbee J, Bueno Batista M, Mus F, Rubio LM, Einsle O, Peters JW, Dixon R, Dean DR, Dos Santos PC. 2022.** Overview of physiological, biochemical and regulatory aspects of nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **57**: 492–538.
- McRose DL, Baars O, Morel FMM, Kraepiel AML. 2017.** Siderophore production in *Azotobacter vinelandii* in response to Fe-, Mo- and V-limitation. *Environmental Microbiology* **19**: 3595–3605.
- Mendel RR, Hercher TW, Zupok A, Hasnat MA, Leimkühler S. 2020.** The requirement of inorganic Fe-S clusters for the biosynthesis of the organometallic molybdenum cofactor. *Inorganics* **8**: 1–23.
- Meyer Y, Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld JP, Riondet C. 2012.** Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: Molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxidants and Redox Signaling* **17**: 1124–1160.
- Mondal S, Kumar V, Singh SP. 2020.** Phylogenetic distribution and structural analyses of cyanobacterial glutaredoxins (Grxs). *Computational Biology and Chemistry* **84**.
- Moreira AC, Mesquita G, Gomes MS. 2020.** Ferritin: an inflammatory player keeping iron at the core of pathogen-host interactions. *Microorganisms* **8**: 589.
- Morimoto K, Yamashita E, Kondou Y, Lee SJ, Arisaka F, Tsukihara T, Nakai M. 2006.** The asymmetric IscA homodimer with an exposed [2Fe-2S] cluster suggests the structural basis of the Fe-S cluster biosynthetic scaffold. *Journal of Molecular Biology* **360**: 117–132.
- Morrissey J, Guerinot ML. 2009.** Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chemical reviews* **109**: 4553–4567.

- Moss ML, Mellon MG. 1942.** Colorimetric determination of iron with 2,2'-bipyridyl and with 2,2',2'-terpyridyl. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* **14**: 862-865.
- Mouncey NJ, Mitchenall LA, Pau RN. 1995.** Mutational analysis of genes of the mod locus involved in molybdenum transport, homeostasis, and processing in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of bacteriology* **177**: 5294-5302.
- Mühlenhoff U, Molik S, Godoy JR, Uzarska MA, Richter N, Seubert A, Zhang Y, Stubbe J, Pierrel F, Herrero E, Lillig CH, Lill R. 2010.** Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metabolism* **12**: 373–385.
- Mus F, Alleman AB, Pence N, Seefeldt LC, Peters JW. 2018.** Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation. *Metallomics* **10**: 523–538.
- Navarro-Rodríguez M. 2019.** Molybdenum metabolism in *Azotobacter vinelandii* and its biotechnological applications. Tesis doctoral.
- Neilands JB. 1995.** Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 26723–26726.
- Noar JD, Bruno-Bárcena JM. 2018.** *Azotobacter vinelandii*: The source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology* **164**: 421–436.
- Nzuza N, Padayachee T, Chen W, Gront D, Nelson DR, Syed K. 2021.** Diversification of ferredoxins across living organisms. *Current Issues in Molecular Biology* **43**: 1374–1390.
- Oldroyd GED, Dixon R. 2014.** Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current Opinion in Biotechnology* **26**: 19–24.
- Oldroyd GED. 2013.** Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 252–263.
- Ollagnier-De-Choudens S, Mattioli T, Takahashi Y, Fontecave M. 2001.** Iron-sulfur cluster assembly. Characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 22604–22607.
- Ollagnier-de-Choudens S, Sanakis Y, Fontecave M. 2004.** SufA/IscA: Reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in [Fe-S] cluster assembly. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **9**: 828–838.

- Outten FW, Wood MJ, Muñoz FM, Storz G. 2003.** The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 45713–45719.
- Page WJ, Kwon E, Cornish AS, Tindale AE. 2003.** The *csbX* gene of *Azotobacter vinelandii* encodes an MFS efflux pump required for catecholate siderophore export. *FEMS Microbiology Letters* **228**: 211–216.
- Page WJ, Von Tigerstrom M. 1979.** Optimal conditions for transformation of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **139**: 1058–1061.
- Paul W, Merrick M. 1989.** The roles of the *nifW*, *nifZ* and *nifM* genes of *Klebsiella pneumoniae* in nitrogenase biosynthesis. *European Journal of Biochemistry* **178**: 675–682.
- Petasis DT, Hendrich MP. 2015.** Quantitative interpretation of multifrequency multimode EPR spectra of metal containing proteins, enzymes, and biomimetic complexes. *Methods in Enzymology* **563**: 171–208.
- Phillips AH, Hernandez JA, Payá-Tormo L, Burén S, Cuevas-Zuñiría B, Pacios LF, Pelton JG, Wemmer DE, Rubio LM. 2021.** Environment and coordination of FeMo-co in the nitrogenase metallochaperone NafY. *RSC Chemical Biology* **2**: 1462–1465.
- Philpott CC, Ryu MS, Frey A, Patel S. 2017.** Cytosolic iron chaperones: proteins delivering iron cofactors in the cytosol of mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* **292**: 12764–12771.
- Pienkost PT, Brill WJ. 1981.** Molybdenum accumulation and storage in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **145**: 743–751.
- Pierrel F, Douki T, Fontecave M, Atta M. 2004.** MiaB protein is a bifunctional radical-S-adenosylmethionine enzyme involved in thiolation and methylation of tRNA. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 47555–47563.
- Piskin E, Cinciosi D, Gulec S, Tomas M, Capanoglu E. 2022.** Iron absorption: factors, limitations and improvement methods. *ACS Omega* **7**: 20441–20456.
- Pope MT, Still ER, Williams RJP. 1980.** A comparison between the chemistry and biochemistry of molybdenum and related elements. *Molybdenum and molybdenum-containing enzymes*. Pergamon: 1–40.

Poppe J, Brünle S, Hail R, Wieseemann K, Schneider K, Ermiler U. 2018. The molybdenum storage protein: a soluble ATP hydrolysis-dependent molybdate pump. *FEBS Journal* **285**: 4602–4616.

Postgate J. 1981. Microbiology of the free-living nitrogen-fixing bacteria, excluding cyanobacteria. *Current perspectives in nitrogen fixation* Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical.

Poza-Carrión C, Jiménez-Vicente E, Navarro-Rodríguez M, Echavarri-Erasun C, Rubio LM. 2014. Kinetics of nif gene expression in a nitrogen-fixing bacterium. *Journal of Bacteriology* **196**: 595–603.

Prigge JR, Coppo L, Martin SS, Ogata F, Miller CG, Bruschwein MD, Orlicky DJ, Shearn CT, Kundert JA, Lytchier J, Herr AE, Mattson A, Taylor MP, Gustafsson TN, Arnér ESJ, Holmgren A, Schmidt EE. 2017. Hepatocyte hyperproliferation upon liver-specific co-disruption of thioredoxin-1, thioredoxin reductase-1, and glutathione reductase. *Cell Reports* **19**: 2771–2781.

Py B, Gerez C, Angelini S, Planel R, Vinella D, Loiseau L, Talla E, Brochier-Armanet C, Garcia-Serres R, Latour JM, Ollagnier-de Choudens S, Fontecave M, Barras F. 2012. Molecular organization, biochemical function, cellular role and evolution of NfuA, an atypical Fe-S carrier. *Molecular Microbiology* **86**: 155-171.

Py B, Gerez C, Huguenot A, Vidaud C, Fontecave M, Ollagnier de Choudens S, Barras F. 2018. The ErpA/NfuA complex builds an oxidation-resistant Fe-S cluster delivery pathway. *Journal of Biological Chemistry* **293**: 7689–7702.

Qin L, Wang M, Zuo J, Feng X, Liang X, Wu Z, Ye H. 2015. Cytosolic BolA plays a repressive role in the tolerance against excess iron and MV-induced oxidative stress in plants. *PLoS ONE* **10**.

Quail MA, Jordan P, Grogan JM, Butt JN, Lutz M, Thomson AJ, Andrews SC, Guest JR. 1996. Spectroscopic and voltammetric characterisation of the bacterioferritin-associated ferredoxin of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **229**: 635-642.

Rangaraj P, Ryle MJ, Lanzilotta WN, Ludden PW, Shah VK. 1999. In vitro biosynthesis of iron-molybdenum cofactor and maturation of the nif-encoded apodinitrogenase: effect of substitution for NifH with site-specifically altered forms of NifH. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 19778-19784.

Rangaraj P, Shah VK, Ludden PW. 1997. ApoNifH functions in iron-molybdenum cofactor synthesis and apodinitrogenase maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 11.250-11.255.

- Raymond J, Siefert JL, Staples CR, Blankenship RE. 2004.** The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 541-554.
- Rees JA, Bjornsson R, Schlesier J, Sippel D, Einsle O, DeBeer S. 2015.** The Fe–V cofactor of vanadium nitrogenase contains an interstitial carbon atom. *Angewandte Chemie* **127**: 13447–13450.
- Ren X, Zou L, Zhang X, Branco V, Wang J, Carvalho C, Holmgren A, Lu J. 2017.** Redox signaling mediated by thioredoxin and glutathione systems in the central nervous system. *Antioxidants and Redox Signaling* **27**: 989–1010.
- Rey P, Taupin-Broggini M, Couturier J, Vignols F, Rouhier N. 2019.** Is there a role for glutaredoxins and BOLAs in the perception of the cellular iron status in plants? *Frontiers in Plant Science* **10**: 458523.
- Rivera M. 2023.** Mobilization of iron stored in bacterioferritin, a new target for perturbing iron homeostasis and developing antibacterial and antibiofilm molecules. *Journal of Inorganic Biochemistry* **247**: 112306.
- Rivera, M. 2017.** Bacterioferritin: structure, dynamics, and protein-protein interactions at play in iron storage and mobilization. *Accounts of Chemical Research* **50**: 331–340.
- Roberts CS, Ni F, Mitra B. 2021.** The zinc and iron binuclear transport center of ZupT, a ZIP transporter from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **60**: 3738–3752.
- Robinson AC, Chun TW, Li JG, Burgess BK. 1989.** Iron-molybdenum cofactor insertion into the apo-MoFe protein of nitrogenase involves the iron protein-MgATP complex. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 10088-10095.
- Roche B, Aussel L, Ezraty B, Mandin P, Py B, Barras F. 2013.** Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1827**: 455–469.
- Rodríguez-Manzaneque MT, Ros J, Cabiscol E, Sorribas A, Herrero E. 1999.** Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 8180-8190.
- Rodríguez-Manzaneque MT, Tamarit J, Bellí G, Ros J, Herrero E. 2002.** Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Molecular Biology of the Cell* **13**: 1109–1121.

- Rodriguez-Quinones F, Bosch R, Imperial J. 1993.** Expression of the nifBfdxNnifOQ region of *Azotobacter vinelandii* and its role in nitrogenase activity. *Journal of Bacteriology* **175**: 2926-2935.
- Rosa-Núñez E, Echavarri-Erasun C, Armas AM, Escudero V, Poza-Carrión C, Rubio LM, González-Guerrero M. 2023.** Iron homeostasis in *Azotobacter vinelandii*. *Biology* **12**: 1423.
- Rouault TA, Tong WH. 2008.** Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends in Genetics* **24**: 398–407.
- Rouhier N, Couturier J, Johnson MK, Jacquot JP. 2010.** Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends in Biochemical Sciences* **35**: 43–52.
- Rouhier N, Unno H, Bandyopadhyay S, Masip L, Kim SK, Hirasawa M, Gualberto JM, Lattard V, Kusunoki M, Knaff DB, Georgiou G, Hase T, Johnson MK, Jacquot JP. 2007.** Functional, structural and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 7379-7384.
- Rubio LM, Ludden PW. 2005.** Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *Journal of Bacteriology* **187**: 405–414.
- Rubio LM, Rangaraj P, Homer MJ, Roberts GP, Ludden PW. 2002.** Cloning and mutational analysis of the γ gene from *Azotobacter vinelandii* defines a new family of proteins capable of metallocluster binding and protein stabilization. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 14299–14305.
- Rubio LM, Singer SW, Ludden PW. 2004.** Purification and Characterization of NafY (Apodinitrogenase γ Subunit) from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 19739-19746.
- Rui H, Rivera M, Im W. 2012.** Protein dynamics and ion traffic in bacterioferritin. *Biochemistry* **51**: 9900–9910.
- Sambrook J, Russell DW. 2006.** Transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. *Cold Spring Harbor Protocols* **1**: pdb-prot3932.
- Sankari S, O'Brian MR. 2016.** The *Bradyrhizobium japonicum* ferrous iron transporter FeoAB is required for ferric iron utilization in free living aerobic cells and for symbiosis. *Journal of Biological Chemistry* **291**: 15653-62.
- Santos JM, Freire P, Vicente M, Arraiano CM. 1999.** The stationary-phase morphogene bolA from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. *Molecular Microbiology* **32**: 789–798.

- Santos JM, Lobo M, Matos APA, De Pedro MA, Arraiano CM. 2002.** The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **45**: 1729–1740.
- Schemberg J, Schneider K, Demmer U, Warkentin E, Müller A, Ermler U. 2007.** Towards biological supramolecular chemistry: a variety of pocket-templated, individual metal oxide cluster nucleations in the cavity of a Mo/W-storage protein. *Angewandte Chemie International Edition* **46**: 2408-2413.
- Schemberg J, Schneider K, Fenske D, Müller A. 2008.** *Azotobacter vinelandii* metal storage protein: “classical” inorganic chemistry involved in Mo/W uptake and release processes. *ChemBioChem* **9**: 595–602.
- Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR. 2009.** Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry* **78**: 701–722.
- Self WT, Grunden AM, Hasona A, Shanmugam KT. 2001.** Molybdate transport. *Research in Microbiology* **152**: 311-321.
- Setubal JC, Dos Santos P, Goldman BS, Ertesvåg H, Espin G, Rubio LM, Valla S, Almeida NF, Balasubramanian D, Cromes L, Curatti L, Du Z, Godsy E, Goodner B, Hellner-Burris K, Hernandez JA, Houllmiller K, Imperial J, Kennedy C, Larson TJ, Latreille P, Ligon LS, Lu J, Maerk M, Miller NM, Norton S, O’Carroll IP, Paulsen I, Raulfs EC, Roemer R, Rosser J, Segura D, Slater S, Stricklin S, Studholme DJ, Sun J, Viana CJ, Wang B, Wheeler C, Zhu H, Dean DR, Dixon R, Wood D. 2009.** Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology* **191**: 4534–4545.
- Shah VK, Allen JR, Spangler NJ, Ludden PW. 1994.** *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Purification and characterization of NifB cofactor, the product of NIFB protein. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 1154-1158.
- Shah VK, Brill WJ. 1977.** Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 3249-3253.
- Shakamuri P, Zhang B, Johnson MK. 2012.** Monothiol glutaredoxins function in storing and transporting [Fe₂S₂] clusters assembled on IscU scaffold proteins. *Journal of the American Chemical Society* **134**: 15213–15216.

- Shi R, Proteau A, Villarroja M, Moukadiri I, Zhang L, Trempe JF, Matte A, Eugenia Armengod E, Cygler M. 2010.** Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biology* **8**: e1000354.
- Shin M, Park J, Jin Y, Kim IJ, Payne SM, Kim KH. 2020.** Biochemical characterization of bacterial FeoBs: a perspective on nucleotide specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **685**: 108350.
- Smil V. 2004.** Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch and the transformation of world food production. *MIT press*.
- Smith AD, Jameson GNL, Dos Santos PC, Agar JN, Naik S, Krebs C, Frazzon J, Dean DR, Huynh BH, Johnson MK. 2005.** NifS-mediated assembly of [4Fe-4S] clusters in the N- and C-terminal domains of the NifU scaffold protein. *Biochemistry* **44**: 12955–12969.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Frovenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**: 76-85.
- Soboh B, Igarashi RY, Hernandez JA, Rubio LM. 2006.** Purification of a NifEN protein complex that contains bound molybdenum and a FeMo-Co precursor from an *Azotobacter vinelandii* Δ nifHDK strain. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 36701–36709.
- Spatzal T, Aksoyoglu M, Zhang L, Andrade SLA, Schleicher E, Weber S, Rees DC, Einsle O. 2011.** Evidence for interstitial carbon in nitrogenase FeMo cofactor. *Science* **334**: 940.
- Sprent JI, Raven JA. 1985.** Evolution of nitrogen-fixing symbioses. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences* **85**: 215-237.
- Stanbury DM. 2022.** The principle of detailed balancing, the iron-catalyzed disproportionation of hydrogen peroxide, and the Fenton reaction. *Dalton Transactions* **51**: 2135–2157.ç
- Stewart WD, Fitzgerald GP, Burris R. 1967.** *In situ* studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **58**: 2071-2078.
- Strand GW, Wilson PW. 1968.** Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*. *Canadian Journal of Microbiology* **14**: 25-31.
- Studier FW, Moffattf BA. 1986.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**: 113-130.

- Sudarev VV, Dolotova SM, Bukhalovich SM, Bazhenov S V, Ryzhykau YL, Uversky VN, Bondarev NA, Osipov SD, Mikhailov AE, Kuklina DD, Murugova TN, Manukhov IV, Rogachev AV, Gordeliy VI, Gushchin IY, Kuklin AI, Vlasov AV. 2023.** Ferritin self-assembly, structure, function, and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **224**: 319–343.
- Tan G, Lu J, Bitoun JP, Huang H, Ding H. 2009.** IscA/SufA paralogues are required for the [4Fe-4S] cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in *Escherichia coli* under aerobic growth conditions. *Biochemical Journal* **420**: 463–472.
- Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. 2021.** Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Research* **31**: 107–125.
- Tejada-Jiménez M, Galván A, Fernández E. 2011.** Algae and humans share a molybdate transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 6420–6425.
- Tejada-Jiménez M, Llamas A, Sanz-Luque E, Galvá A, Fernández E. 2007.** A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 20126–20130.
- Thomas C, Tampé R. 2020.** Structural and mechanistic principles of ABC transporters. *Annual review of Biochemistry* **89**: 605–636.
- Tindale AE, Mehrotra M, Ottem D, Page WJ. 2000.** Dual regulation of catecholate siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. *Microbiology* **146**: 1617–1626.
- Tong WH, L Jameson GN, Hanh Huynh B, Rouault TA.** Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 9762–9767.
- Tosha T, Ng HL, Bhattasali O, Alber T, Theil EC. 2010.** Moving metal ions through ferritin-protein nanocages from three-fold pores to catalytic sites. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 14562–14569.
- Unciuleac MC, Chandramouli K, Naik S, Mayer S, Boi HH, Johnson MK, Dean DR. 2007.** In vitro activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe - S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry* **46**: 6812–6821.

- Uzarska MA, Dutkiewicz R, Freibert SA, Lill R, Mühlenhoff U. 2013.** The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Molecular Biology of the Cell* **24**: 1830–1841.
- Van Stappen C, Jiménez-Vicente E, Pérez-González A, Yang ZY, Seefeldt LC, DeBeer S, Dean DR, Decamps L. 2022.** A conformational role for NifW in the maturation of molybdenum nitrogenase P-cluster. *Chemical Science* **13**: 3489–3500.
- Velayudhan J, Castor M, Richardson A, Main-Hester KL, Fang FC. 2007.** The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium*: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Molecular Microbiology* **63**: 1495–1507.
- Vieira HLA, Freire P, Arraiano CM. 2004.** Effect of *Escherichia coli* morphogene bolA on biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5682–5684.
- Vilella F, Alves R, Rodríguez-Manzaneque MT, Bellí G, Swaminathan S, Sunnerhagen P, Herrero E. 2004.** Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron-sulphur cluster assembly. *Comparative and Functional Genomics* **5**: 328–341.
- Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ. 2009.** Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**: 823–830.
- Wang L, Ouyang B, Li Y, Feng Y, Jacquot JP, Rouhier N, Xia B. 2012.** Glutathione regulates the transfer of iron-sulfur cluster from monothiol and dithiol glutaredoxins to apo ferredoxin. *Protein and Cell* **3**: 714–721.
- Wang Y, Yao H, Cheng Y, Lovell S, Battaile KP, Midaugh CR, Rivera M. 2015.** Characterization of the bacterioferritin/bacterioferritin associated ferredoxin protein-protein interaction in solution and determination of binding energy hot spots. *Biochemistry* **54**: 6162–6175.
- Wedepohl KH. 1995.** The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**: 1217–1232.
- Weeratunga SK, Gee CE, Lovell S, Zeng Y, Woodin CL, Rivera M. 2009.** Binding of *Pseudomonas aeruginosa* apo-bacterioferritin-associated ferredoxin to bacterioferritin B promotes heme mediation of electron delivery and mobilization of core mineral iron. *Biochemistry* **48**: 7420–7431.

- Wells WW, Rocque PA, Xu D-P, Yang Y, Deits TL. 1991.** Interactions of platinum complexes with thioltransferase (glutaredoxin), in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **180**: 735-741.
- Wichard T, Bellenger JP, Loison A, Kraepiel AML. 2008.** Catechol siderophores control tungsten uptake and toxicity in the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii*. *Environmental Science and Technology* **42**: 2408–2413.
- Wijerathne H, Yao H, Wang Y, Lovell S, Battaile KP, Rivera M. 2018.** Bfd, a new class of [2Fe-2S] protein that functions in bacterial iron homeostasis, requires a structural anion binding site. *Biochemistry* **57**: 5533–5543.
- Wik M, Pingali P, Brocai S. 2008.** Global agricultural performance: past trends and future prospects. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Wingert RA, Galloway JL, Barut B, Foott H, Fraenkel P, Axe JL, Weber GJ, Dooley K, Davidson AJ, Schmidt B, Paw BH, Shaw GC, Kingsley P, Palis J, Schubert H, Chen O, Kaplan J, The Tübingen 2000 Screen Consortium, Leonard I. Zon LI. 2005.** Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* **436**: 1035–1039.
- Winterbourn CC. 1995.** Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology letters* **82**: 969-974.
- Wu Q, Lin J, Liu JZ, Wang X, Lim W, Oh M, Park J, Rajashekar CB, Whitham SA, Cheng NH, Hirschi KD, Park S. 2012.** Ectopic expression of Arabidopsis glutaredoxin AtGRXS17 enhances thermotolerance in tomato. *Plant Biotechnology Journal* **10**: 945–955.
- Wu X, Wang Y, Ni Q, Li H, Wu X, Yuan Z, Xiao R, Ren Z, Lu J, Yun J, Wang Z, Li, X. 2023.** GmYSL7 controls iron uptake, allocation, and cellular response of nodules in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology* **65**: 167–187.
- Xing S, Lauri A, Zachgo S. 2006.** Redox regulation and flower development: A novel function for glutaredoxins. *Plant Biology* **8**: 547–555.
- Xing S, Zachgo S. 2008.** ROXY1 and ROXY2, two Arabidopsis glutaredoxin genes, are required for anther development. *Plant Journal* **53**: 790–801.
- Xuan W, Beeckman T, Xu G. 2017.** Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **39**: 57–65.

- Yanatori I, Richardson DR, Imada K, Kishi F. 2016.** Iron export through the transporter ferroportin 1 is modulated by the iron chaperone PCBP2. *Journal of Biological Chemistry* **291**: 17303–17318.
- Yanatori I, Yasui Y, Tabuchi M, Kishi F. 2014.** Chaperone protein involved in transmembrane transport of iron. *Biochemical journal* **462**: 25–37.
- Yao H, Wang Y, Lovell S, Kumar R, Ruvinsky AM, Battaile KP, Vakser IA, Rivera M. 2012.** The structure of the BfrB-Bfd complex reveals protein-protein interactions enabling iron release from bacterioferritin. *Journal of the American Chemical Society* **134**: 13470–13481.
- Yasmin S, Andrews SC, Moore GR, Le Brun NE. 2011.** A new role for heme, facilitating release of iron from the bacterioferritin iron biomineral. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 3473–3483.
- Ye H, Jeong SY, Ghosh MC, Kovtunovych G, Silvestri L, Ortillo D, Uchida N, Tisdale J, Camaschella C, Rouault TA. 2010.** Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *Journal of Clinical Investigation* **120**: 1749–1761.
- Yeung N, Gold B, Liu NL, Prathapam R, Sterling HJ, Williams ER, Butland G. 2011.** The *E. coli* monothiol glutaredoxin GrxD forms homodimeric and heterodimeric Fe-S cluster containing complexes. *Biochemistry* **50**: 8957–8969.
- Yoch DC, Carithers RP. 1979.** *Bacterial Iron-Sulfur Proteins. Microbiological Reviews* **43**: 384-421.
- Yuvaniyama P, Agar JN, Cash VL, Johnson MK, Dean DR. 2000.** NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 599-604
- Zhang B, Bandyopadhyay S, Shakamuri P, Naik SG, Huynh BH, Couturier J, Rouhier N, Johnson MK. 2013.** Monothiol glutaredoxins can bind linear [Fe₃S₄]⁺ and [Fe₄S₄]²⁺ clusters in addition to [Fe₂S₂]²⁺ clusters: Spectroscopic characterization and functional implications. *Journal of the American Chemical Society* **135**: 15153–15164.
- Zhang B, Bandyopadhyay S, Shakamuri P, Naik SG, Huynh BH, Couturier J, Rouhier N, Johnson MK. 2013.** Monothiol glutaredoxins can bind linear [Fe₃S₄]⁺ and [Fe₄S₄]²⁺ clusters in addition to [Fe₂S₂]²⁺ clusters: spectroscopic characterization and functional implications. *Journal of American Chemical Society* **135**: 15153–15164.

Zhang X, Ward BB, Sigman DM. 2020. Global nitrogen cycle: critical enzymes, organisms and processes for nitrogen budgets and dynamics. *Chemical Reviews* **120**: 5308–5351.

Zhao D, Curatti L, Rubio LM. 2007. Evidence for nifU and nifS participation in the biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 37016–37025.

Zheng C, Dos Santos PC. 2018. Metallocluster transactions: dynamic protein interactions guide the biosynthesis of Fe-S clusters in bacteria. *Biochemical Society Transactions* **46**:1593–1603.

Zheng L, White RH, Dean DR. 1997. Purification of the *Azotobacter vinelandii* nifV-encoded homocitrate synthase. *Journal of Bacteriology* **179**: 5963-5966.

