

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



## El sistema cAMP-Crp de *Pseudomonas putida*



Tesis Doctoral

Paola Andrea Milanesio

Madrid, 2007



Memoria presentada por Paola Andrea Milanesio para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de la Tesis Doctoral:

Víctor de Lorenzo Prieto. Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología.



## INDICE

<b>INDICE</b>	<b>5</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>9</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>13</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>15</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>19</b>
<b>1. <i>Pseudomonas putida</i> y regulación fisiológica de genes catabólicos</b>	<b>21</b>
<b>2. CRP y CyA</b>	<b>23</b>
2.1. Reguladores transcripcionales Crp-Fnr: Crp de <i>Escherichia coli</i> , Vfr de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y Clp de <i>Xantomonas campestris</i>	24
2.1.1. Crp en <i>Escherichia coli</i>	25
2.1.2. Vfr de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
2.1.3. Clp de <i>Xantomonas campestris</i>	30
<b>3. Motilidad bacteriana y factores tipo Crp-Fnr</b>	<b>31</b>
<b>4. Flagelo, la estructura procariótica por excelencia en movilidad</b>	<b>33</b>
4.1. Estructura del flagelo	33
4.2. Biosíntesis del flagelo	34
<b>5. Crp, Vfr, Clp y motilidad.</b>	<b>36</b>
<b>6. Motilidad y pared celular</b>	<b>37</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>45</b>
<b>1. Cepas y Plásmidos</b>	<b>47</b>
<b>2. Construcción de las cepas <i>P. putida crp</i>, <i>P. putida cyaA</i> y la doble mutante <i>P. putida crp cyaA</i></b>	<b>50</b>

## Índice

2.1. Construcción de <i>P. putida crp</i>	51
2.2. Construcción de <i>P. putida cyaA</i>	51
2.3. Construcción de <i>P. putida crp cyaA</i>	53
<b>3. Construcción de los plásmidos pMZC5 y pMZV7</b>	<b>54</b>
<b>4. Medios y condiciones de cultivo</b>	<b>55</b>
<b>5. Manipulación de ácidos nucleicos</b>	<b>56</b>
5.1. Extracción de ADN genómico de <i>Pseudomonas putida</i>	56
5.2. Extracción de ADN plasmídico	57
5.3. Digestión y Ligación de Fragmentos de ADN	59
5.4. Aislamiento de fragmentos a partir de geles de agarosa	59
<b>6. Diseño de los oligonucleótidos</b>	<b>59</b>
<b>7. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR</b>	<b>61</b>
<b>8. Análisis y comparación de secuencias</b>	<b>61</b>
<b>9. Preparación de extracto de proteínas totales</b>	<b>62</b>
9.1. Electroforesis de proteínas	62
9.2. Ensayos de inmunodetección, <i>Western blot</i>	62
<b>10. Extracción y Visualización del lipopolisacárido (LPS)</b>	<b>63</b>
<b>11. Ensayo de Retardo de la movilidad electroforética</b>	<b>64</b>
<b>12. Tinción y visualización de flagelos</b>	<b>65</b>
<b>13. Ensayo de transcriptómica</b>	<b>66</b>
<b>14. Inmunoprecipitación y MicroChip de ADN (<i>CHIP to CHIP</i>)</b>	<b>68</b>
<b>15. Microscopía electrónica</b>	<b>69</b>
<b>16. Identificación de impronta peptídico</b>	<b>71</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>73</b>
<b>Capítulo I</b>	<b>75</b>
1. Identificación de los genes <i>crp</i> y <i>cyaA</i> en el genoma de <i>Pseudomonas putida</i>	77
2. Construcción de las mutantes <i>P. putida crp</i> , <i>P. putida cyaA</i> y <i>P. putida crp cyaA</i>	79
2.1. Construcción de <i>P. putida crp</i>	80
2.2. Construcción de <i>P. putida cyaA</i>	81

2.3. Construcción de <i>P. putida crp cyaA</i>	82
3. Estudios de semejanza estructural y funcional entre Crp de <i>P. putida</i> y Crp de <i>E. coli</i>	83
3.1. Reacción cruzada con anticuerpo anti Crp	83
3.2. Estudio de complementación en <i>Escherichia coli</i>	85
4. Búsqueda bioinformática	89
<b>Capítulo II</b>	<b>93</b>
1. Estudio de la Profundidad Funcional del gen <i>crp</i>	95
1.1. <i>Phenotype microArray (PMs)</i>	95
1.2. Ensayo de transcriptómica, MicroChip de ADN	100
1.3. Combinación de inmunoprecipitación de ADN y MicroChip de ADN ( <i>ChIP to Chip</i> )	103
<b>Capítulo III</b>	<b>107</b>
1. Crecimiento	109
2. Resistencia/Sensibilidad	109
2.1. Resistencia al Pirofosfato de sodio $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_3$	109
2.2. Sensibilidad a 9-aminoacridina	109
2.3. Resistencia a colistina	110
2.3.1. Visualización de Lipopolisacáridos (LPS)	113
3. Medición de la concentración de cAMP	113
4. Ensayos de producción de biofilm experimental	114
5. Ensayos de Movilidad	115
5.1. Visualización de flagelo	117
6. Interacción entre Crp y la región promotora del gen <i>flhA</i>	119
6.1. Amplificación y clonación del fragmento entre las Orfs PP4344 y PP4345, fragmento REPO	120
6.2. Enriquecimiento en la proteína Crp	121
<b>DISCUSION</b>	<b>125</b>
<b>1. Crp y CyaA forman el sistema cAMP-Crp en <i>P. putida</i></b>	<b>127</b>
1.1. Identificación de los genes <i>crp</i> y <i>cyaA</i> en <i>P. putida</i>	127
<b>2. Comparación con otros sistemas cAMP-Crp</b>	<b>128</b>
3. Posibles dianas del complejo cAMP-Crp en <i>P. putida</i>	133
3.1. Búsqueda bioinformática	133
3.2. Profundidad genómica funcional del gen <i>crp</i>	134
3.2.1. PMs	134
3.2.2. Transcriptómica	135
3.2.3. ChIP to Chip	136
<b>4. Caracterización fenotípica</b>	<b>137</b>

Indice

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>143</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO</b>	<b>167</b>
Anexo Parte I: Resultados de <i>Phenotypic microArray</i>	169
Anexo Parte III: Tabla de resultados CHIP to CHIP	186



**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Árbol filogenético	25
<b>Figura 2.</b> Esquema de la proteína Crp de <i>E. coli</i> en contacto con el ADN	26
<b>Figura 3.</b> Detalle de la región de la proteína Crp de <i>E. coli</i> que contacta con el cAMP	29
<b>Figura 4.</b> Esquema simplificado de la estructura del flagelo	34
<b>Figura 5.</b> Jerarquía y clasificación de los genes involucrados en la biosíntesis flagelar en <i>P. aeruginosa</i>	36
<b>Figura 6.</b> Esquema de la secuencia de construcción del plásmido pMZV4	52
<b>Figura 7.</b> Esquema de la secuencia de construcción de pMZC4	53
<b>Figura 8.</b> Esquema de la inmunoprecipitación de ADN con Crp marcada con c-Myc	70
<b>Figura 9.</b> Situación de <i>cyaA</i> en el cromosoma de <i>P. putida</i>	78
<b>Figura 10.</b> Localización de <i>crp</i> en el cromosoma de <i>P. putida</i>	79
<b>Figura 11.</b> Diferencia de tamaño entre las bandas amplificadas por PCR entre las cepas que llevan la versión silvestre del gen <i>crp</i> y las que llevan la versión <i>crp::xylE</i>	81
<b>Figura 12.</b> Diferencia de tamaño entre las bandas amplificadas por PCR entre las cepas que llevan la versión silvestre del gen <i>cyaA</i> y las que llevan la versión $\Delta cyaA::km$	82
<b>Figura 13.</b> Visualización de la reacción cruzada en extracto proteico de <i>P. putida</i> con un suero anti-Crp de <i>E. coli</i>	84
<b>Figura 14.</b> Correcta expresión del epítipo c-Myc desde	86

## Indice de Figuras

pMZV7

<b>Figura 15.</b> Visualización de la utilización de la maltosa en medio Mc Conkey	87
<b>Figura 16.</b> Visualización de la utilización de la maltosa en medio Mc Conkey cuando se complementan las mutantes <i>E. coli crp</i> y <i>E. coli cyaA</i> con los plásmidos pCK24Ncrp (Crp <sup>+</sup> ) y pCK24NcyaA (CyaA <sup>+</sup> ) respectivamente	87
<b>Figura 17.</b> Complementación de <i>E. coli crp</i> con Crp de <i>P. putida</i>	88
<b>Figura 18.</b> Gráfico de los resultados totales de PMs	96
<b>Figura 19.</b> Gráfico representativo de los fenotipos ganados en PMs	98
<b>Figura 20.</b> Gráfico representativo de los fenotipos perdidos en PMs	99
<b>Figura 21.</b> Gráfico en donde se representa la expresión diferencial de genes entre <i>P. putida cyaA</i> y la cepa silvestre <i>P. putida</i>	101
<b>Figura 22.</b> Gráfico de la expresión diferencial entre la cepas <i>P. putida crp</i> y la cepa <i>P. putida</i> silvestre	102
<b>Figura 23.</b> Distribución de los puntos obtenidos en <i>ChIP to CHIP</i>	104
<b>Figura 24.</b> Sensibilidad de las cepas <i>P. putida crp</i> y <i>P. putida crp cyaA</i>	110
<b>Figura 25.</b> Ensayo de dilución en tubo	110
<b>Figura 26.</b> CMI antibiótico colistina	111
<b>Figura 27.</b> Electroforesis mostrando el perfil de LPS	113
<b>Figura 28.</b> Medición de cantidad de cAMP	114
<b>Figura 29.</b> Ensayo de visualización de <i>biofilm</i> mediante Cristal Violeta	115

<b>Figura 30.</b> Movilidad <i>Swimming</i> en <i>P. putida</i>	116
<b>Figura 31.</b> Complementación de <i>P. putida crp</i> y <i>P. putida cyaA</i>	116
<b>Figura 32.</b> Visualización de flagelo en microscopio óptico	118
<b>Figura 33.</b> Visualización de Flagelo en microscopio electrónico	119
<b>Figura 34:</b> Localización en el cromosoma de la Orf PP4345 y <i>flhA</i>	120
<b>Figura 35.</b> Región promotora REPO entre las Orfs PP4344 y PP 4345.	121
<b>Figura 36.</b> Visualización de la banda mayoritaria correspondiente a la proteína Crp	122
<b>Figura 37.</b> Estudio de la movilidad electroforética de fragmento REPO, con y sin Crp.	123
<b>Figura 38.</b> Alineamiento entre las dos secuencias de aa de las proteínas Crp de <i>P. putida</i> (Crp.pp) y CRP de <i>E. coli</i> (Crp.ec)	129
<b>Figura 39.</b> Modelo del monómero de Crp de <i>P. putida</i>	130
<b>Figura 40.</b> Alineamiento de los residuos 170 a 189 de las proteínas Crp de <i>P. putida</i> y Crp de <i>E. coli</i>	132



**INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1:</b> Estirpes de <i>Escherichia coli</i>	47
<b>Tabla 2:</b> Estirpes de <i>Pseudomonas putida</i>	48
<b>Tabla 3:</b> Plásmidos	48
<b>Tabla 4:</b> Nombre y secuencia de los oligonucleótidos utilizados	60
<b>Tabla 5:</b> Sitios con la secuencia consenso encontrados en el genoma de <i>P. aeruginosa</i>	89
<b>Tabla 6:</b> Posibles sitios de unión encontrados con la secuencia restrictiva en el genoma de <i>P. putida</i>	90
<b>Tabla 7:</b> Posibles sitios de unión encontrados con la secuencia permisiva en el genoma de <i>P. putida</i>	90
<b>Tabla 8:</b> Resumen de genes presentes en los estudios globales PMs, CHIP to CHIP y Búsqueda bioinformática RSTA	105
<b>Tabla 9:</b> Recuento de bacterias con flagelos atípicos	117
<b>Tabla 10:</b> Recuento luego de la complementación	118



**ABREVIATURAS**

2-ME	2-Mercaptoetanol
aa	Aminoácidos
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
Ap	Ampicilina
ARN	Acido ribonucleico
BSA	Sero albúmina bovina
Cm	Cloranfenicol
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio o Bromuro de cetiltrimetilamonio
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	Deoxicitosina trifosfato
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
dGTP	Deoxiguanina trifosfato
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
EDTA	Acido etilendiamonotetraacético
gr	Gramo
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranósido
Kb	Kilobase
Km	Kanamicina
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
Mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro

## Abreviaturas

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
POD	Peroxidasa
Poli [d(I-C)]	Polímero de deoxinosina y deoxicitidina
RPM	Revoluciones por minuto
RT	Temperatura ambiente
SDS	Dodecilsulfato sódico
Tc	Tetraciclina
Tfa	Acido trifluoroacético
ON	Toda la noche
M-H	Muller Hilton



## SUMMARY

Motility and flagella play a crucial role in adhesion, biofilm formation, and colonization of target surfaces by bacteria. We report a genetic connection between motility and the adenylate cyclase CyaA/cAMP-receptor protein (Crp) system of *Pseudomonas putida* KT2440. The Crp of *P. putida* carries a cyclic nucleotide-binding domain, and a HTH motif and it complements the lack of the homologous protein in *E. coli*. On the contrary, adenylate cyclase of *P. putida* CyaA did not complement an *E. coli* *cyaA* mutant. To study the function of these two gene products in *P. putida*, single and double deletion mutants of *cya* and *crp* were constructed. Both lesions endowed an increased motility to the corresponding cells. Also, optical and electron microscopy analysis revealed an unusual morphology of the polar flagella. The effect of the loss of Crp or CyaA could be reverted when the corresponding genes were expressed in *trans* from inducible plasmids. The *crp* mutant showed a greater ability to form biofilms. By means of ChIP to CHIP assay with the Crp-c-Myc fusion protein as probe, we were able to detect binding of Crp to the promoter region of the *flhA* gene. Bioinformatic analysis revealed a putative Crp-binding site in this region. Phenotypic Microarrays analysis (Biolog) revealed that both mutants failed to employ most dipeptides as N-source; this could be connected to the lack of expression of some amino acid permeases exposed by DNA microarray assays on the the *crp* mutant. Such transcriptome assays revealed also the enhanced expression of *phoU* in cells lacking Crp. The promoter region of *phoU* does contain a predicted Crp binding site. Other genes involved in phosphate transport were overexpressed in the *crp* mutant as well. Taken together, these data single out a central role of Crp in coordinating a number of cell surface-related functions, quite unlike *E. coli*, in which Crp is mostly involved in over-regulating metabolic transactions.



## **INTRODUCCION**



## 1. *Pseudomonas putida* y regulación fisiológica de genes catabólicos

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos, con uno o más flagelos polares (Palleroni, 1984. ). Nutricionalmente éste tipo de microorganismos son muy versátiles y algunas especies son capaces de usar más de 100 fuentes de carbono y energía diferentes. También son particularmente conocidas por su capacidad de sacar provecho de compuestos tóxicos tales como hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Ramos *et al.*, 2002). Las bacterias del género *Pseudomonas* tienen un considerable potencial para ser utilizadas en aplicaciones biotecnológicas, especialmente en las áreas de bioremediación (Dejonghe *et al.*, 2001), biocatálisis (Schmid *et al.*, 2001), biocontrol en la protección de plantas (Walsh *et al.*, 2001), y en la producción de nuevos bioplásticos (Olivera *et al.*, 2001).

*Pseudomonas putida* KT2440 (Bagdasarian *et al.*, 1981), es el miembro de este género mejor caracterizado, y mantiene su capacidad de supervivencia en el medioambiente. Esta estirpe es un derivado libre del plásmido (pWW0) de la cepa *Pseudomonas arvilla* mt-2, designada así por Motoki Yamanaka en 1960 (Nakazawa, 2002) y luego reclasificada como *Pseudomonas putida* mt-2 (Nakazawa, 2002; Williams and Murray, 1974). *Pseudomonas putida* KT2440 y su derivado rifampicina resistente, *Pseudomonas putida* KT2442 (Franklin *et al.*, 1981), son estirpes de crecimiento rápido, muy versátiles nutricionalmente y de fácil manejo en el laboratorio. El genoma de *Pseudomonas putida* KT2440 está secuenciado ([www.tigr.org/GenBank](http://www.tigr.org/GenBank) Access Number AE015451) (Nelson *et al.*, 2002), lo que suma otra facilidad para convertir a esta bacteria en un modelo excelente de estudios sobre bacterias del suelo.

## Introducción

*Pseudomonas putida* mt-2 ha sido extensamente investigada por su capacidad de utilizar tolueno, *m*-xileno, *p*-xileno, pseudocumeno, y *m*-etiltolueno como fuente de carbono y energía. La información genética para la transformación de estos compuestos en metabolitos, está codificada en un plásmido transmisible llamado TOL pWW0 (Assinder and Williams, 1990). La ruta por la que estos compuestos son mineralizados consta de dos etapas. La primera, consiste en la transformación de tolueno a benzoato, por la oxidación del grupo metilo, y es denominada ruta superior (*upper*). En la segunda etapa, la ruta *meta*, el benzoato es metabolizado hasta convertirse en un intermediario del ciclo de Krebs, a través de la rotura en la posición *meta* del intermediario catecol (Assinder and Williams, 1990).

Dentro de los sistemas que regulan la expresión del plásmido TOL, se encuentra el promotor *Pu*, el cual tiene a su cargo la transcripción de los genes de la vía *upper* y es activado, entre otros elementos, por la proteína XylR, que es capaz de interactuar con los sustratos hidrocarbonados (Duetz *et al.*, 1994). Este promotor se activa mediante la coordinación de XylR en presencia del inductor, la proteína IHF (*integration host factor*) y el factor sigma 54 ( $\sigma^{54}$ ) (Ramos *et al.*, 1997). *In vivo* este promotor es afectado por al menos dos procesos en la regulación fisiológica general de la célula. Uno de estos procesos, denominado *silenciamiento exponencial*, mantiene inactivo al promotor durante el crecimiento exponencial de la bacteria en un medio rico, a pesar de la presencia de moléculas del inductor (Cases *et al.*, 1996; de Lorenzo *et al.*, 1993a; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1990; Marques *et al.*, 1994). Este fenómeno es modulado por la actividad de sigma 54 (Cases *et al.*, 1996) posiblemente a través de un sistema de competición de sigma (Bernardo *et al.*, 2006). La disponibilidad de fuente de carbono también afecta la

regulación del promotor *Pu*. En particular la glucosa o el gluconato pueden inhibir la actividad de *Pu*. Esta inhibición es mediada por el gen *ptsN*, un gen que codifica para una enzima perteneciente al sistema de transporte de azúcares PTS (de *phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system*). Las mutantes nulas en este gen no son sensibles a la inhibición por glucosa (Cases *et al.*, 1999).

## 2. CRP y CyA

El efecto de la glucosa sobre el promotor *Pu* ha sido englobado dentro del fenómeno denominado Represión Catabólica, un efecto ampliamente distribuido en los microorganismos y que sugiere una ventaja adaptativa para los mismos (Ullmann, 1996). La Represión Catabólica en *E. coli* se puede definir como el uso preferencial de una fuente de carbono sobre otra, cuando la bacteria dispone de una mezcla de azúcares en su medio de cultivo (Cases and de Lorenzo, 1998). Uno de los primeros análisis cuantitativos de este fenómeno, fue realizado en *E. coli* por Monod en 1942, en un conjunto de experimentos muy elegantes, en donde hacía crecer a *E. coli* en un cultivo con dos carbohidratos diferentes y, dependiendo de la naturaleza de los mismos las bacterias presentaban dos ciclos de crecimiento separados por una fase *lag*, dando lugar a una curva diáuxica (Monod, 1942). La glucosa también puede prevenir la entrada de inductores o acelerar la salida de estos, mediante el fenómeno conocido como Exclusión del inductor y se relaciona con el sistema PTS (Saier, 1989). Hasta 1965-1970 no se describió al adenosina monofosfato cíclico (cAMP) como un antagonista del efecto de la glucosa (Ullmann and Monod, 1968) y se identificaron los genes *cya*, que codifica para la adenilato ciclasa (CyaA), y *crp* que codifica para proteína receptora de cAMP (Crp) (Zubay *et al.*, 1970). *cyaA* y *crp* eran los verdaderos artífices de este fenómeno, ya que los mutantes en estos

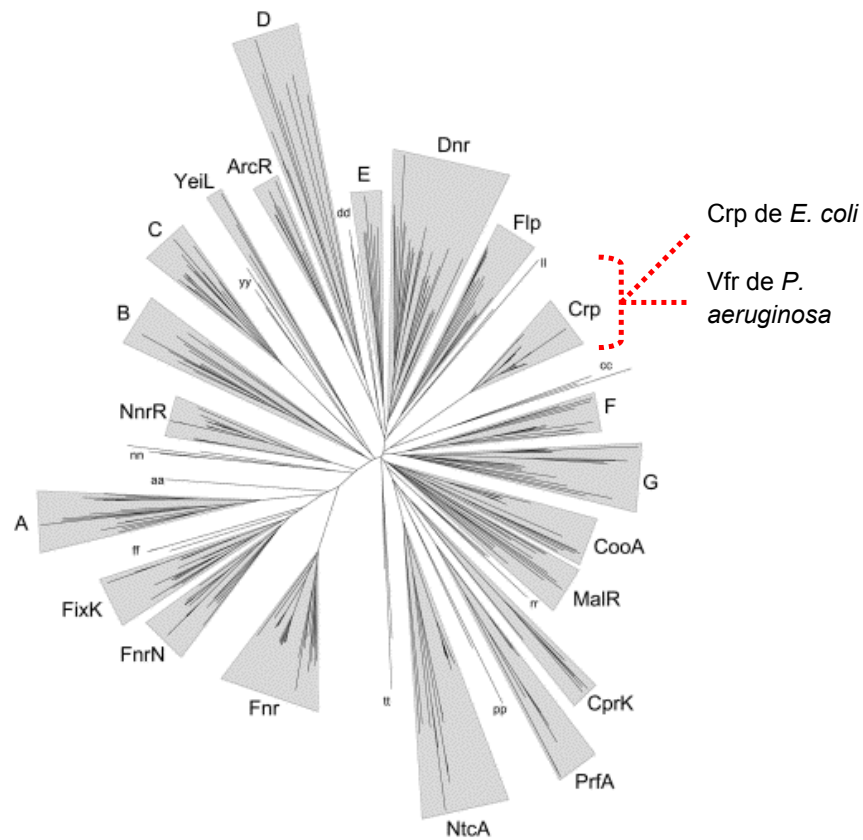
genes podían crecer en glucosa pero no lo hacían en los carbohidratos susceptibles de represión catabólica (Perlman and Pastan, 1969) (Schwartz, 1970). La participación del sistema Crp-CyaA en la represión catabólica en *E. coli* no debe generalizarse a microorganismos fuera del grupo de las enterobacterias (Ullmann, 1996).

### **2.1. Reguladores transcripcionales Crp-Fnr: Crp de *Escherichia coli*, Vfr de *Pseudomonas aeruginosa* y Clp de *Xantomonas campestris***

Los reguladores transcripcionales del tipo Crp-Fnr (Korner *et al.*, 2003) se caracterizan por tener en su extremo C-terminal un motivo hélice-vuelta-hélice, por el cual se unen al surco mayor del ADN en los promotores de sus genes diana, ejerciendo así su acción como activadores o represores (Korner *et al.*, 2003). Además del motivo de unión al ADN, los reguladores Crp-Fnr tienen un voluminoso dominio de unión a nucleótidos (Kolb *et al.*, 1993) que se extiende aproximadamente 170 residuos corriente arriba del N-terminal (Korner *et al.*, 2003).

Se han identificado 369 proteínas incluidas dentro de la superfamilia Crp-Fnr (Korner *et al.*, 2003), utilizando las herramientas bioinformáticas ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1994), PHYLIP 3.5c (Felsenstein, 1989) y TreeView (Page, 1996). Estas se han agrupado según su filogenia, dando como resultado 31 grupos o brazos en el árbol filogenético (Fig. 1). Uno de esos brazos denominado Crp, contiene las proteínas más relacionadas con Crp de *E. coli*. En este grupo se encuentran las proteínas Vfr de *Pseudomonas aeruginosa*, y Clp de *Xantomonas campestris* (Korner *et al.*, 2003) entre otras.





**Figura 1.** Árbol filogenético. Obtenido del resultado del análisis bioinformático con ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1994), PHYLIP 3.5c (Felsenstein, 1989) y TreeView (Page, 1996) de las proteínas tipo Crp-Fnr. El grupo denominado Crp contiene las proteínas más relacionadas con Crp de *E. coli*. En este grupo se encuentran Vfr de *P. aeruginosa* y Clp de *Xantomonas campestris*, entre otras. Modificación de (Korner *et al.*, 2003).

### 2.1.1. Crp en *Escherichia coli*

Crp de *E. coli* está formado por 210 aminoácidos y forma un dímero de 45 kDa (Fig.2). El dominio N-terminal, de 139 aminoácidos, es el responsable de la interacción con el cAMP. El dominio C-terminal es el responsable de la interacción con el ADN (Ebright, 1993). El cAMP actúa como efector

## Introducción

alostérico, y favorece la unión de Crp al ADN (Eilen *et al.*, 1978; Krakow and Pastan, 1973).



**Figura 2.** Esquema de la proteína CRP de *E. coli* en contacto con el ADN. Se puede observar su estructura dimérica y en el centro en color rojo se distingue la zona de unión a cAMP.

El complejo cAMP-Crp regula más de 100 genes en *E. coli* (Kolb *et al.*, 1993). Muchos de estos genes participan en la utilización de fuentes de carbono, y su expresión está sujeta a represión catabólica por glucosa (Botsford and Harman, 1992). Pero se sabe que su espectro de acción es mucho más amplio ya que participa en el metabolismo de azúcares o aminoácidos, procesos de transporte, etc. (Busby, 1996) (Korner *et al.*, 2003). El complejo cAMP-Crp se une a la secuencia consenso de 22 pb definida por los siguientes nucleótidos: 5'-AAAT**GTGATCTAGATCAC**ATTT-3', en negrita se destacan los nucleótidos más conservados, esta secuencia se puede encontrar dentro o cerca del promotor diana (Busby, 1996).

En los promotores dependientes de Crp, éste activa típicamente la transcripción por interacción directa proteína-proteína con la ARN polimerasa (ARNP). Los promotores dependientes de Crp se dividen en tres clases: Clase I, Clase II y Clase III (Busby and Ebright, 1999). Los promotores dependientes de Crp Clase I, tienen la secuencia de reconocimiento de Crp ubicada corriente arriba del sitio de unión de la ARNP. Crp interacciona con la ARNP a través de su región AR1 (residuos 158-160), contactando con el dominio C-terminal de la subunidad  $\alpha$  de la ARNP y de esta manera activa la transcripción, el ejemplo más característico de estos promotores es el *lacP1* y el promotor artificial CC en donde el sitio de unión se encuentra -61.5 (Busby and Ebright, 1999). Los promotores Clase II, como por ejemplo *galP1* y *meR*, tienen el sitio de unión de Crp ubicado de manera tal que solapa con el hexámero de unión de la ARNP en la posición -35; en este caso Crp contacta en múltiples puntos con la ARNP, además de AR1, también interacciona la región AR2 (residuo 19, 21 y 101) de Crp con el dominio N-terminal de la subunidad  $\alpha$  de la ARNP. Y la región AR3 de Crp (residuos 52-58) interacciona con el sigma 70 de la ARNP (Busby and Ebright, 1999). Los promotores Clase III tienen varias secuencias de unión de Crp ubicadas en tándem. En estos casos, Crp combina los dos mecanismos de acción utilizados en los promotores de Clase I y Clase II (Busby and Ebright, 1999).

### **2.1.2. Vfr de *Pseudomonas aeruginosa***

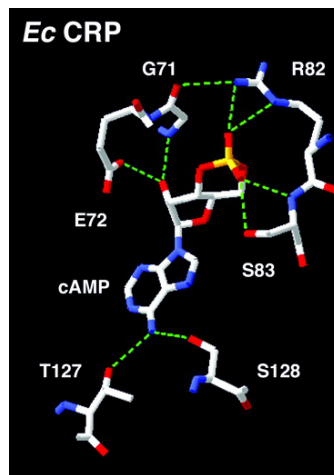
Vfr (*Virulence factor regulator*) es un regulador global de la expresión de genes en *Pseudomonas aeruginosa* pertenece a la familia Crp-Fnr. La designación proviene de que es factor de expresión de algunos genes de virulencia como *toxA* (gen estructural de la exotoxina A), *regA* (gen que codifica el regulador de *toxA*) y *prpL* (encargado de la producción de

## Introducción

proteasa IV) (West *et al.*, 1994). Vfr es requerido en *P. aeruginosa* para la expresión de *lasR*, un activador transcripcional, cuya regulación depende de la densidad celular, (*quorum sensing*). Además, Vfr activa la transcripción de otro regulador de *quorum sensing*, *rhIR* (Albus *et al.*, 1997). Un estudio reciente indica que Vfr regula negativamente las PQS (de *Pseudomonas quinolone signal*) en el sistema de *quorum sensing* (Whitchurch *et al.*, 2005). Otros estudios han involucrado a Vfr en la regulación del movimiento de translocación bacteriano crispado (*twitching*, ver más adelante), mediado por los *Pili* tipo IV. Vfr también está implicado en la expresión del sistema de secreción tipo III, la biogénesis flagelar y la producción en fase estacionaria del factor sigma RpoS (Beatson *et al.*, 2002), (Wolfgang *et al.*, 2003), (Dasgupta *et al.*, 2002), (Bertani *et al.*, 2003). Análisis comparativos de transcriptómica y proteómica entre *P. aeruginosa* silvestre y *P. aeruginosa vfr* mutante demuestran que Vfr afecta la expresión de más de 100 genes y la producción de más de 60 proteínas (Suh *et al.*, 2002), (Wolfgang *et al.*, 2003). Recientemente, en modelos de ratón, se ha demostrado que Vfr es necesario para la colonización y diseminación de *P. aeruginosa* en pulmón, en procesos de pulmonía aguda (Smith *et al.*, 2004).

Vfr es 67% idéntico y 91% similar a Crp de *E. coli* (West *et al.*, 1994). La comparación de secuencias entre Vfr de *P. aeruginosa* y Crp de *E. coli* indican que comparten 6 residuos en el dominio de unión a cAMP (Weber and Steitz, 1987). Crp no es activado por cGMP, pero una sustitución de serina por treonina en la posición 128 permite la activación de Crp por ambos, cAMP y cGMP (Lee *et al.*, 1994) (Fig.3). Vfr contiene esta sustitución, lo cual sugiere que Vfr podría ser activado por cAMP y cGMP (West *et al.*, 1994). Esta similitud estructural podría indicar que Crp puede ser sustituido por Vfr; y algunos experimentos confirman esta hipótesis: en un mutante *E. coli crp*, Vfr restaura la actividad  $\beta$ -galactosidasa y

tritifanasa (West *et al.*, 1994). Además, en el doble mutante *E. coli crp cya*, en donde no se produce cAMP, la actividad  $\beta$ -galactosidasa fue recuperada agregando de forma exógena cAMP (West *et al.*, 1994). Sin embargo el gen *crp* de *E. coli* no es capaz de complementar la producción de exotoxina A y proteasa IV en la *Pseudomonas aeruginosa vfr* mutante (West *et al.*, 1994). Experimentos muy recientes de ensayos *in vitro* han demostrado que la proteína Crp de *E. coli* puede unirse al promotor del gen *lasR*, pero no retarda la movilidad electroforética de los promotores de los genes *toxA* y *regAP1*. Es decir, Crp y Vfr pueden unirse *in vitro* al promotor *lac* de *E. coli* y al promotor del gen *lasR* de *P. aeruginosa*, sin embargo solamente Vfr puede unirse a los promotores de los genes *toxA* y *regAP1* de *P. aeruginosa* (Kanack *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Detalle de la región de la proteína Crp de *E. coli* que contacta con el cAMP. El cambio en la posición S128 por treonina permite que se active también por cGMP. Beatson *et al.*, *J.Bacteriology* (2002), 184:3605-3613.

El cAMP en *P. aeruginosa*, parece responder a señales ambientales como la concentración de calcio y contacto con la célula hospedadora (Wolfgang *et al.*, 2003). Se ha relacionado la señal producida por el cAMP con la expresión del sistema de secreción tipo III (Smith *et al.*, 2004). El sistema de secreción tipo III es utilizado para inyectar proteínas tóxicas en la célula eucariota hospedadora en la infección producida por *P.*

*aeruginosa*, y se ha observado una gran disminución en expresión de este sistema cuando se disminuye la producción de cAMP (Smith *et al.*, 2004). El cAMP en *Pseudomonas aeruginosa* es generado en su gran mayoría por la proteína CyaB, una adenilato ciclasa asociada a membrana, que se encuentra dentro de las adenilatos ciclasas de Clase III (Danchin, 1993). Pero también posee otra adenilato ciclasa CyaA, citoplásmica agrupada según su filogenia dentro de la Clase I (Danchin, 1993). Aunque la mayor cantidad de cAMP es producido por CyaB, las dos ciclasas responden a la limitación de calcio y tienen un papel en la producción total de cAMP (Wolfgang *et al.*, 2003). El cAMP como segundo mensajero y efector de Vfr en *P. aeruginosa* parece estar respondiendo a distintas señales ambientales que en *E. coli* (Suh *et al.*, 2002).

### **2.1.3. Clp de *Xantomonas campestris***

En *Xantomonas campestris* existe una proteína similar a Crp, llamada Clp (*cyclic AMP-receptor protein-like*). El porcentaje de identidad es de 47%, y es capaz de restaurar el catabolismo de varios carbohidratos en una cepa *E. coli cya crp* (de Crecy-Lagard *et al.*, 1990). Clp participa en la regulación de la fitopatogenicidad de la bacteria, ya que en la mutante *clp* se pierde la virulencia, atenuación vinculada a alteraciones en la producción de pigmentos y enzimas extracelulares (de Crecy-Lagard *et al.*, 1990). En el genoma de *Xantomonas campestris* no se ha encontrado un homólogo del gen *cya*. Y tampoco se han medido niveles significativos de este nucleótido en las células (de Crecy-Lagard *et al.*, 1990), (da Silva *et al.*, 2002). Indicando que Clp actúa regulando la expresión de genes, sin la participación del cAMP (Lee *et al.*, 2003).

### 3. Motilidad bacteriana y factores tipo Crp-Fnr

La motilidad representa una importante ventaja para las bacterias, ya que gracias a ella, pueden dirigirse hacia una condición favorable o alejarse de una condición desfavorable o tóxica en el medioambiente. Las bacterias flageladas y móviles son mejores competidores frente a otros microorganismos (Fenchel, 2002). Además, la motilidad y el flagelo tienen un papel importante en la adhesión, la formación de biofilms y la colonización de bacterias patógenas tales como *Pseudomonas aeruginosa* (Stanley, 1983), *Salmonella enterica* (Ciacci-Woolwine *et al.*, 1998), *Escherichia coli* (Pratt and Kolter, 1998), *Helicobacter pylori* (Eaton *et al.*, 1996), *Vibrio cholerae* (Eaton *et al.*, 1996) y *Aeromonas hydrophila* (Merino *et al.*, 1997; Rabaan *et al.*, 2001).

Los movimientos de translocación de los microorganismos durante su crecimiento en medio sólido, se clasificaron en seis tipos, los cuales son fácilmente distinguibles por observación directa al microscopio (Henrichsen, 1972):

**Movimiento de enjambre (*swarming*):** es un tipo de movimiento de translocación en superficie que se produce a través de la acción del flagelo. La micromorfología es organizada, el movimiento es continuo y regular, siguiendo un eje, al cual las células se van agregando durante el movimiento.

**Movimiento de nado (*swimming*):** es un tipo de movimiento de translocación en superficie que se produce a través de la acción del flagelo, pero de manera distinta que en *swarming*, ya que solamente se hace efectivo este tipo de movimiento cuando el medio en el que las

## Introducción

bacterias están creciendo es suficientemente fluido. La micromorfología es desorganizada; las células se mueven de manera errante e individual.

**Movimiento de deslizado (*gliding*):** es un tipo de movimiento de translocación en superficie que se produce en bacterias no flageladas. La micromorfología es altamente organizada, el movimiento es continuo y regular a lo largo de un eje, al que las bacterias se agregan durante el movimiento.

**Movimiento crispado (*twitching*):** es un tipo de movimiento de translocación en superficie que ocurre en bacterias tanto flageladas como no flageladas, por lo tanto no es debido a una acción del flagelo. La micromorfología varía, no es tan organizada como el *swarming* y *gliding*, las células se mueven en forma solitaria predominantemente, pero, ocurre un pequeño movimiento de agregación. El movimiento es intermitente y desigual.

**Movimiento resbaladizo (*sliding*):** es un tipo de movimiento de translocación en superficie que se produce por una reducción de la fricción entre las células y el medio durante el crecimiento de las mismas. La micromorfología es uniforme, las células se mueven formando una capa.

**Movimiento de lanza (*darting*):** es un tipo de movimiento de translocación en superficie que se produce por la acción de fuerzas expansivas producidas en el interior de un agregado bacteriano, las células se van agregando de tal manera, que en un momento las células ubicadas en el centro son eyectadas. La micromorfología es completamente aleatoria tanto de los agregados como de las células



libres, observándose en el agar zonas libres entre los agregados. Las células solo se mueven cuando se encuentran en agregados

#### **4. Flagelo, la estructura procariótica por excelencia en movilidad**

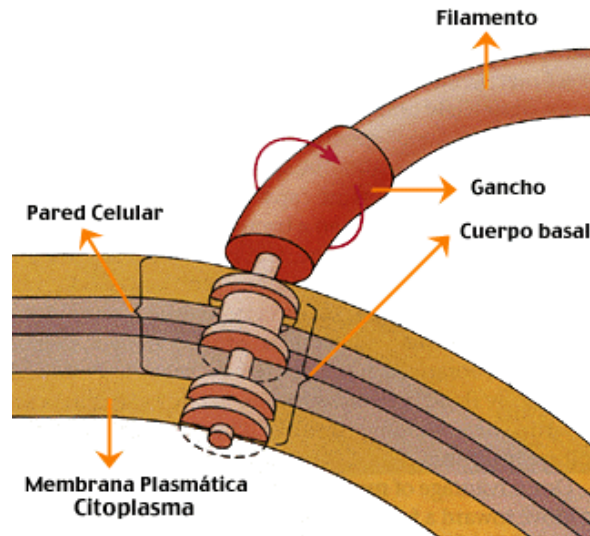
##### **4.1. Estructura del flagelo**

Sin duda, el flagelo es la estructura procariótica involucrada en movilidad mejor estudiada (Aldridge and Hughes, 2001) (Macnab, 1999), consta de 20 especies de proteínas diferentes, y se requieren otras 30 aproximadamente para su regulación y su ensamblaje; es una de las organelas procarióticas más complejas (Bardy *et al.*, 2003).

El flagelo consta de tres partes, el *filamento*, el *gancho* y el *cuerpo basal* o *motor* (Fig. 4). El *filamento*, en la gran mayoría de las bacterias, consiste en cientos de copias de una proteína, la flagelina. Es menos común que el filamento este compuesto por más de un tipo de flagelina. Conectando el filamento con el motor se encuentra la región denominada *gancho* que consta de un único tipo de proteína. La tercera parte del flagelo, el *motor*, se encuentra anclado en la membrana citoplasmática y en la pared celular, y está constituido por un eje central que atraviesa un sistema de anillos. En bacterias Gram negativas, existe un anillo externo que está anclado a la capa de lipopolisacáridos, otro en la capa de peptidoglicano de la pared celular y un anillo interno situado en la membrana citoplasmática. Alrededor del anillo interno y anclado también a la membrana se encuentran las proteínas Mot, que son las que controlan realmente el motor flagelar provocando la rotación del filamento. Finalmente las proteínas FliG, FliM y FliN funcionan como un conmutador del motor invirtiendo la rotación del flagelo para que las bacterias naden hacia una molécula atrayente o se alejen de una sustancia repelente (Bardy *et al.*, 2003). Los cambios en el medioambiente son detectados por

## Introducción

el complejo sistema de quimiotaxis y se traducen en la unión directa de la proteína CheY fosforilada y la proteína FliM (Bourret *et al.*, 2002).



**Figura 4.** Esquema simplificado de la estructura del flagelo. (Figura obtenida desde [www.puc.cl/sw\\_educ/biologia/bio100/html/portadaMIval2.3.1.html](http://www.puc.cl/sw_educ/biologia/bio100/html/portadaMIval2.3.1.html)).

Un complejo sistema de secreción y transporte de proteínas está localizado dentro del anillo ubicado en la membrana citoplásmica (Macnab, 1999). Hasta el momento se conocen 6 componentes de membrana: FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR; las cuales están localizadas dentro de los confines del anillo citoplasmático. Se han identificado también otras proteínas pertenecientes al sistema que son solubles y se denominan FliJ, FliI y FliH (Bardy *et al.*, 2003).

### 4.2. Biosíntesis del flagelo

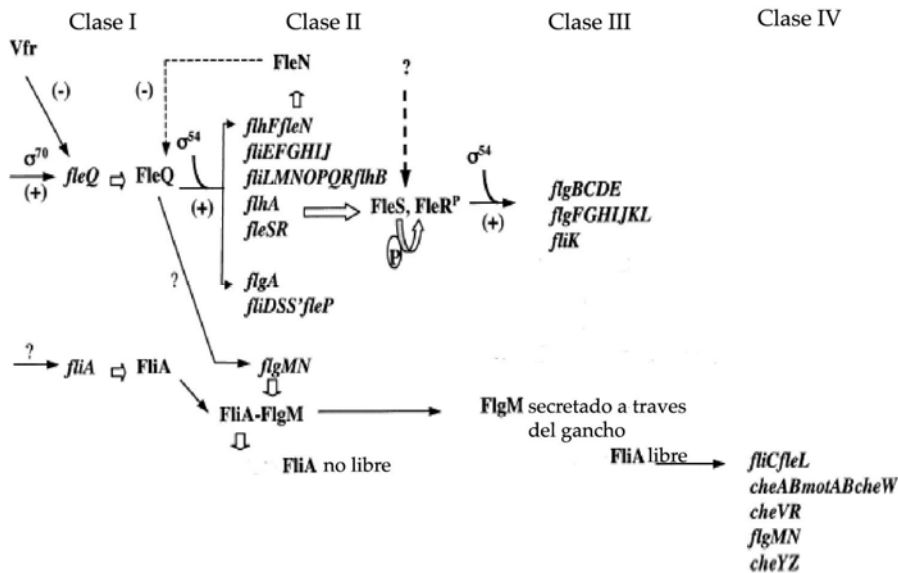
Para la expresión de todos los genes flagelares se requiere mucha energía. Por esto, las bacterias presentan un sistema que les permite maximizar la eficiencia en la biogénesis flagelar, expresando los genes de manera jerárquica. *E. coli* posee flagelos distribuidos por varios lugares de

la superficie celular (flagelación peritrica). En esta bacteria aproximadamente 50 genes están involucrados en la síntesis de flagelo, movilidad y quimiotaxis. La expresión de estos genes se realiza en forma secuencial (Chilcott and Hughes, 2000). Los genes flagelares se dividen en tres clases: en la Clase I se encuentra el operón *flhDC* que está ubicado primero en la jerarquía y es absolutamente imprescindible para la expresión de todos los otros genes flagelares (Helmann and Chamberlin, 1987). El promotor de este operón es transcrito por  $\sigma^{70}$  (Kutsukake, 1997) y regulado por Crp (Soutourina *et al.*, 1999). Los genes activados por FlhCD están comprendidos dentro de la Clase II, la cual incluye varios genes estructurales y el factor sigma alternativo FliA ( $\sigma^{28}$ ). Los genes Clase III necesitan FliA para su transcripción y son dependientes de la secreción de FlgM (anti sigma). La interacción FliA-FlgM regula la biogénesis a través de un mecanismo protranscripcional (Macnab, 1996).

En *Pseudomonas aeruginosa* los genes flagelares se disponen en tres grupos ubicados no contiguos en el cromosoma. La expresión de estos genes también ocurre de manera ordenada y jerárquica. En esta bacteria, los genes flagelares se ha dividido en 4 Clases, los genes Clase I son expresados constitutivamente, y requieren la acción del regulador transcripcional FleQ y el factor sigma alternativo *fliA* ( $\sigma^{28}$ ). Los genes Clase II requieren a FleQ y RpoN ( $\sigma^{54}$ ) para su activación y son *fleSR*, *fliEFGHIJ*, *flhA*, *flhF-fleN*, *flgA* y *fliLMNOPQRflhB*. Estos genes Clase II codifican para componentes estructurales del motor, del sistema de transporte, del sistema que regula el movimiento flagelar y del filamento. También se encuentran entre los genes Clase II reguladores como FlhF, FleN, FleS y FleR. Los genes agrupados bajo la clasificación Clase III, requieren para su activación FleR y  $\sigma^{54}$ , y son *flgBCDE*, *flgFGHIJKL* y *fliK*; estos genes codifican proteínas del cuerpo basal, del gancho. Los genes

## Introducción

Clase IV dependen de la disponibilidad de FliA y son *fliC*, *fleL*, *cheAB*, *motAB*, *cheVR*, *flgMN*, *cheYZ* (Dasgupta *et al.*, 2003) (Fig. 5).



**Figura 5.** Jerarquía y clasificación de los genes involucrados en la biosíntesis flagelar en *P. aeruginosa*. Se clasifican en cuatro Clases: Clase I, Clase II, Clase III y Clase IV según la jerarquía en la expresión para sintetizar el flagelo bacteriano. (Modificación de Dasgupta *et al.*, 2003).

## 5. Crp, Vfr, Clp y motilidad.

Una relación entre Vfr y movilidad se ha establecido a través del gen *fleQ* (Dasgupta *et al.*, 2002), este gen es un regulador de la biosíntesis flagelar, en *P. aeruginosa*. Mutantes en este gen presentan una pérdida de la movilidad debido a su incapacidad para sintetizar flagelina, proteína codificada por el gen *fliC* (Arora *et al.*, 1997). Se ha demostrado la unión directa *in vitro* entre Vfr y la región -10 del promotor de *fleQ* (Dasgupta *et al.*, 2002).

En *E. coli*, Adler y Templeton (1967), relacionaron la producción de flagelo y la movilidad con la represión catabólica por glucosa. La producción de

flagelo era reprimida cuando las bacterias crecían con glucosa, pero sin embargo, tenían un desarrollo flagelar normal cuando crecían con succinato o glicerol (Adler and Templeton, 1967). Esto relacionaba directamente cAMP-Crp con la movilidad. Posteriormente se identificó una posible secuencia de unión de Crp en la región promotora de operón *flhDC* (Bartlett *et al.*, 1988).

En *Xantomonas campestris*, se realizaron estudios de proteómica comparativa entre una cepa silvestre y otra mutante *clp*, y se observó que en ausencia de este gen se reducía la cantidad de proteína FliC, (flagelina componente del flagelo). Ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa del promotor del gen *fliC* en la cepa *Xantomona campestris clp*, dieron como resultado que la expresión del gen indicador bajaba 2.3 veces cuando estaba ausente el gen *clp*. En la cepa mutante *X. campestris fliC* se observa un total pérdida del flagelo y de la movilidad, sin embargo no se ve afectada la virulencia (Lee *et al.*, 2003).

## 6. Motilidad y pared celular

Estudios recientes están revelando una relación entre la integridad de la membrana y la motilidad (Abeyrathne *et al.*, 2005). En *Pseudomonas aeruginosa*, el lipopolisacárido (LPS) tiene un papel esencial en la estructura de la membrana externa de la pared celular. El LPS consta de tres partes: una región hidrofóbica que es llamada lípido A seguido de un centro (*core*) de oligosacáridos y el así llamado antígeno O. El ensamblaje del LPS requiere un número específico de proteínas (Whitfield, 1995). La proteína WaaL (antígeno O ligasa), es responsable en Enterobacterias de unir el oligosacárido al lípido A (Whitfield *et al.*, 1997). En *P. aeruginosa* se ha identificado también el gen *waaL*. Y se ha demostrado que codifica

## Introducción

una proteína con capacidad de ligar oligosacárido al lípido A. Pero también se ha observado que en la cepa mutante *P. aeruginosa waaL* se reduce drásticamente la producción de flagelo y pili, con la consiguiente reducción en la movilidad *swimming* y *twitching* (Abeyrathne *et al.*, 2005). En *Salmonella Typhimurium*, las mutaciones que afectan la biosíntesis del LPS dan como resultado alteraciones en la motilidad *swarming* (Toguchi *et al.*, 2000). Una posible explicación a esto la da Kim y sus colaboradores argumentando que los LPS y otros componentes extracelulares pueden modificar la fricción de las células con el medio y de esta manera alterar su migración (Kim *et al.*, 2003).

En un trabajo realizado en *Salmonella*, también se ha relacionado una alteración en la pared celular y la motilidad. Una mutación en el gen *pmrK* de éste microorganismo produce la pérdida total de la motilidad (Kim *et al.*, 2003). El gen *pmrK* pertenece al operón *pmrHIJKLM*, cuyos productos están encargados de transferir L-4-aminoarabinosa a un residuo en el lípido A del lipopolisacárido (Gunn *et al.*, 2000; Trent *et al.*, 2001; Wosten and Groisman, 1999). La modificación realizada al LPS por el agregado de L-4-aminoarabinosa aporta una carga positiva extra al LPS, reduciendo la probabilidad de unión de antimicrobianos catiónicos como polimixinas y azurocidinas. La mutación en el gen *pmrK* de *Salmonella thyphimurium*, dio lugar a la pérdida de la movilidad y además se observó que estas células eran más sensibles a polimixina (Kim *et al.*, 2003).

Dentro del grupo de las polimixinas se encuentra el antibiótico colistina, que es un decapeptido catiónico unido a una cadena de ácido graso (Katz and Demain, 1977). Se ha observado resistencia a colistina en la subpoblación móvil de los biofilms experimental de *P. aeruginosa* (Haagensen *et al.*, 2007). En efecto, se ha documentado en la literatura que los biofilms formados por *P. aeruginosa* están compuestos por dos

subpoblaciones distinguibles fácilmente: una subpoblación formada por células que constituyen el tronco o base de la estructura multicelular y otra subpoblación que forma la copa de esta estructura (Lazdunski *et al.*, 2004). Existen diferencias fenotípicas entre estas dos poblaciones (Lequette and Greenberg, 2005). Los estudios realizados por Haagensen y sus colaboradores aportan una interesante relación entre motilidad y la resistencia a colistina y SDS, en la estructura que se forma en el biofilm. Estos dos agentes tienen como diana la membrana celular, (Haagensen *et al.*, 2007).

Existen estudios que indican que para la formación de biofilm se requiere un correcto desarrollo del flagelo (Pratt and Kolter, 1998). En particular se ha identificado en *P. putida* un gen denominado *morA*, el cual está asociado a la membrana y es un regulador negativo de la biosíntesis flagelar y la ausencia de dicho gen reduce la formación de biofilm. En efecto en la *P. putida morA* mutante la expresión del flagelo es constitutiva. También se observa un incremento de tres veces en la movilidad *swimming* en la mutante *morA* con respecto a la cepa silvestre (Choy *et al.*, 2004). Ensayos de quimiotaxis muestran que la mutante *morA* exhibe una respuesta más rápida que la cepa silvestre. La complementación con la proteína MorA expresada desde un plásmido inducible restaura el fenotipo silvestre tanto en motilidad como en quimiotaxis (Choy *et al.*, 2004).





## **OBJETIVOS**



### **Objetivo general**

Estudiar las funciones del sistema cAMP-Crp en *Pseudomonas putida*.

### **Objetivos específicos**

1. Identificar los genes *crp* y *cyaA* en *P. putida*.
2. Construir cepas mutantes *P. putida crp* y *P. putida cyaA* y analizar sus fenotipos globales.
3. Establecer semejanzas/diferencias de este sistema en el equivalente en *E. coli*.
4. Caracterización de fenotipos singulares en mutantes *P. putida crp* y *P. putida cyaA*.
5. Establecer los mecanismos de regulación de Crp sobre los genes sometidos a su control.



## **MATERIALES Y METODOS**



## 1. Cepas y Plásmidos

En las tablas 1 y 2 se detallan las estirpes bacterianas usadas en este trabajo, así como sus características genotípicas.

Tabla 1: Estirpes de *Escherichia coli*

Estirpe	Genotipo	Referencia
CC118 $\lambda$ pir	$\Delta(ara-leu)$ , <i>araD</i> , $\Delta lacX174$ , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA</i> , <i>thi1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA1</i> . Llisogenizada con $\lambda$ pir.	(de Lorenzo and Timmis, 1994)
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> , $\Delta lacU169$ , ( $\phi 80 lacZDM15$ ), <i>hsdR17</i> , ( <i>rk-mk+</i> ), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA</i> .	(Hanahan and Meselson, 1983)
HB101	<i>Sm<sup>r</sup></i> , <i>hsdR<sup>-</sup>M<sup>+</sup></i> , <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>recA</i> .	(Sambrook J, 1989)
BW25113	<i>K-12</i> , <i>laqIv</i> , <i>rrnBT14</i> , $\Delta lacZWJ16$ , <i>hsdR514</i> , $\Delta araBADAH33$ , $\Delta rhaBADLD78$ .	(Datsenko and Wanner, 2000)
JWK5702-4	BW25113, $\Delta crp::km$ .	(Mori <i>et al.</i> , 2000)
JWK3778-4	BW25113, $\Delta cya::km$ .	(Mori <i>et al.</i> , 2000)
MC4100	<i>araD139</i> , $\Delta U169$ ( <i>argF-lac</i> ), <i>rpsL150</i> , <i>relA1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>ptsF25</i> , <i>deoC1</i> .	(Casadoban, 1976)
SBS688	MC4100 $\Delta crp$	(Prieto, 1997)

## Materiales y Métodos

Tabla 2: Estirpes de *Pseudomonas putida*.

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>P. putida</i> silvestre	Tel <sup>r</sup> , KT2442 con una inserción cromosómica del mini- <i>Tn5</i> [ <i>xylR</i> , <i>Pu-lacZ</i> ].	(Fernandez <i>et al.</i> , 1995)
<i>P. putida</i> <i>crp</i>	<i>P. putida</i> silvestre, <i>crp::xylE</i> .	Este trabajo
<i>P. putida</i> <i>cyaA</i>	<i>P. putida</i> silvestre, $\Delta$ <i>cyaA::km</i> .	Este trabajo
<i>P. putida</i> <i>crp cyaA</i>	<i>P. putida</i> silvestre, $\Delta$ <i>cyaA::km crp::xylE</i> .	Este trabajo

Los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3: Plásmidos

Nombre	Descripción	Referencia
pUC18Not	Ap <sup>r</sup> , OriV ColE1.	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
pKNG101	Sm <sup>r</sup> , Sac <sup>s</sup> , OriV R6K.	(Kaniga <i>et al.</i> , 1991)
pUCKm	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , OriV ColE1.	(Cases, 1998)
pVLT31	Tc <sup>r</sup> , OriV RSF1010.	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993b)
pCK101	Cm <sup>r</sup> , OriV PSC101	Panke, S (Diplomarbeit)
pMZC2	Ap <sup>r</sup> . pUC18NotI con inserción en los sitios <i>EcoRI/HindIII</i> del fragmento del gen <i>cyaA</i> de <i>P. putida</i> amplificado por PCR (oligos <i>cyaa1</i> y <i>cyaa2.2</i> ) desde el cromosoma.	Este trabajo



pMZC3	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , $\Delta cyaA::Km$ . Deleción de 1080 pb (fragmento <i>KpnI/SalI</i> ) del gen <i>cyaA</i> en pMZC2 e inserción del gen de resistencia a Km proveniente del pUCKm.	Este trabajo
pMZC4	Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , $\Delta cyaA::Km$ . pKNG101, con inserción en el sitio <i>NotI</i> de fragmento digerido con la misma enzima proveniente de pMZC3.	Este trabajo
pMZC5	Tc <sup>r</sup> . pVLT31 con inserción en sitio <i>EcoRI/HindIII</i> del gen <i>cyaA</i> entero y sin promotor de <i>P. putida</i> proveniente del plásmido pMZC6 digerido con las mismas enzimas.	Este trabajo
pMZC6	Ap <sup>r</sup> . pUC18Not con inserción en sitios <i>EcoRI/HindIII</i> del gen <i>cyaA</i> de <i>P. putida</i> amplificado por PCR (oligos CC1 y CC2) desde el cromosoma.	Este trabajo
pMZV1	Ap <sup>r</sup> . pGEMT (Promega), con inserción de 1274 pb que codifica el gen <i>crp</i> de <i>P. putida</i> amplificado por PCR (oligos VFR1 y VFR2) desde el cromosoma.	Este trabajo
pMZV2	Ap <sup>r</sup> . pUC18NotI con inserción en el sitio <i>EcoRI/HindIII</i> de fragmento de 1274 pb proveniente de pMZV1.	Este trabajo
pMZV3	Ap <sup>r</sup> . <i>crp::xylE</i> . pMZV2 con inserción del gen <i>xylE</i> 933pb, en el sitio <i>NruI</i> de la región codificante del gen <i>crp</i> .	Este trabajo
pMZV4	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> . <i>crp::xylE</i> . pKNG101, con inserción en el sitio <i>NotI</i> del fragmento digerido con la misma enzima desde pMZV3.	Este trabajo
pMZV5	Tc <sup>r</sup> . pVLT31 con inserción en sitios <i>EcoRI/HindIII</i> del fragmento de 1274 pb que codifica para el gen <i>crp</i> de <i>P. putida</i> , digerido con las mismas enzimas desde pMZV2.	Este trabajo

## Materiales y Métodos

pMZV6	Ap <sup>r</sup> . pUC18NotI con inserción en los sitios <i>EcoRI/HindIII</i> del fragmento amplificado por PCR (oligos vfrMyc1 y vfrMyc2) correspondiente a la región codificante, del gen <i>crp</i> de <i>P. putida</i> . El oligo vfrMyc2 introduce en el C-terminal del producto del gen un epítipo Myc.	Este trabajo
pMZV7	Tc <sup>r</sup> . pVLT31 con inserción en los sitios <i>EcoRI/HindIII</i> del fragmento digerido con las mismas enzimas desde pMZV6.	Este trabajo
pREPO	Ap <sup>r</sup> . pUC18NotI con inserción <i>EcoRI/BamHI</i> del fragmento amplificado por PCR (oligos REPO.R y REPO.F) desde el cromosoma de <i>P. putida</i> .	Este trabajo
pCA24N	Cm <sup>r</sup>	(Mori <i>et al.</i> , 2000)
pCA24N <i>cyaA</i>	Cm <sup>r</sup> . Lleva el gen <i>cyaA</i> de <i>E. coli</i> .	(Mori <i>et al.</i> , 2000)
pCA24N <i>crp</i>	Cm <sup>r</sup> . Lleva el gen <i>crp</i> de <i>E. coli</i> .	(Mori <i>et al.</i> , 2000)
pRK600	Cm <sup>r</sup> .	(Kessler <i>et al.</i> , 1992)
pXYLE10	Km <sup>r</sup> . <i>xylE</i> <sup>+</sup>	(Stein, 1992)

## 2. Construcción de las cepas *P. putida crp*, *P. putida cyaA* y la doble mutante *P. putida crp cyaA*

Para llevar a cabo la construcción de las cepas de *P. putida* nulas en *crp* y *cyaA* se utilizaron derivados del plásmido pKNG101, pMZV4 y pMZC4 respectivamente. Luego, estos plásmidos se movilizaron hacia la cepa receptora, por el método de conjugación homóloga y se llevo a cabo el intercambio de la secuencia del gen normal por la modificada.

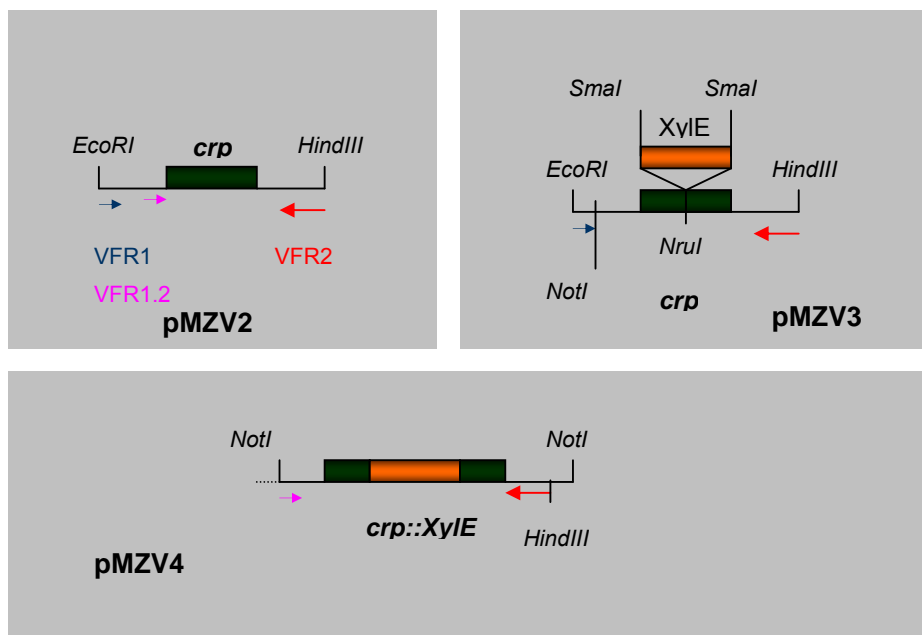
### 2.1. Construcción de *P. putida crp*

Para la construcción del mutante cromosómico en Crp se mutó el gen *crp* (PP\_0424) por inactivación insertando el cassette *XylE* (Stein, 1992). Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó la conjugación homóloga tripartita. La cepa receptora fue *P. putida* silvestre, la cepa donadora fue *E. coli* CC118 $\lambda$ *pir* portando el plásmido pMZV4, y se utilizó la cepa *E. coli* HB101 llevando el plásmido pRK600 como ayudante o *helper*. La explicación detallada de la construcción de esta mutante se puede consultar en Resultados. En la Fig. 6 se explica la construcción del plásmido pMZV4 portador del gen *crp::xylE* que se utiliza en la conjugación.

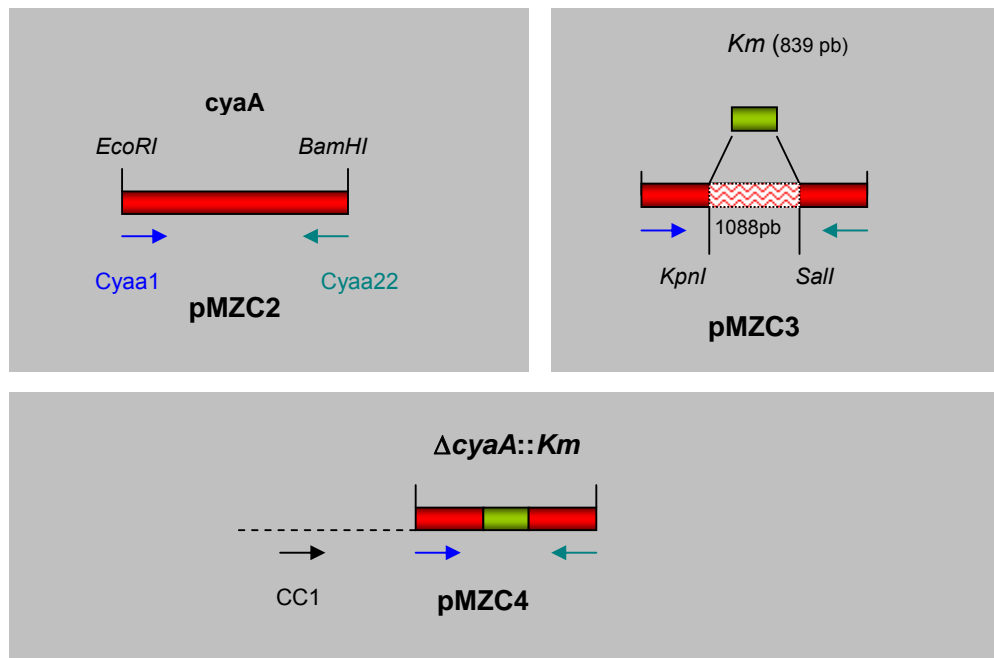
### 2.2. Construcción de *P. putida cyaA*

La construcción de la mutante *cyaA* (PP\_5222) en *P. putida* se realizó delecionando un fragmento del gen *cyaA* e insertando el gen que codifica para la resistencia a Km (Cases, 1998). Para llevar a cabo este procedimiento se utiliza la conjugación homóloga tripartita, al igual que en el caso anterior, utilizando como cepa receptora *P. putida* silvestre, como donadora la cepa de *E. coli* cc118 $\lambda$ *pir* con el plásmido pMZC4, y como ayudante o *helper*, *E. coli* HB101 llevando el plásmido pRK600. En la Fig. 7 se detalla la construcción del plásmido pMZC4 portando  $\Delta$ *cyaA::km*.

## Materiales y Métodos



**Figura 6.** Esquema de la secuencia de construcción del plásmido pMZV4. **Paso 1:** amplificación desde el cromosoma de *P. putida* con oligos VFR1 y VFR2 (Tabla 4) de un fragmento de 1279 pb con el gen completo *crp*, y teniendo en cuenta que a ambos lados de donde se hará la inserción del gen *xylE* queden aproximadamente 600 pb para que se lleve a cabo la recombinación homóloga en la conjugación. Este fragmento fue ligado a un vector pGEMT. Al plásmido resultante se lo denominó pMZV1. **Paso 2:** Digestión con *EcoRI/HindIII* de pMZV1 y aislamiento del fragmento que luego fue ligado al plásmido pUC18NotI digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante es pMZV2. **Paso 3:** Digestión de pMZV3 con *NruI* (corta justo en el centro del gen *crp*) e inserción en ese sitio del gen *xylE*, extraído de pXYLE 10 *SmaI/SmaI*. El plásmido resultante fue nombrado pMZV3. **Paso 4:** digestión de pMZV3 con *NotI* y ligación al plásmido pKNG101 digerido con la misma enzima. El plásmido obtenido se denominó pMZV4. Las flechas de colores indican el lugar de hibridación de los oligos utilizados.



**Figura 7.** Esquema de la secuencia de construcción de pMZC4. **Paso 1:** amplificación desde el cromosoma de 2240 pb correspondientes al gen *cyaA* de *P. putida*, entre los oligos *cyaA1* y *cyaA2* (Tabla 4). Este fragmento se clonó en el plásmido pUC18NotI en los sitios *EcoRI/HindIII*, para dar lugar al plásmido pMZC2. **Paso 2:** El plásmido pMZC2 se digirió con *KpnI/SalI*. El fragmento resultante corresponde a la región central del gen *cyaA* de 1088 pb, que se eliminó, tras la digestión. En los sitios de corte remanentes en el plásmido se insertó el gen de resistencia a km desde pUckm (Cases, 1998), al plásmido resultante se lo denominó pMZC3. **Paso 3:** digestión del plásmido pMZC3 con *NotI*. El fragmento correspondiente al gen *cyaA* interrumpido con *Km* se lo clonó en el plásmido pKNG101, dando lugar a pMZC4. Las flechas de colores indican el lugar de hibridización de los oligos.

### 2.3. Construcción de *P. putida crp cyaA*

La construcción de ésta mutante se llevó a cabo por conjugación homóloga tripartita, igual que las dos mutante anteriores, utilizando como cepa donadora *E. coli* cc118 $\lambda$ pir con el plásmido pMZC4 y como cepa receptora *P. putida crp*.

### 3. Construcción de los plásmidos pMZC5 y pMZV7

Los plásmidos pMZC5 y pMZV7 llevan las proteínas CyaA y Crp-c-Myc respectivamente. Dichos plásmidos fueron utilizados para complementar las mutaciones en los genes correspondientes a cada proteína. Además el plásmido pMZV7 se usó para el ensayo de inmunoprecipitación de ADN como se detalla más adelante. En el plásmido pMZV7 la proteína Crp lleva una marca inmunodetectable el epítipo c-Myc en su extremo C-terminal.

Para la construcción de **pMZC5** se siguieron los pasos que se detallan a continuación: Paso 1: se amplificó la región codificante sin promotor del gen *cyaA* de *Pseudomonas putida*, con los oligos CC1 y CC2 por PCR. El fragmento fue digerido con *EcoRI/HindII* y ligado en estos mismos sitios al plásmido pUC18NotI. El plásmido resultante fue nombrado pMZC6. Este plásmido pMZC6 fue utilizado para realizar las reacciones de secuenciación con los oligos CC1, Cyaa1, Cya3, Cya4, Cyaa22 y CC2 (Tabla 4). Paso 2: el plásmido pMZC6 fue digerido con *EcoRI/HindII* y el fragmento obtenido que contenía el gen *cyaA* fue ligado al plásmido pVLT31. De esta manera obtuvimos el plásmido denominado pMZC5.

Para la construcción de **pMZV7** los pasos seguidos fueron: Paso 1: se obtuvo la región codificante del gen *crp* de *P. putida* desde el plásmido pMZV2 por amplificación con PCR con los oligos vfrMyc1 y vfrMyc2. El Oligo vfrMyc2 lleva la secuencia del epítipo c-Myc. Estos oligos amplifican la región codificante del gen *crp* sin el promotor del mismo. El fragmento amplificado fue digerido con *EcoRI/HindII* y clonado en estos mismos sitios en pUC18NotI, obteniendo el plásmido nombrado pMZV6. Paso 2: se digirió pMZV6 con *EcoRI/HindII* y el fragmento conteniendo el

gen *crp-c-Myc* fue ligado al plásmido pVLT31. El plásmido resultante se denominó pMZV7.

#### 4. Medios y condiciones de cultivo

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico y de las casas proveedoras Sigma, Merk, Fluka y Difco. Los cultivos líquidos bacterianos se crecieron a 30°C para *P. putida* y 37°C para *E. coli*, con agitación suave 160 (rpm) y en matraces con una relación 5/1 capacidad del matraz/volumen de cultivo para permitir una buena oxigenación de las bacterias. El medio Luria y Bertani (LB) se utilizó rutinariamente como medio rico en nutrientes (Sambrook J, 1989). Para el crecimiento en medio sólido se adicionó agar a una concentración de 15 g/l. Como medio mínimo se utilizó sales M9, y se le agregó MgSO<sub>4</sub> 1 mM. Según las necesidades del experimento a este medio se le añadió como fuente de carbono glucosa al 0.2% o ácido succínico al 1.5%. Los cultivos en medio mínimo de *P. putida* fueron suplementados también con casaminoácidos al 0.2 %. El medio Mc Conkey se utilizó como medio de cultivo diferencial, para comprobar la fermentación de maltosa, agregando este azúcar como fuente de carbono a una concentración de 0.2%.

Para el estudio de la motilidad bacteriana fueron utilizados los siguientes medios de cultivo (Rashid and Kornberg, 2000):

- Medio de motilidad a modo nado (*swimming*): triptona 10 g/l, NaCl 5 g/l, agarosa al 0.3%.
- Medio de motilidad a modo enjambre (*swarming*): Difco *Nutrient Broth* 8 g/l, glucosa 5 g/l, agar al 0.5%.
- Medio de motilidad a modo crispado (*twitching*): triptona 10 g/l, Extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, agar al 1%.

Para el mantenimiento de plásmidos se utilizaron antibióticos en las siguientes concentraciones: cloranfenicol (Cm) a 40  $\mu\text{g/ml}$ , ampicilina (Ap) a 100  $\mu\text{g/ml}$  o kanamicina (Km) a 50  $\mu\text{g/ml}$  y tetraciclina (Tc) 10  $\mu\text{g/ml}$ .

### 5. Manipulación de ácidos nucleicos

#### 5.1. Extracción de ADN genómico de *Pseudomonas putida*

La extracción del ADN genómico se llevo a cabo según el protocolo descrito en (Murray and Thompson, 1980). Y se detalla a continuación. Las células de 5 ml de cultivo en fase estacionaria, aproximadamente 3.0 unidades de densidad óptica a 600 nm (DO600), fueron recogidas por centrifugación, luego fueron resuspendidas en 567  $\mu\text{l}$  de TE. A continuación se agregó 30  $\mu\text{l}$  de SDS al 10%, y 3  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó 1 h a 37°C. Finalizada la incubación se agregó 100  $\mu\text{l}$  de NaCl 5M mezclando suavemente. Luego se añadieron 80  $\mu\text{l}$  de solución CTAB/NaCl (10% CTAB/ 0.7 M NaCl), se mezcló suavemente y se incubó a 65°C durante 10 min. A continuación se agregó un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló y se centrifugó a 14.000 rpm para separar las fases. Se tomó el sobrenadante conteniendo los ácidos nucleicos, de aspecto muy viscoso y se puso en otro tubo. Se agregó un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se volvió a centrifugar por 5 min El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se le agregó 0.6 vol de isopropanol, se incubó 20 min en hielo y luego se centrifugó 15 min a 14.000 rpm. El ADN precipitado fue lavado con etanol al 70% y luego secado. Finalmente el precipitado se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de TE. La eficiencia de las extracciones de ADN de comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa utilizando marcadores adecuados.



## 5.2. Extracción de ADN plasmídico

Para plásmidos de hasta 5 kb y de alto número de copias, propio de vectores de clonaje, se utilizó el *kit* comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* *GIAGEN* (Cat. 27106) que lleva a cabo el proceso de lisis alcalina siguiendo las instrucciones del fabricante. Para plásmidos de más de 8 kb y/o bajo número de copias, propio de vectores de expresión, se utilizó el siguiente protocolo: partiendo de 2 ml de cultivo en fase estacionaria se recogieron las células por centrifugación. La lisis bacteriana se llevo a cabo agregando 90  $\mu$ l de solución I (Tris-HCl 25 mM pH8, EDTA 10 mM, Glucosa 50 mM, y 10  $\mu$ l de losozima -20 mg/ml-), se incubó en hielo durante 10 min. Luego se añadieron 200  $\mu$ l de solución II (NaOH 0,2N, SDS al 1%), se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min en hielo. Finalizado ese tiempo, se añadieron 150  $\mu$ l de solución III (KAc 3M pH 4,8), se mezcló y se incubó en hielo durante tres min. Se tuvo especial cuidado en las mezclas realizándolas muy suavemente para no romper el plásmido. Luego se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C, el sobrenadante se traspasó a otro tubo y se le agregó 0.6 vol. de isopropanol. Se incubó en hielo durante 20 min y luego se centrifugó 15 min a 14.000 rpm. El precipitado se resuspendió en 180  $\mu$ l de agua y se agregó 20  $\mu$ l de AcNa 3M pH 7. Luego se procedió a añadir 400  $\mu$ l de etanol al 96%, se incubó 20 min a -20°C y luego se centrifugó. El precipitado se lavó con etanol al 70% y luego se dejó secar. Un vez bien seco se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua.

Para obtener más cantidad de ADN plasmídico se llevó a cabo el siguiente protocolo:**MIDI-PREPS**. Partiendo de 50 ml de cultivo, las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 2 ml de solución I (Tris.HCl 25 mM pH8,

## Materiales y Métodos

EDTA 10 mM, glucosa 50 mM), y se añadió ARNasa hasta una concentración final de 50 µg/ml. Luego se añadieron 2 ml de solución II (NaOH 0,2N, SDS 1%), se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 2 ml de solución III (KAc 3M pH 4,8), se mezcló y se incubó en hielo durante 10 min. Luego se procedió a centrifugar a 8.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se le agregó 3 ml de isopropanol, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. Tras la centrifugación se decantó el alcohol y se lavó con etanol al 70%, luego se sacó el precipitado se añadieron 200 µl de agua y 1.5 ml de tampón de unión. La preparación de este tampón es la que sigue: a 133,68 gr de clorhidrato de guanidina (Amresco Cat. 0287) y 10 ml de KAc/HAc pH5, se le agregó 100 ml de agua, luego se calentó hasta disolver y lograr una solución homogénea y se llevó a pH 5.5 con NaOH 10 mM. Finalmente se ajustó el volumen a 200 ml. A la preparación conteniendo el ADN y el tampón de unión se le agregó 0.5 ml de mezcla de resina. La preparación de la mezcla de resina es la que sigue: 15 gr. de Tierra de Diatomea Sigma (Cat. D-5384) más 100 ml de agua, se mezclaron y se dejaron sedimentar durante 3 h. Luego se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso 2 veces más, finalmente se descartó el agua y se añadieron 100 ml de TE. Se guardó a 4°C. Para obtener una correcta homogeneización con la mezcla de resina se utilizó la rueda giratoria a temperatura ambiente durante 20 min. Una vez finalizado esto, se conectó al vacío una columna *Micro Bio-Spin BioRad* (Cat. 732-6204) y se añadió la muestra suavemente mientras el vacío ejercía una succión constante. Para esto se utilizó un *Mani-Fold Promega* (Cat. A732). Luego se lavó con 1 ml de solución de lavado (200 mM NaCl, 20 mM TrisHCl pH 7.5, 5 mM EDTA, etanol al 50%) repitiendo la operación 4 veces, luego se lavó con etanol al

80% y se dejó secar. Finalmente se desconectó la línea de vacío y se colocó la columna en un tubo, se agregó 300  $\mu$ l de agua, se incubó durante 5 min y luego se centrifugó a 5.000 rpm durante 3 min. En el eluido se obtuvo el ADN plasmídico.

### **5.3. Digestión y Ligación de Fragmentos de ADN**

Las endonucleasas de restricción fueron adquiridas en la casa comercial *New England Biolabs*. Las digestiones se realizaron siempre a 37°C durante 2 h, en el tampón recomendado para el óptimo funcionamiento de cada enzima. Para las reacciones de ligación se utilizó la ligasa T4 de la misma casa. Las reacciones de ligación se realizaron teniendo en cuenta la proporción 4/1 inserto/vector, e incubando la mezcla de reacción durante 12 h a 16°C. En algunas ocasiones, para favorecer una buena ligación antes de proceder a la reacción de ligado se incubaron tanto el inserto como el vector 5 min a 45°C y luego se incubaron en hielo hasta su ligación propiamente dicha. Esto parece favorecer la liberación de la mayor parte de los extremos que luego van a ser ligados.

### **5.4. Aislamiento de fragmentos a partir de geles de agarosa**

Los fragmentos de ADN se extrajeron de geles de agarosa utilizando el *Kit* comercial *QiAEX<sup>®</sup> II Gel extraction Kit QIAGEN* (Cat. 20021), en donde se utiliza INa para disolver la agarosa y así liberar el ADN, que luego queda retenido en una matriz; de este modo se puede lavar y luego eluirlo, obteniéndole muy puro.

## **6. Diseño de los oligonucleótidos**

El diseño de los oligonucleótidos se realizó a partir de la secuencia de ADN. Se verificó que los dos oligos utilizados en la reacción de PCR no

## Materiales y Métodos

hibriden entre si. Se tuvo en cuenta en el diseño que los valores de temperatura de hibridación ( $T_m$ ) fueran más altos de  $55^\circ\text{C}$ , para favorecer la especificidad en la unión de los oligonucleótidos con el ADN. La fórmula utilizada para calcular la  $T_m$  fue:

$$T_m = \frac{[60 + (0.4 * \%GC)] - 500}{n}$$

n= número total de bases

Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4: Nombre y secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Cyaa1	GAATTCGCTTCCTGCATCTGAACCAGGG
Cyaa22	GGGAAGCTTCCCCAGCACATACACGTC
CC1	CGAATTCGGGCTAAACTCGCCACAGCTTCAATG
CC2	CCCAAGCTTGGGATTTGCAGCACAAGGCTGTTCCAC
Cya3	GTAGGCCAGCTCGGCTCCGA
Cya4	CGCACCCAGAACGCCAGCAG
VFR1	GAATTCAGGCCAGCAACAGCATTTCCATC
VFR2	AAGCTTTGCGATGGCCGCTACAACGTC
UTR1.2	TCACCGGCCCACTGGATACGTGCCTTC
UTR2.2	CCCACAGCCGCACAAGGTCTAAGCTG
vfrMyc1	CCGGAATTCGGGATTCAGGAGATATCCATGGTTGCCTCCGCCCTACCCGCCA
vfrMyc2	CCCAAGCTTGGGCTATAGGTCTTCTCTGATATTAGTTTTGTTCCGGGTACCGTCGAC
REPO.F	GTGGAATTCGGGGTACCCCTGAGTGCATCCACCGCGA
REPO.R	CGGGATCCCGGGCTGCAGTTTTCGAGAGAGTTCGCCACCAT

## 7. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR

Se utilizó la Taq DNA polimerasa de Roche. Los dNTPs fueron añadidos a una concentración de 0.2 mM, los oligonucleótidos a 0.2  $\mu$ M y MgCl a 1.5 mM. El protocolo base de amplificación se detalla a continuación:

1. Desnaturalización inicial 4 min a 94°C.
2. 35 ciclos de: desnaturalización 1 min a 94°C, hibridización 1 min a 55°C ( $T_m$  del oligo), extensión 2 min a 72°C.
3. Extensión final 7 min a 72°C.

El termociclador utilizado fue *BioRad / Cycler*, el programa fue modificado dependiendo de la  $T_m$  de los oligos y el tamaño de ADN que se necesitaba amplificar. Luego de su comprobación en un gel de agarosa, los fragmentos amplificados por PCR fueron limpiados de restos de oligos y nucleótidos para una mejor manipulación, utilizando el *Kit High Pure PCR Product Purification Kit* Roche (Cat. 11 732 676 001). En muchos casos se utilizó la técnica denominada **PCR de colonias**, en donde se procedió exactamente igual que una reacción de PCR normal, como se describe antes, pero se uso como molde una pequeña porción de una colonia bacteriana.

## 8. Análisis y comparación de secuencias

El análisis informático de las secuencias de nucleótidos se realizó utilizando el paquete de análisis de DNASTAR Inc. La comparación de secuencias y la búsqueda de sus homólogos en diferentes organismos se realizó con los programas BLAST de NCBI y ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

## 9. Preparación de extracto de proteínas totales

Las bacterias fueron cultivadas en medio líquido hasta alcanzar la densidad óptica deseada, luego se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 min, y el precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ l de tampón de carga (SDS al 2%, glicerol al 5%, Tris-HCl 60 mM pH6.8,  $\beta$ -mercaptoetanol al 1%, azul de bromofenol al 0.005%). Las muestras se hirvieron durante 10 min y luego se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min, finalmente se tomó el sobrenadante y se guardó a -20°C.

### 9.1. Electroforesis de proteínas

Las muestras de proteínas para electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se prepararon usando métodos estándar (Ausubel, (1994) ). Las muestras se hirvieron a 100°C 10 min en tampón de carga (ver composición en apartado 9). Los geles se corrieron en equipo Mini-PROTEAN® 3 Cell (BIO-RAD) y una fuente Power Pac (BIO-RAD) a 90v. Para la visualización de las proteínas se usó la tinción con azul de Comassie: 50% metanol, 0.05% Comassie brilliant Blue R-250, 10% ácido acético.

### 9.2. Ensayos de inmunodetección, *Western blot*

Las proteínas se prepararon como se detalla anteriormente para correr los geles. Las proteínas fraccionadas en muestras se transfirieron a membranas de polivinilo difluorado (PVDF; Immobilon-P, Millipore) en semi-seco (Bio-Rad). Los anticuerpos primarios conjugados a peroxidasa se usaron a diluciones de 1/5000 o 1/1000 según cada caso (detalles en Resultados). La actividad de la peroxidasa se detectó usando una mezcla quimioluminiscente de 1.25 mM Luminol (Sigma), 42 M luciferina (Roche) y 0,0075% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 100 mM Tris-ClH pH 8,0.

Para sensibilidades más altas se utilizó el *kit* de quimiolumiscencia BM *Chemiluminescence Blotting Substrate* (POD) Roche (Cat. 11500694001). Las membranas así tratadas se expusieron a una película de rayos X (X-OMAT, Kodak), a tiempos variados.

### **10. Extracción y Visualización del lipopolisacárido (LPS)**

Para el aislamiento de LPS según el protocolo descrito por (Hitchcock and Brown, 1983) se partió de 5 ml de cultivo en fase estacionaria en LB. Este se centrifugó a 15.000 g durante 15 min a 4°C. El sedimento con las células fue lavado dos veces con tampón salino PBS 1X. Luego se centrifugó para eliminar el PBS y el precipitado se resuspendió en 1 ml de Triton X-100 al 1%. Se centrifugó 15 min a 15.000 g a 4°C, se tomó el sobrenadante y se descartó (que contiene los lipopolisacáridos que han sido solubilizados por el detergente), y se añadieron al sedimento 500 µl de tampón de lisis (SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 4%, glicerol al 10%, azul de bromofenol de 0.002%, 1M Tris-HCL pH 6,8). Luego las muestras se hirvieron durante 10 min, a continuación se añadió 1 µl de proteinasa K (25 µg/ml stock) y se incubó durante 1 h a 30°C. Para su visualización los lipopolisacáridos se corrieron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12,5 % siguiendo el protocolo descrito por (Ausubel, (1994) ) como en el punto 8.1 de este apartado. Luego fueron revelados por una tinción de plata. Para ello los geles se dejan durante 12 hs en solución de fijación: 25% (vol/vol) de isopropanol, 7% (vol/vol) de ácido acético. Luego se incubó 5 min en solución de oxidación, 1 g de ácido periódico, 150 ml de agua destilada y 4 ml de la solución de fijación. Luego se lavó el gel con agua destilada durante 3 h, realizando un intercambio de agua limpia cada 30 min. La tinción se llevó a cabo durante 10 min en una solución que contenía 28 ml de NaOH 0.1 N, 1,5 ml de NH<sub>4</sub>OH concentrado

(29.4%), 5 ml de  $\text{AgNO}_3$  20% y 115 de agua destilada. Luego se lavó durante 40 min en agua y finalmente se reveló por incubación durante 20 min en solución de revelado: 50 mg de ácido cítrico, 0.5 ml de formaldehído al 37% en 1 litro de agua destilada. Luego se realizaron varios lavados en agua destilada para mejorar la observación de los LPS teñidos.

### 11. Ensayo de Retardo de la movilidad electroforética

Para la preparación del **extracto proteico** el cultivo en donde se ha sobreexpresado la proteína en estudio, se centrifugó y se resuspendió en PBS 1X y se agregó una pastilla de un cóctel de inhibidores de proteasa (*complete, EDTA-free Roche* cat. 11873580) cada 50 ml de cultivo. Se mezcló y luego se paso una prensa de Frech para lisar las células. A continuación se centrifugó a 40.000 rpm durante 40 min y se descartó el precipitado. Al sobrenadante se le agregó polietilenimina al 0.3% para eliminar el DNA, se mezcló durante 10 min a 4°C y luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó el precipitado y al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio 60% para precipitar la proteína Crp de *P. putida*.

Para el **marcaje del ADN** empleado en el procedimiento se procedió como sigue: el fragmento de ADN fue escindido del plásmido pREPO por digestión secuencial con las enzimas de restricción *EcoRI/PstI*. El producto de la digestión del plásmido se corrió en un gel de agarosa. El fragmento de interés fue identificado por comparación con un marcador de peso molecular, y luego fue extraído del gel. Luego se procedió a realizar la reacción de marcajes mezclando el fragmento de ADN, más dTTP, dGTP, dCTP (cada uno a una concentración de 0,2 mM), dATP\* marcado



radiactivamente (dATP $\alpha$ [ $^{32}$ P]) Amersham (Cat. AA004) 0.5 mM, enzima Klenow, tampón necesario para el correcto funcionamiento de la enzima y completando con agua hasta 30  $\mu$ l. Se mezcló y se incubó 20 min a temperatura ambiente y luego 20 min a 30°C. Finalmente, se pasó por una columna Sephadex 50 para eliminar la marca no incorporada en la reacción. El fluido de la columna, correspondiente al fragmento de ADN marcado, se midió en un contador de centelleo *Wallac* 1410.

Para el **retardo en gel** las mezclas se ensamblan en un volumen de 20  $\mu$ l. En cada caso, se mezclan 0.5 nM aproximadamente de ADN marcado, concentraciones creciente del extracto proteico antes detallado, PolidI-dC, 2  $\mu$ l de tampón (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM). Se mezcló y se incubó durante 30 min a 30°C, luego se guardaron a 4°C. Las muestras se cargan en un gel de acrilamida al 4 % (Sambrook J, 1989). El gel se corrió a 100 V durante 6 h, luego se secó al vacío durante 1 h y finalmente se expuso a película autoradiográfica.

## 12. Tinción y visualización de flagelos

Para la observación de flagelos se tomaron 3  $\mu$ l de cultivo en la densidad óptica deseada que se colocaron sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjeto. La tintura utilizada contiene 10 partes de mordiente (2g de ácido tánico, 10 ml de fenol al 5%, 10 ml de solución acuosa saturada de AlK<sub>8</sub>S<sub>2</sub>12 H<sub>2</sub>O) por una parte de cristal violeta al 12% en etanol (Mayfield and Inniss, 1977). Sobre un borde del cubreobjetos se colocaron 10  $\mu$ l de tintura y se dejó que fluyeran por capilaridad y luego se observó en microscopio OLYMPUS V-RFL-T.

### 13. Ensayo de transcriptómica

Se utilizaron los MicroChip de *P. putida* Genome oligonucleotide Array Progenica-Medplant Genetics. Este MicroChip consiste en 5.557 marcos de lectura abiertos (ORFs) de *Pseudomonas putida*, cada ORFs está representada dos veces por un oligonucleótido de 50 pb. La misma casa comercial provee un archivo con la ubicación de cada gen en el MicroChip. Para el **aislamiento de ARN** se tomaron 2 ml de cultivo y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 segundos para recolectar las células. Luego se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de *Trizol® Reagent* (Invitrogen Cat.15596-018) frío, se agitó vigorosamente y se añadió 250 µl de cloroformo y se incubó en hielo durante 15 min. Luego se transfirió a un tubo *phase lock Gel™ Heavy Eppendorf* (Cat. 955154045) que facilita la separación entre las dos fases y luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se le agregó 1 volumen de isopropanol frío, precipitando los ácidos nucleicos durante 30 min a -80°C. A continuación se centrifugó y se obtuvo el precipitado que fue lavado con etanol al 70% y secado. El precipitado fue resuspendido en 200 µl de agua tratado con DEPC al 1%. Luego se agregó 1 µl de DNase-RNase free Ambion (Cat. 2222) y se incubó a 37°C durante 1h. Para eliminar la enzima se realizó una fenolización en un tubo *phase lock* y luego se precipitó el ARN con etanol 96%. Una vez precipitado y seco el ARN se resuspendió en agua tratada con DEPC al 0.1%. El ARN se paso por *Columnas QIAGEN RNeasy* (Cat. 74104) para eliminar cualquier otro resto posible, ya que la pureza del ARN es fundamental en estos experimentos. Para comprobar su integridad, el RNA resultante se analizó en *Bioanalyzer 2100*. A partir de aquí, los siguientes pasos de transcripción reversa, marcaje e hibridación

fueron realizados en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología y se detalla a continuación:

El ARN obtenido en cada condición de estudio se transcribió a ADN copia y se marcó con los fluoróforos Cy3 y Cy5. Este procedimiento se realizó de manera indirecta utilizando el SuperScript™ Indirect cDNA Labeling System Invitrogen (Cat. L1014-01, L1014-2, L1014-03). Para los ensayos siguientes los cristales, MicroChip de ADN de *P. putida*, se trataron durante 1 h a 42°C con una solución de prehibridación compuesta por SSC 6X, SDS al 0.5% y soro albúmina bovina (BSA) al 1%. Entre tanto se realizó una mezcla de 200 pmoles de cada muestra de ADN copia (marcada cada una con un fluoróforo) ajustando a un volumen de 10 µl. Luego se añadió 70 µl de solución de hibridación (formamida al 50%, SSC 3X, SDS 1%, Denharts 5X, Dextransulfato al 5%) y se calentó durante 5 min a 95°C. La mezcla se aplicó al cristal y la hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a 42°C. Transcurrido ese tiempo, se realizaron lavados en agitación (230 rpm): 3 lavados de 5 min con SSPE 0.5X (SSPE 20 X: NaCl 175.3 g/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 27.6 g/l, Na<sub>2</sub>EDTA 7.4 g/l, pH 7.4) y Tween 20 al 0.1% a 42°C; 3 lavados de 5 min con SSPE 0.5X a 42°C; y 2 lavados de 5 min con SSPE 0.1X a 37°C. Los cristales se pasaron por agua antes de secarlos en una centrifuga durante 1 min a 600 xg. A continuación, los cristales fueron escaneados con el programa GenePix4000B (Axon Instruments) y las imágenes se cuantificaron con el software GenePix pro 5.1. Los datos de expresión se normalizaron y analizaron utilizando el paquete de programas LIMMA (Team, 2004). La expresión diferencial fue valorada utilizando los modelos lineales y empíricos de Bayes mediados por F estadística (Smyth, 2004). Para la corrección local de fondo se utilizó el método de “*nomexp*” en LIMMA (Smyth *et al.*, 2005) para ajustar las estimaciones de las medianas locales. Usando estas estimaciones se calculó la relación entre cada uno

de los genes de las estirpes a comparar cuanto y como aparece reflejada para cada punto del MicroChip.

### 14. Inmunoprecipitación y MicroChip de ADN (*ChIP to CHIP*)

Esta técnica combina la inmunoprecipitación de ADN selectivamente unido a la proteína Crp de *P. putida* con la identificación de estas secuencias por la hibridación en un MicroChip. Para ello se llevaron a cabo varios pasos que se describen de manera esquemática en la Fig. 8 y se detallan a continuación. Para la inmunoprecipitación de ácidos nucleicos con el plásmido pMZV7 se procedió como sigue. A partir de 50 ml de cultivo, se recogieron las células por centrifugación a 8.000 rpm durante 10 min y luego se resuspendieron en 2 ml de buffer fosfato 10 mM pH 7. A esto se agregó formaldehído al 1% para favorecer la unión proteína-ADN y luego se mezcló en rueda giratoria agitándose durante 20 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se agregó glicina disuelta en agua a una concentración final 200 mM, y se siguió mezclando durante 5 min. Luego se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis (10 mM Tris pH8, sacarosa al 20%, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, lisozima 10mg/ml) y se incubó a 37°C durante 30 min. A continuación se agregó 4 ml de tampón de inmunoprecipitación (50 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, Triton X100 al 0.5%, SDS al 0.1%, deoxicolato de sodio al 0.5%). Luego se procedió a sonicar 2 min a máxima potencia, a intervalos de 20 segundos. A continuación se centrifugó. Al sobrenadante se le agregó 10 µl proteína G sefarosa *Protein G sepharose*<sup>®</sup> Pharmacia *Biotech* (Cat. 17-0618-01 por ml muestra) y se incubó a 4°C durante 1 h. Luego se centrifugó durante 15 min a 12.500 rpm 4°C, se descartó el precipitado y al sobrenadante se le agregó 1 µl del anticuerpo monoclonal antic-Myc cada 100 µl de sobrenadante recolectado. Se incubó con

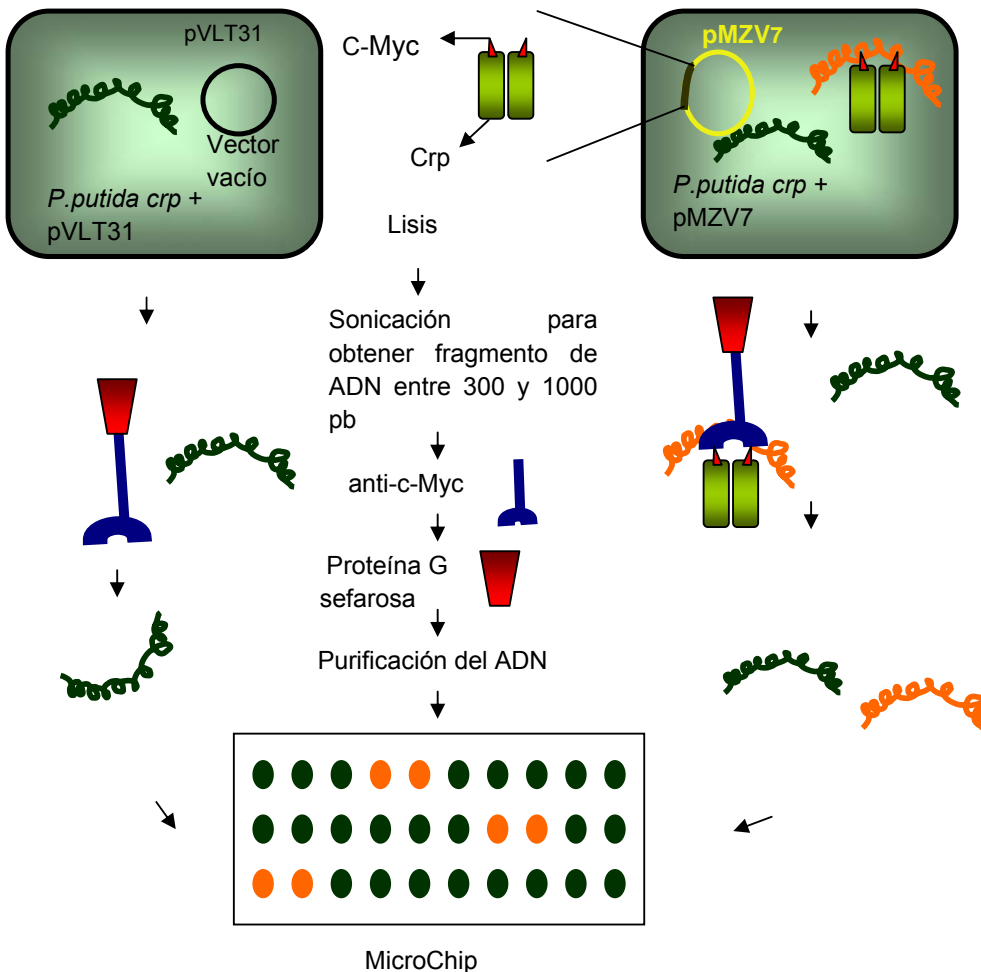
agitación suave durante toda la noche a 4°C. A continuación se agregó 40 µl proteína G sefarosa cada 600 µl de muestra y se incubó a 4°C durante 1 hora. Finalmente se centrifugó 15 min a 12.500 rpm 4°C, el precipitado se lavó con tampón de inmunoprecipitación. A continuación se agregó 300 µl de Tampón de elución (50 mM Tris-ClH pH8, 10 mM EDTA, 1% SDS) y se incubó a 65°C durante 15 min. Para separar la proteína G sefarosa se incubó durante toda la noche a 65°C. Luego se agregaron 10 µl de Proteinas K (12 mg/ml stock) y se incubó 2 h a 37°C. Finalmente, se realizó una extracción fenol-cloroformo para eliminar los restos proteicos y el ADN se precipitó con etanol. A partir de aquí, los siguientes pasos fueron realizados en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología tal y como se detalla a continuación. Para el **marcaje del ADN** obtenido de la inmunoprecipitación se utilizó el Kit de marcaje de ADN *Bioprime plus array CGH labelling* (Cat. 18096-011) Invitrogen. De la misma manera que el ensayo de transcriptómica, se marcó el ADN proveniente de la inmunoprecipitación con Crp (pMZV7) con un fluoróforo y el ADN proveniente de la inmunoprecipitación con el plásmido vacío con otro el fluoróforo. La mezcla de estos dos ADN copia marcados es lo que se usa para hibridar los MicroChips. La hibridación, digitalización de la imagen y análisis de datos fueron realizados como se detalla con anterioridad en el apartado 13.

## 15. Microscopía electrónica

El procesamiento de las muestras para microscopía electrónica se realizó en el servicio de Microscopía del Centro Nacional de Biotecnología. Las células procedentes de un cultivo de *P. putida* se adsorbieron durante 2 min sobre rejillas de cobre recubiertas de collodion y carbón. Luego se retiró el exceso de muestra y se tiñeron con acetato de uranilo al 2%

## Materiales y Métodos

durante 45 segundos. La observación se realizó por tinción negativa de en microscopio Jeol 1200 EXII a 100 KV.



**Figura 8.** Esquema de la inmunoprecipitación de ADN con Crp marcada con c-Myc. Se parte de dos cultivos y estos se llevan de manera paralela. Un cultivo lleva el plásmido vacío pVLT31 y el otro lleva el plásmido pMZV7 con la proteína Crp-c-Myc. Una vez que se expresó la proteína se lisan las células y se sonicán para obtener fragmentos de ADN capaces de unirse al MicroChip y ser identificados. Luego se agregó el anticuerpo anti-c-Myc, seguido a esto se añadió la proteína G sefarosa para que se una a éste anticuerpo. Finalmente se precipita el ADN. En las dos muestras tenemos ADN, que se denomina inespecífico y está en color verde y solo en la muestra con la proteína Crp obtenemos el ADN que ha sido inmunoprecipitado por esta, que se muestra en color naranja. El ADN proveniente de cada muestra se marca con un fluoróforo y se procede de manera similar que con un ensayo de transcriptómica convencional. Los genes que estén presentes en las dos muestras, son descartados y analizamos los genes que están presentes en la muestra que lleva la proteína Crp.

## 16. Identificación de impronta peptídico

Para la digestión en gel de proteínas, las bandas correspondientes fueron recortadas manualmente del gel y procesadas de forma automática en una estación de digestión y preparación Proteineer DP (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Houthaev *et al.*, 1995). El protocolo de digestión empleado fue el de (Shevchenko *et al.*, 1996) con ligeras variaciones: las bandas fueron lavadas con 25  $\mu$ l de bicarbonato amónico 50 mM y luego con 25  $\mu$ l acetonitrilo. Se procedió entonces a la reducción de las muestras con ditioneol 10 mM en bicarbonato amónico 25 mM a 56°C durante 20 min y la alquilación con iodoacetamida 50 mM en bicarbonato amónico 50 mM a temperatura ambiente por 15 min. A continuación, las bandas fueron lavadas con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo y se secaron a 40°C. Se añadió a las bandas secas tripsina porcina modificada para secuenciación (Promega), a una concentración final de 15 ng/ $\mu$ l en bicarbonato amónico 25 mM y 50% acetonitrilo. Se dejó una primera etapa de digestión durante 45 min a 4°C. Luego se añadió bicarbonato amónico 50 mM para que prosiguiese la segunda etapa de digestión por 4 h más a 37°C, tras lo cual se procedió a la extracción de los péptidos tripticos con TFA al 0.5% durante 15 min. La muestra se secó con calor en una centrífuga de vacío y posteriormente se reconstituyó en 4  $\mu$ l de TA (solución de acetonitrilo acuoso al 33% con ácido trifluoroacético al 0.1%) sonicando las muestras durante 3 min. Para el análisis de la Impronta peptídica mediante MALDI y búsqueda en bases de datos se procedió como sigue. Se depositó manualmente una alícuota de 0.7  $\mu$ l de solución matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinámico 1 g/L en acetonitrilo acuoso al 33% con ácido trifluoroacético al 0.1%) en un portamuestras MALDI AnchorChip<sup>TM</sup> de 600  $\mu$ m que se dejó secar a temperatura ambiente; A continuación, se añadieron 0.7  $\mu$ l de la mezcla de péptidos eluidos y se

## Materiales y Métodos

dejó secar de nuevo a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas de manera automática en un espectrómetro de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*, Desorción e ionización mediante láser asistida por matriz con tiempo de vuelo) Bruker Reflex™ IV (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Alemania), equipado con fuente de iones SCOUT™, en modo reflector positivo empleando extracción retardada de iones. El voltaje de aceleración de los iones fue de 23 kV. Cada espectro fue calibrado internamente empleando determinadas señales provenientes de la autoproteólisis de la tripsina. De esta forma la precisión en la medida de las masas se situó típicamente en  $\pm 30$  ppm. Las masas correspondientes a péptidos trípticos registradas fueron enviadas automáticamente a través del programa MS BioTools™ al programa Mascot™ (Matrix Science) para efectuar la búsqueda en la base de datos NCBI nr. No se establecieron restricciones respecto a la especie de origen, se permitió la pérdida de un corte tríptico y la precisión másica se fijó en 100 ppm. El número mínimo de péptidos trípticos necesarios para el ajuste fue de 4.



## **RESULTADOS**



## Capítulo I

**Identificación del sistema cAMP-Crp en *P. putida* y comparación con dicho sistema en *E. coli***



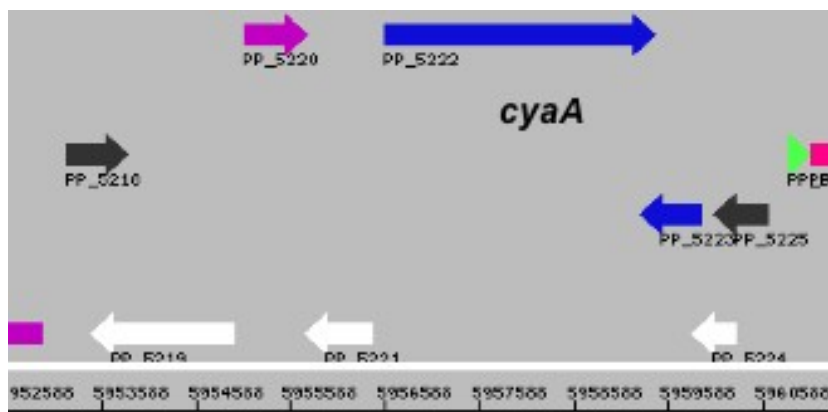
## 1. Identificación de los genes *crp* y *cyaA* en el genoma de *Pseudomonas putida*

Para aislar los genes *crp* y *cyaA* en el cromosoma de *Pseudomonas putida*, se utilizó la herramienta bioinformática BLASTP. En primer lugar se obtuvo la secuencia de aminoácidos de las proteínas Crp (ExpAsY / UniProTKB / Swiss-Prot: Q2M723, (Aiba *et al.*, 1982; Cossart and Gicquel-Sanzey, 1982) y CyaA (ExpAsY / UniProTKB / Swiss-Prot: Q2M8B1, (Aiba *et al.*, 1984) de *E. coli*.

Utilizando estas proteínas como referencia y el programa: NCBI BLASTP 2.2.13, se buscaron proteínas homologas en el genoma de *Pseudomonas putida* 2440 <http://ca.expasy.org/sprot/hamap/PSEPK.html> (Nelson *et al.*, 2002).

La proteína más similar a CyaA de *E. coli* según BLASTP en *P. putida* fue la proteína denominada adenilato ciclasa clase I, CyaA (ExpAsY / UniProTKB / Swiss-Prot: Q88CF9\_PSEPK *Locus name*: PP5222, con un valor E de e-117, 37 % identidad y 53 % positivo). A ésta proteína se le atribuye la función biológica de biosíntesis de AMP cíclico y se la clasifica dentro de los adenilatos ciclasas Clase I. Todos estos datos son por comparación de secuencia, ya que no hay ninguna bibliografía hasta el momento en donde se describa a PP5222 de *P. putida*. No se encontró otra proteína que sea homóloga a CyaA en este genoma. La localización cromosómica de PP5222 se muestra a continuación en la Fig. 9.

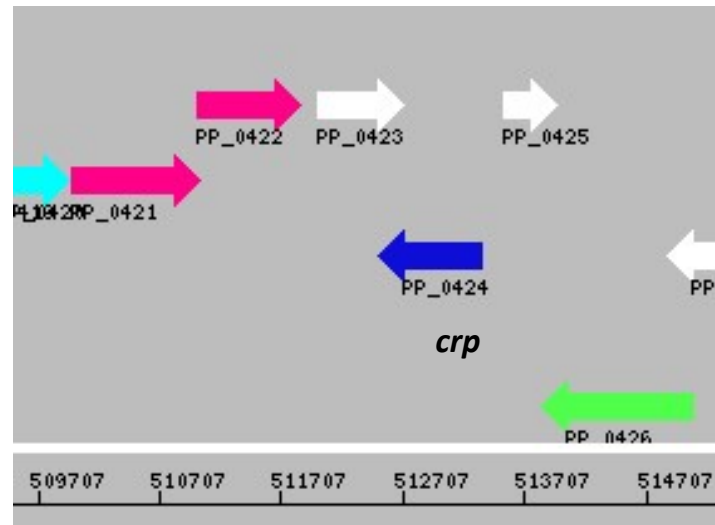
## Resultados



**Figura 9.** Situación de *cyaA* en el cromosoma de *P. putida*. La ORF PP\_5222 se corresponde con el gen *cyaA*. En la parte inferior se muestran las coordenadas en el cromosoma. Se puede observar una disposición singular del gen *cyaA* en el contexto cromosómico (Figura obtenida desde *Pseudomonas putida* KT 2440 Genome page).

Como podemos observar en la Fig. 9 el gen *cyaA* se encuentra en emplazamiento singular, las Orfs que se hallan contiguas son: PP\_5218 *dedA* family protein, PP\_5219 *conserved hypothetical protein*, PP\_5220 *enhancing lycopene biosynthesis protein 2 (elbB)*, PP\_5221 *conserved hypothetical protein*, PP\_5223 *nucleoside diphosphate kinase regulator (rnk)*, PP\_5224 *conserved hypothetical protein*, PP\_5225 *cyaY* protein.

Por otra parte el resultado del BASTP, utilizando como referencia a Crp de *E. coli*, dio como proteína más similar en *P. putida* a la proteína *Catabolite gene activator*, Crp, (ExPAsY / UniProTKB / Swiss-Prot: Q88QR4\_PSEPK Locus name: PP0424, con un valor E de 1e-71, 62% identidad y 72% positivo). Esta proteína tiene un sitio de unión a nucleótidos cíclicos, un dominio de unión a ADN y se le atribuye la función biológica de regulación de la transcripción. Al igual que en el caso anterior todos estos datos son por comparación de secuencia. La situación de *crp* en el cromosoma de *P. putida* se muestra en la Fig. 10.



**Figura 10.** Localización de *crp* en el cromosoma de *P. putida*. La ORF PP\_0424 se corresponde con el gen *crp*. En la parte inferior se muestran las coordenadas en el cromosoma. Observamos que el gen *crp* se encuentra ubicado de manera singular. (Figura obtenida desde *Pseudomonas putida* KT 2440 Genome page).

Observando la Fig. 10 vemos que el gen *crp* se encuentra situado de manera singular, y las ORFs contiguas son: PP\_0421 *anthranilate phosphoribosyltransferase (trpD)*, PP\_0422 *indole-3-glycerol phosphate synthase (trpC)*, PP\_0423 *conserved hypothetical protein*, PP\_0425 *conserved hypothetical protein*, PP\_0426 *membrane protein putative*.

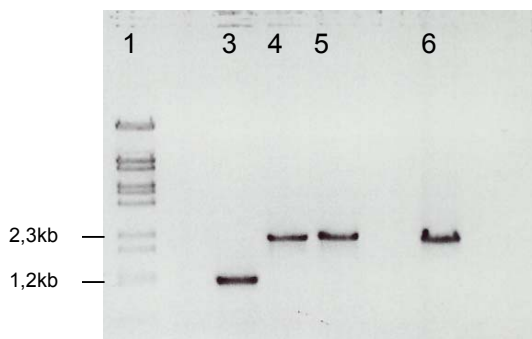
## 2. Construcción de las mutantes *P. putida crp*, *P. putida cyaA* y *P. putida crp cyaA*

Como ya se describió en Materiales y Métodos, para construir estas cepas se llevó a cabo el diseño y construcción de los plásmidos derivados de pKNG101 denominados pMZV4 y pMZC4. A continuación se detalla el procedimiento utilizado para la construcción de todos los mutantes.

### 2.1. Construcción de *P. putida crp*

El plásmido pMZV4 (*crp::xylE*), es un vector movilizable con un origen de replicación condicional R6K. Tiene un gen de resistencia a estreptomicina y un gen que le confiere sensibilidad a sacarosa. Estos marcadores permiten la construcción de las mutantes en dos pasos: en primer lugar se forma un cointegrado entre el plásmido y el cromosoma, y en segundo lugar, se resuelve el mismo, dando lugar a la integración en el cromosoma de la copia de *crp::xylE*. Además, el gen *xylE* proporciona otra herramienta para seleccionar las colonias que lo contienen, ya que cuando son rociadas con catecol, cambian de color al amarillo gracias a la acción de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa. Las colonias resultantes de la conjugación en el primer evento de recombinación fueron aisladas en LB telurito (80 µg/ml) estreptomicina (250 µg/ml). Las que crecían en estas condiciones y morían en placas LB telurito sacarosa al 0.8% se inocularon en tubos con LB solo y se dejaron 12 h a 30°C, para que se lleve a cabo el segundo evento de recombinación el cual se puede detectar por la resistencia a sacarosa y la sensibilidad a estreptomicina. De estos cultivos se aislaron colonias y se comprobó que fueran amarillas cuando se rociaban con catecol, habilidad que le confiere el gen *xylE*. Finalmente a estas colonias se les realizó PCR de colonias para verificar el cambio en el tamaño del gen *crp* en el cromosoma. Se utilizaron los oligos VFR1, el cual hibrida hacia 5' fuera del sitio de recombinación y VFR2 que hibrida hacia 3' adentro del sitio de recombinación (ver ubicación de oligos en Fig. 6 en Materiales y Métodos). El resultado de las amplificaciones se muestra en la Fig. 11.





**Figura 11.** Diferencia de tamaño entre las bandas amplificadas por PCR entre las cepas que llevan la versión silvestre del gen *crp* y las que llevan la versión *crp::xylE*. Carriles 3, 4 y 5 PCR de colonias y carril 6 PCR usando como ADN molde el plásmido pMZV4 1- Marcador de peso molecular  $\lambda$ Bst E II, 3- *P. putida* silvestre con oligos VFR1 y VFR2, 4- *P. putida crp* con oligos VFR1 y VFR2, 5- *P. putida crp cyaA* oligos con VFR1 y VFR2, 6- plásmido pMZV4 con oligos UTR 1.2 y VFR2. Se puede observar la diferencia de tamaño debido a la inserción del gen *xylE*.

Como podemos observar en la Fig. 11 la banda obtenida en la bacteria mutante *P. putida crp* y la doble mutante *P. putida crp cyaA* (carril 4 y 5) es mayor que en la silvestre *P. putida* silvestre (carril 3), ya que lleva la inserción del gen *xylE*.

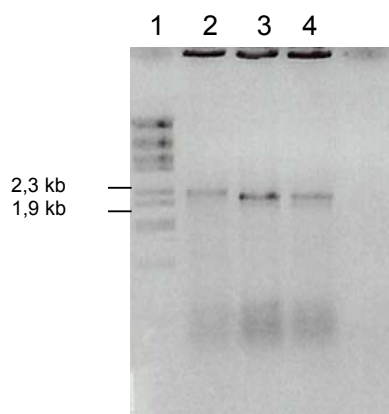
## 2.2. Construcción de *P. putida cyaA*

Una vez obtenido el plásmido pMZC4 ( $\Delta cyaA::km$ ) se procede de la misma manera que con pMZV4. En este caso utilizamos la resistencia a *km* como herramienta de selección. Vale la pena aclarar que las bacterias solo crecían en una concentración de Km 25  $\mu$ g/ml, la mitad de la concentración que se utiliza normalmente (50  $\mu$ g/ml). El gen de resistencia a *km* está clonado sin su promotor, y depende para su expresión del promotor del gen *cyaA*.

Para comprobar la inserción en el cromosoma del fragmento  $\Delta cyaA::km$ , además de la mencionada resistencia a *km*, se realizó PCR de colonia. Se

## Resultados

utilizó un oligonucleótido que hibridaba fuera del sitio de recombinación y el otro hibridaba dentro, de esta manera se pudo comprobar la correcta inserción. El resultado de las amplificaciones por PCR se puede observar en la Fig. 12.



**Figura 12.** Diferencia de tamaño entre las bandas amplificadas por PCR entre las cepas que llevan la versión silvestre del gen *cyaA* y las que llevan la versión  $\Delta cyaA::km$ . 1.- Marcador de peso molecular  $\lambda/Bst EII$ , 2.- *P. putida* silvestre con oligos CC1 y CyaA 22, 3.- *P. putida cyaA* con oligos CC1 y CyaA22, 4.- *P. putida crp cyaA* con oligos CC1 y CyaA22. Se puede observar la diferencia de tamaño de las bandas amplificadas entre la cepa silvestre y la mutante.

Como podemos observar en la Fig. 12, existe una diferencia de tamaño en las bandas amplificadas entre los oligos CC1 y CyaA22. En las estirpes mutantes (carril 3 y 4) las bandas son más pequeñas que en la silvestre (carril 2). Esto es debido a que, al deleccionar un fragmento en medio del gen *cyaA* e insertar el gen de *km* se pierden 249 pb.

### 2.3. Construcción de *P. putida crp cyaA*

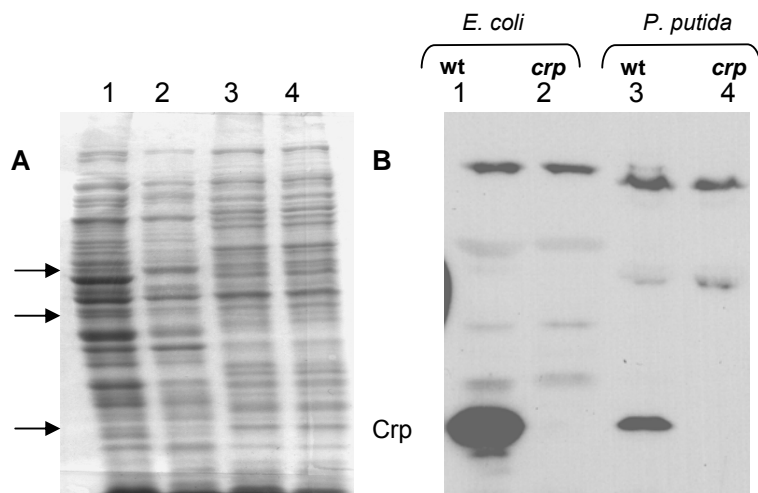
La construcción de éste mutante se llevo a cabo por conjugación tripartita de igual manera que los dos mutantes anteriores. Se utilizó como cepa donadora *E. coli* cc118 $\lambda$ pir con el plásmido pMZC4 y como cepa receptora *P. putida crp*. La comprobación se realizó por PCR de colonia como se detalló anteriormente y se puede observar el resultado en las figuras 11 y 12.

### **3. Estudios de semejanza estructural y funcional entre Crp de *P. putida* y Crp de *E. coli***

#### **3.1. Reacción cruzada con anticuerpo anti Crp**

Sabiendo la alta identidad (67%) que tienen las proteínas Crp de *E. coli* y Crp de *P. putida*, se decidió hacer un estudio de reacción cruzada con el anticuerpo anti-Crp realizado contra Crp de *E. coli* (Ishizuka *et al.*, 1993). Se utilizaron las cepas de *E. coli* MC4100 silvestre y la mutante *E. coli crp* SBS688 como controles. Estas estirpes de *E. coli* y las cepas de *P. putida* silvestre y *P. putida crp* se crecieron en matraces a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica 1 a 600 nm, luego se tomó 1 ml y se recogieron las células por centrifugación. Finalmente se resuspendieron en 100 µl de tampón de carga. Las muestras conteniendo los extractos de proteínas totales se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, y se realizó un *Western blot* (ver Materiales y Métodos). El resultado se muestra en la Fig. 13.

## Resultados



**Figura 13.** Visualización de la reacción cruzada en extracto proteico de *P. putida* con un suero anti-Crp de *E. coli*. Diferencia entre los perfiles de proteínas totales en LB entre cepas mutantes en el gen *crp* en *E. coli* y *P. putida*. **A.-** Electroforesis de proteínas SDS-PAGE, **B.-** Western blot. 1.- *E. coli* silvestre MC4100, 2.- *E. coli crp* mutante SBS688, 3.- *P. putida* silvestre, 4.- *P. putida crp* mutante. En la figura A se pueden observar algunas diferencias marcadas con una flecha entre los perfiles de proteínas totales entre *E. coli* silvestre y *E. coli crp* mutante. En B se observa la banda correspondiente a la proteína Crp, la cual es muy clara en el extracto correspondiente a *E. coli* silvestre y *P. putida* silvestre, pero no se visualiza en los extractos correspondientes a *E. coli crp* mutante y *P. putida crp* mutante.

Como podemos observar en la Fig. 13, el anticuerpo anti-Crp de *E. coli* detecta una banda mayoritaria en el extracto de *Pseudomonas putida* silvestre, y no aparece esta banda en el extracto proteico correspondiente a la mutante *P. putida crp*. Lo mismo ocurre en las cepas de *E. coli*. También es interesante destacar que el perfil proteico, observado en la Fig. 13 A, cambia entre las cepas mutante y silvestre de *E. coli*, pero no se observan grandes variaciones en los extractos proteicos entre las dos cepas de *Pseudomonas putida*.

Este resultado aporta una evidencia más de la homología existente entre las proteínas Crp de *E. coli* y Crp de *P. putida*. Debido a esto, decidimos

estudiar la complementación del gen *crp* de *P. putida* en *E. coli crp* y realizamos el mismo estudio para el gen *cyaA*. Los resultados se describen a continuación.

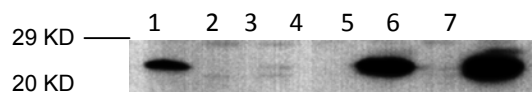
### 3.2. Estudio de complementación en *Escherichia coli*

Se sabe que el complejo cAMP-Crp de *E. coli* es necesario para la utilización de Maltosa (Raibaud *et al.*, 1991). De manera que decidimos estudiar la posible complementación de *crp* de *P. putida* en *E. coli crp* analizando la utilización de maltosa como fuente de carbono, el medio selectivo y diferencial Mc Conkey. Las cepas de *E. coli* fueron proporcionadas por *GenoBase Resource Resquet System, Nara Institute of Science and Technology* y fueron: *E. coli* K-12 BW25113 (*E. coli* wt), *E. coli* JWK3778-4 (*E. coli cya*), *E. coli* JWK5702-4 (*E. coli crp*) (ver tablas de cepas en Materiales y Métodos). Los plásmidos portadores de las proteínas de *P. putida* fueron pMZC5 que lleva el gen *cyaA* sin su promotor y pMZV7 que contiene la secuencia del gen *crp* de *P. putida* sin su promotor y con epítipo c-Myc en el extremo C-terminal.

Para comprobar la correcta expresión del epítipo c-Myc en pMZV7, se procedió a realizar un *Western blot* con anticuerpo monoclonales anti c-Myc POD. Se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  portando el plásmido pMZV7 y *E. coli* DH5 $\alpha$  portando el plásmido pVLT31 como control negativo. Los cultivos se crecieron en matraces a 37°C en LB y Tc. Cuando los cultivos habían crecido hasta una DO aproximada entre 0.45 y 0.55 a 600 nm, la expresión de las proteínas fue inducida con IPTG 0,2 mM. Las muestras fueron tomadas a las 0 h de inducción, correspondiente al momento en que se añade el IPTG, 1 y 2 h de inducción. Para obtener la misma cantidad de proteínas se recogió 1 ml de muestra a 2,5 unidades de DO a 600 nm. El volumen requerido según el crecimiento del cultivo se

## Resultados

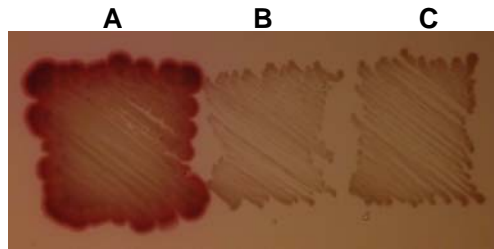
centrifugó y se resuspendió en 100  $\mu$ l de tampón de carga. El resultado se ve en la Fig. 14.



**Figura 14.** Correcta expresión del epítipo c-Myc desde pMZV7. Señal detectada con anticuerpo anti c-MycPOD. Se observa un aumento en la banda a medida que aumenta la inducción en cultivos que llevan pMZV7. No se detecta ninguna banda en el cultivo que lleva el plásmido vacío. 1.- ON pMZV7, 2.- 0 h pVLT31, 3.- 0 h pMZV7, 4.- 1 h pVLT31, 5.- 1 h pMZV7, 6.-, 2 h pVLT31, 7.- 2 h pMZV7.

Como podemos observar en la Fig. 14, existe una banda correspondiente a la proteína Crp comprendida entre 20 y 29 KD, (Crp tienen una masa de 24 kD), que se detecta con anticuerpos anti c-MycPOD. Además solo está presente en las muestras que llevan pMZV7.

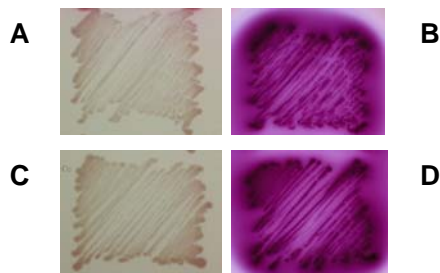
Para introducir los plásmidos pMZC5 y pMZV7 en *E. coli* se llevo a cabo el procedimiento de obtención de células competentes de *E. coli* silvestre, *E. coli crp* y *E. coli cya*. Luego, por transformación química se introdujeron los plásmidos pMZC5 y pMZV7 a *E. coli* silvestre, pMZC5 a *E. coli cya* y pMZV7 a *E. coli crp*. Finalmente se procedió a realizar los ensayos en medio Mc Conkey. Los resultados se muestran en las siguientes figuras: en primer lugar vemos en la Fig. 15 la utilización de maltosa por parte de las cepas de *E. coli*.



**Figura 15.** Visualización de la utilización de la maltosa en medio Mc Conkey. **A-** *E. coli* silvestre, **B-** *E. coli crp*, **C-** *E. coli cyaA*. La utilización de maltosa se visualiza por el color rojo. Las mutantes no pueden utilizar la maltosa y por lo tanto se observan de color blanco.

Como se muestra en la Fig. 15, cuando la bacteria es capaz de utilizar maltosa como fuente de carbono se observa un color rojo bien definido, como es el caso de la cepa silvestre. Mientras que, si la bacteria no pueden utilizar la maltosa se visualiza un color mucho más claro, como el que se observa en las mutantes *E. coli crp*, y *E coli cyaA*.

Cuando las mutantes *E. coli crp*, y *E coli cyaA* son complementadas con sus respectivos genes faltantes expresados en *trans*, se observó que recuperaron la habilidad de utilizar la maltosa, Fig. 16.

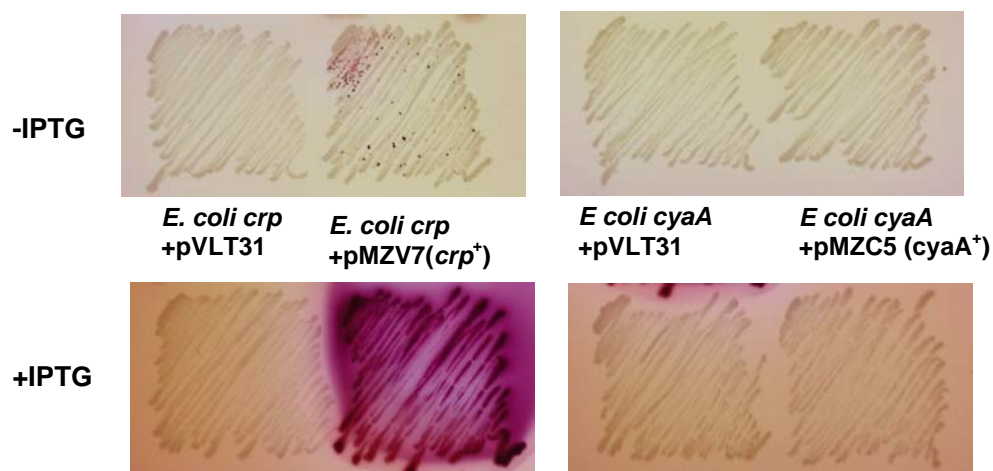


**Figura 16.** Visualización de la utilización de la maltosa en medio Mc Conkey cuando se complementan las mutantes *E. coli crp* y *E. coli cyaA* con los plásmidos pCK24Ncrp ( $Crp^+$ ) y pCK24NcyaA ( $CyaA^+$ ) respectivamente. Los plásmidos pCK24Ncrp y pCK24NcyaA llevan las secuencias codificante de estos genes y están bajo el mando del promotor pT5-lac. Llevan resistencia a Cn. **A.-** *E. coli crp*, **B.-** *E. coli crp* + Crp de *E. coli* expresada desde pCK24Ncrp **C.-** *E coli cyaA*, **D.-** *E. coli cyaA* + CyaA de *E. coli* expresada desde pCK24NcyaA.

## Resultados

Como podemos observar en la Fig. 16 cuando se expresó el gen *crp* y *cyaA* de *E. coli* en las mutantes *E. coli crp* y *E. coli cyaA* respectivamente se recuperó la habilidad de utilizar maltosa.

Procediendo de manera similar a lo anteriormente descrito, se introdujeron en las mutantes *E. coli crp* y *E. coli cyaA* las secuencias de los genes *crp* y *cyaA* de *P. putida*. El resultado se observa en la Fig. 17.



**Figura 17.** Complimentación de *E. coli crp* con Crp de *P. putida*. La utilización de maltosa queda evidenciada por el cambio de color, y es claramente positiva cuando se complementa *E. coli crp* con pMZV7, plásmido que lleva la proteína Crp de *P. putida* marcada con un epítipo c-Myc en su extremo C-terminal. No se observa metabolización de este azúcar en *E. coli cyaA* cuando se complementa con pMZC5. Este plásmido lleva la proteína *cyaA* de *P. putida*.

Como podemos observar en la Fig. 17, la proteína Crp de *P. putida* expresada desde el plásmido pMZV7 puede complementar la mutación en *E. coli crp*. La proteína CyaA de *P. putida* expresada desde pMZC5 no parece complementar la mutación en la bacteria *E. coli cyaA*.



Al comprobar que el proteína Crp de *P. putida* es capaz de complementar la utilización de maltosa en *E. coli crp*, deducimos que esta proteína quizás, podría identificar/unir las misma secuencia de unión que Crp de *E. coli*. Utilizando al herramienta bioinformática *Regulatory Sequence Analysis Tools* RSTA (RSAT <http://rsat.ulb.ac.be/rsat>), se buscaron posibles secuencias de unión de Crp en el genoma de *P. putida*.

#### 4. Búsqueda bioinformática

Utilizando la herramienta RSTA se buscaron posible secuencias de unión de Crp de *P. putida* en el genoma de *P. putida*. Para esta búsqueda se utilizó la información conocida de los sitios de unión de Crp y Vfr en el genoma de *E. coli* y *P. aeruginosa* respectivamente y se diseñaron dos secuencias consenso. La secuencia A: TGNNWWWMYMRNTCAYA y la secuencia B: TGNNNNNNNNNTCAYA. Como se puede observar la secuencia B es más permisiva al poseer más cantidad de posiciones N, las cuales corresponde a cualquiera de los 4 nucleótidos. Se realizó una primera prueba de esta búsqueda, utilizando la secuencia A en el genoma de *P. aeruginosa*. Los sitios que se encontraron en el genoma de *P. aeruginosa* se muestran en la Tabla 5. Estos sitios coinciden con secuencias previamente descritas en la bibliografía.

Tabla 5: Sitios con la secuencia consenso encontrados en el genoma de *P. aeruginosa*

	Gen	Posición	Secuencia
D	fleQ	-124 -109	aaatTGACTAATCGTTCACAttg
D	toxA	-162 -147	actcTGCAATCCAGTTCATAaatc
D	lasR	-286 -271	aaaaTGTGATCTAGATCACAttta
R	lasR	-286 -271	taaaTGTGATCTAGATCACAtttt

## Resultados

Al observar que los resultados obtenidos eran coherentes, es decir encontramos genes que ya se sabía previamente eran regulados por Vfr. Decidimos utilizar las dos secuencias en el genoma de *P. putida*. Los resultados obtenidos con la secuencia A se detallan en la Tabla 6. Los resultados obtenidos con la secuencia B se listan en la Tabla 7.

Tabla 6: Posibles sitios de unión encontrados con la secuencia restrictiva en el genoma de *P. putida*.

Gen	Posición	Secuencia	Función
D phaG	-223/-208	catgTGACTACCAAGTCACAacctg	<i>Acyltransferase</i>
R bkdR	-132/-117	acgcTGACTTACCAGTCACAagcc	<i>transcriptional regulator BkdR</i>
D bkdA1	-82/-67	acgcTGACTTACCAGTCACAagcc	<i>2-oxoisovalerate dehydrogenase, alpha subunit</i>

Tabla 7: Posibles sitios de unión encontrados con la secuencia permisiva en el genoma de *P. putida*.

	Posición	Secuencia	Función
D Sun	-242/-227	cccaTGGCCGGTGTGTCACAagcac	<i>sun protein</i>
D trpB	-395/-380	cgaatGGCGCCTCGCTCACAtcac	<i>tryptophan synthase</i>
R trpB	-299/-284	ggcgTGGCATCAAACCTCACAgatg	<i>tryptophan synthase</i>
R glcB	-153/-138	gcagTGTGCGTATTTTCACAaggcg	<i>malate synthase</i>
R rpsM	-130/-115	ggttTGAAGCGCAGATCACActca	<i>ribosomal protein S13</i>
D ctpL	-229/-214	acggTGCCGGCTTCTTCACAaggct	<i>methyl-accepting chemotaxis transducer for inorganic phosphate CtpL</i>
R hprA	-235/-220	cggcTGATTTGGCCGTCACAAttgg	<i>glycerate dehydrogenase</i>
D fruR	-243/-228	gtatGTTGTGAAATTCACAataa	<i>fructose transport system repressor FruR</i>

R fruB	-57/-42	gtatTGTTGTGAAATTCACAaaa	<i>phosphotransferase system, fructose-specific EI/HPr/EIIA components</i>
D mreD	-105/-90	cgccTGCCGCGTCCGGTCACAaccg	<i>rod shape-determining protein MreD</i>
D bfr	-132/-117	gcgtTGCAACGCGGTTCAcAaaca	<i>Bacterioferritin</i>
R argG	-301/-286	attcTGCGCTCGATCTCACAgg	<i>argininosuccinate synthase</i>
D nrdB	-69/-54	gcctTGCGTCAGGCATCACAttct	<i>ribonucleoside reductase</i>
D estB	-177/-162	ggccTGCCCTTTGCATCACAggtt	<i>carboxylesterase</i>
R aapJ	-171/-156	ggccTGCCCTTTGCATCACAggtt	<i>periplasmic, ABC transporter</i>
D phaG	-223/-208	catgTGACTACCAAGTCACAac	
R phaG	-225/-210	gggtTGACTTGGTAGTCACAatgca	<i>acyltransferase</i>
D tyrB-1	-39/-24	agcgTGTACGCCCTATCACActcc	<i>aromatic-amino-acid aminotransfers</i>
R uvrB	-261/-246	agcgTGTACGCCCTATCACActcc	<i>excinuclease ABC</i>
D chev-2	-267/-252	gcaaTGAGAATGGCGTCACAAtaa	<i>chemotaxis CheV</i>
R fabA	-116/-101	gcgtTGTGGTGAAAGTCACAagcg	<i>3-hydroxydecanoyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase</i>
D flhA	-381/-366	gcgcTGGCGAAGGTATCACAgact	<i>flagellar biosynthetic protein FlhA</i>
D glxR	-37/-22	agctTGCTTGAGATATCACAAatta	<i>2-hydroxy-3-oxopropionate reductase</i>
R bkdR	-132/-117	acgcTGACTTACCAGTCACAagcc	<i>transcriptional regulator BkdR</i>
D bkdA1	-82/-67	acgcTGACTTACCAGTCACAagcc	<i>2-oxoisovalerate dehydrogenase</i>
R argD	-205/-190	tgggTGAACGGGTGCTCACAcagg	<i>acetylornithine aminotransferase</i>
R dapB	-340/-325	tagcTGATCGGCACTTCACAgtac	<i>dihydrodipicolinate reductase</i>
D pqqF	-90/-75	gattTGCGCTGCCTTTCATAaccg	<i>coenzyme PQQ synthesis protein F</i>
R dnaG	-142/-127	gacgTGCACGTCTGGTCATAcagc	<i>DNA primase</i>
D hmpA	-170/-155	gcagTGGCTGTGTAGTCATAtgga	<i>flavo-hemoprotein</i>
D cyoups2	-109/-94	ctgtTGCTCAATAAGTCATAg	<i>cyoups2</i>
D cyoA	-371/-356	ctgtTGCTCAATAAGTCATAg	<i>cytochrome o ubiquinol oxidase,</i>

## Resultados

R	bfr	-364/-349	taacTGCAGCATCCTTCATAgatc	<i>subunit II</i> <i>bacterioferritin</i>
R	ftsQ	-305/-290	acgaTGACTTGGCGTCATAgtcg	<i>cell division protein</i> <i>FtsQ</i>
R	pfpl	-29/-14	gtgcTGATAGGCCTTTCATAaggg	<i>ThiJ/Pfpl family protein</i>
R	phaM	-179/-164	gcacTGGAGCTGTGATCATAgaaa	<i>PhaM protein</i>
R	cobM	-202/-187	tggcTGAGCAGTGGTTCATAgggt	<i>precorrin-4 C11-</i> <i>methyltransferase</i>
D	xcpT-2	-240/-225	tcgcTGATCACCTTCTCATAgtgt	<i>type II secretion</i> <i>pathway protein</i> <i>XcpTD</i>
D	argC	-81/-66	tgaaTGTATTGATCATCATAttca	<i>N-acetyl-gamma-</i> <i>glutamyl-phosphate</i> <i>reductase</i>
D	pssA-1	-94/-79	tcgtTGCCGGGTCGATCATAcacc	<i>CDP-diacylglycerol--</i> <i>serine O-</i> <i>phosphatidyltransferas</i> <i>e</i>
R	aspC	-354/-339	agggTGAAGGTGCGGTCATAgccc	<i>aspartate</i> <i>aminotransferase</i>
D	mrda-1	-161/-146	gcaaTGAACAAATCTTCATAttcc	<i>penicillin-binding</i> <i>protein2</i>
D	hicB-2	-311/-296	ggaaTGATTGACCTGTCATAgcat	<i>hicB protein</i>
D	hicA-2	-54/-39	ggaaTGATTGACCTGTCATAgcat	<i>hicA protein</i>
D	cheV-3	-291/-276	gggtTGACCTGGATTTTCATAgcgg	<i>chemotaxis protein</i> <i>CheV</i>
R	phoU	-287/-272	tactTGGATTTCAATTCATAgatc	<i>phosphate transport</i> <i>system regulatory</i> <i>protein PhoU</i>

En las Tablas 6 y 7 podemos ver que utilizando esta herramienta encontramos con la secuencia restrictiva A 3 posibles sitios de unión y 47 sitios posibles con la secuencia permisiva B. Algunos genes encontrados portadores de las posibles secuencias de unión, se involucran en la biosíntesis de aminoácidos, transporte a través del periplasma, quimiotaxis, etc. Es interesante destacar que se evidenció la presencia de un posible sitio de unión en el promotor del gen *phoU* y también en el regulador de la biosíntesis flagelar *flhA*.

## Capítulo II

### Estudio de la profundidad Funcional del gen *crp* de *P. putida*



## 1. Estudio de la Profundidad Funcional del gen *crp*

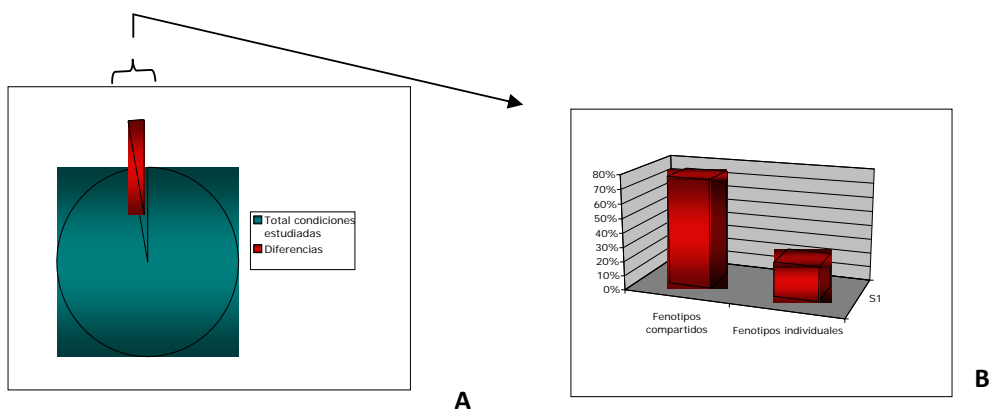
Con los resultados presentados en el Capítulo I, podemos concluir que Crp de *P. putida* es una proteína funcional en *E. coli*. Además observando en el genoma de *P. putida*, hallamos la existencia de una gran variedad de genes que presentan un probable sitio de reconocimiento de Crp. Esto nos lleva a pensar que esta proteína quizás participe en la regulación global en esta bacteria. Para abordar esta idea se decidió realizar experimentos como *Phenotype MicroArray* (PMs), ensayos de transcriptómica e inmunoprecipitación de ADN. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

### 1.1. *Phenotype microArray* (PMs)

Esta es una tecnología que se utiliza para identificar nuevas funciones de genes, estudiando un gran número de fenotipos simultáneamente (Bochner *et al.*, 2001; Bochner, 2003). Los PMs están constituidos por placas con 96 pocillos conteniendo diferentes nutrientes o inhibidores. En cada pocillo se midió la respiración celular con un indicador redox (Bochner, 2003). Esta respiración se cuantificó a través del cambio de color, que se monitorizó por el aparato OnmiLog®. Las mediciones se realizaron en forma simultánea cada 1 hora. Los resultados con todas las curvas de los 20 paneles se pueden consultar en el Anexo: Parte I. De las 2000 condiciones de cultivo estudiadas se hallaron 51 diferencias entre las mutantes y la silvestre. Considerando estas 51 condiciones como el 100% de las diferencias, las dos mutantes comparten un 75%, es decir 41 de las 51 totales (Fig. 18). Esto induce a pensar que probablemente los productos de estos dos genes, tengan una acción conjunta en el contexto celular. Cada una de las diferencias encontradas en los paneles son un “fenotipo”, es decir, aquella condición de cultivo en donde se encontró alguna diferencia, en el crecimiento entre la cepa mutante y silvestre. Los

## Resultados

fenotipos encontrados se dividieron en dos categorías: **Fenotipos ganados**: cuando la cepa mutante crecía más o mejor que la cepa silvestre, y **Fenotipos perdidos**: cuando la cepa mutante crecía menos o peor que la silvestre.



**Figura 18.** Gráfico de los resultados totales de PMs. **A-** Gráfico en donde se observa la porción de condiciones estudiadas que presentan diferencias. **B-** Gráfico de barras en donde se compara la cantidad de "fenotipos" compartidos e individuales de cada estirpe.

Los resultados obtenidos de la comparación entre *P. putida cyxA* vs *P. putida silvestre* se detallan a continuación:

- No se encontró diferencia en el crecimiento en el panel destinado al estudio del metabolismo del carbono.
- Con respecto al metabolismo del nitrógeno la mutante *P. putida cyxA* parece utilizar muchos dipéptidos y ciertos aminoácidos menos eficientemente que la cepa silvestre.
- No se encontró ninguna diferencia significativa en los paneles destinados al estudio del metabolismo de fosfatos y sulfatos, rutas de biosíntesis, estrés iónico, tolerancia osmótica y pH.
- Con respecto a la sensibilidad a compuestos químicos la mutante es mas resistente a km, neomicina, paramomicina, lo que esta



relacionado con el gen de resistencia que tiene insertado en su cromosoma.

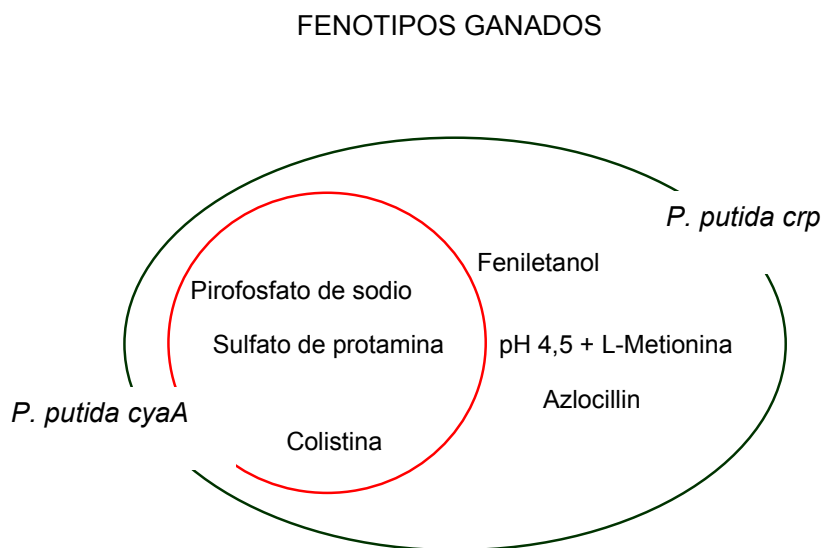
- La mutante muestra una relativa resistencia al pirofosfato de sodio y relativa sensibilidad a EGTA y a *1-hidroxy-pyridine-2-thione*. Estos agentes han sido involucrados en quelación. (Para mayor detalle ver en Anexo: Parte I y Fig.19 y 20).

Los resultados arrojados por el PMs realizados comparando el crecimiento entre *P. putida crp* vs *P. putida silvestre* se detallan a continuación:

- No se encontró diferencia en el crecimiento en los paneles dedicados al estudio del metabolismo del carbono al igual que en el caso de la mutante *P. putida cyaA*.
- Con respecto al metabolismo básico del nitrógeno la mutante parece utilizar muchos dipéptidos y ciertos aminoácidos menos eficientemente que la cepa silvestre.
- En los paneles dedicados al estudio del metabolismo de fosfatos y sulfatos, rutas de biosíntesis, estrés iónico y tolerancia osmótica no se encontró diferencia en el crecimiento entre las dos cepas.
- En el panel dedicado al estudio del estrés por pH se observó que la mutante *P. putida crp* fue levemente más resistente a pH 4.5 en presencia de L-metionina. Esto sugiere una posible decarboxilación de la metionina.
- En el panel destinado al estudio a de las diferentes sensibilidades a agentes químicos, se observó que la mutante muestra una relativa resistencia al pirofosfato de sodio y relativa sensibilidad a *1-hydroxy-pyridine-2-thione*. Estos agentes han sido involucrados en quelación. (Anexo: Parte I y Fig. 19 y 20). Para facilitar la interpretación de los

## Resultados

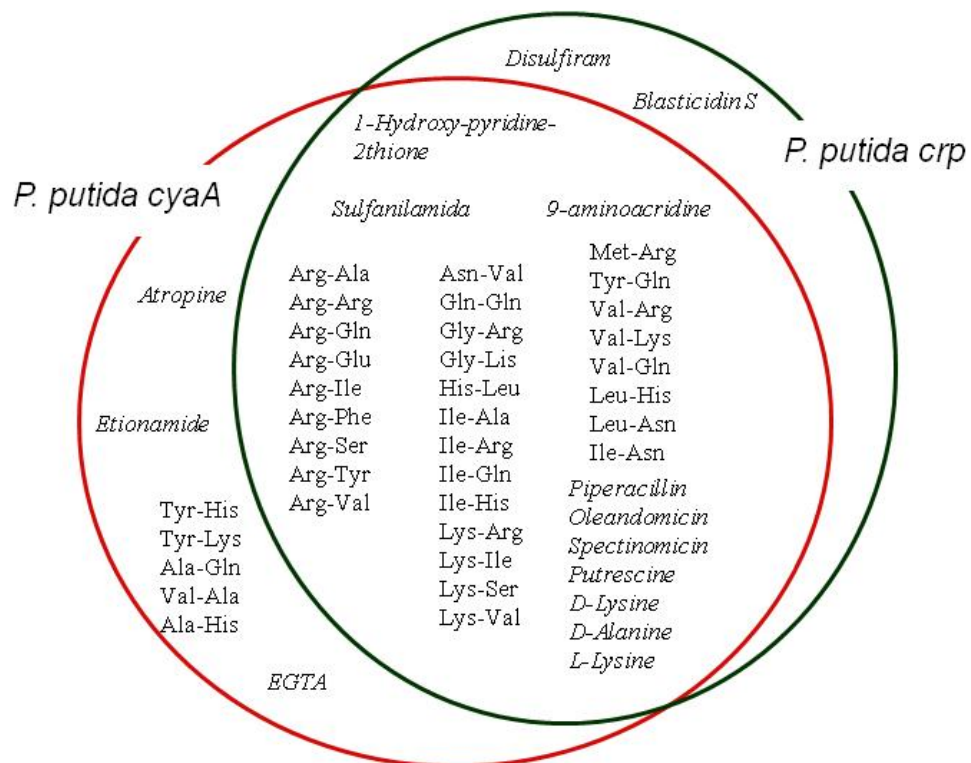
resultados, los fenotipos se presentan en gráficos de círculos. En la intersección se observan los fenotipos compartidos.



**Figura 19.** Gráfico representativo de los fenotipos ganados en PMs. Dentro del círculo verde se encierran los fenotipos ganados por la mutante *P. putida crp*. Dentro del círculo rojo se encierran los fenotipos ganados por la mutante *P. putida cyaA*.

Como podemos observar en la Fig. 19 todos los fenotipos ganados por la mutante *P. putida cyaA* están comprendidos dentro del conjunto de fenotipos ganados por *P. putida crp*. Las dos mutantes presentan resistencia a dos compuestos catiónicos como el antibiótico colistina y el sulfato de protamina. Estos efectores han sido estudiados en los paneles denominados de sensibilidad, en donde se cultiva a la bacteria en un medio rico y se la pone en contacto con el agente a estudiar. Estos compuestos catiónicos están relacionados con procesos en la membrana celular. La cepa *P. putida crp* muestra una resistencia cuando se la pone en contacto con feniletanol. Dicho compuesto también se encuentra presente en el panel de sensibilidades y su modo de acción afecta la

membrana. Otro compuesto en donde se observa una cierta resistencia por parte de la mutante es *azlocillin*, que es un análogo de la D-ala.D-ala. Finalmente en el estudio de resistencia a estrés por pH se observó un mejor crecimiento en pH 4.5+ L-Metionina, lo que podría sugerir una posible descarboxilación de la misma (Anexo: Parte I). Los fenotipos perdidos también se han representado en forma de gráfico de círculos, lo podemos ver en la Fig. 20.



**Figura 20.** Gráfico representativo de los fenotipos perdidos en PMs. Dentro del círculo verde se encierran los fenotipos perdidos por la mutante *P. putida crp*. Dentro del círculo rojo se encierran los fenotipos perdidos por la mutante *P. putida cyaA*.

En la Fig. 20 podemos observar que la mayoría de los fenotipos perdidos son compartidos por ambas mutantes. Los fenotipos perdidos son mucho más que los ganados. Observamos que las dos mutantes pierden la capacidad de utilizar muchos dipéptidos de aminoácidos como fuentes de nitrógeno, esto se observa en los paneles 6, 7 y 8, comprendidos en el

## Resultados

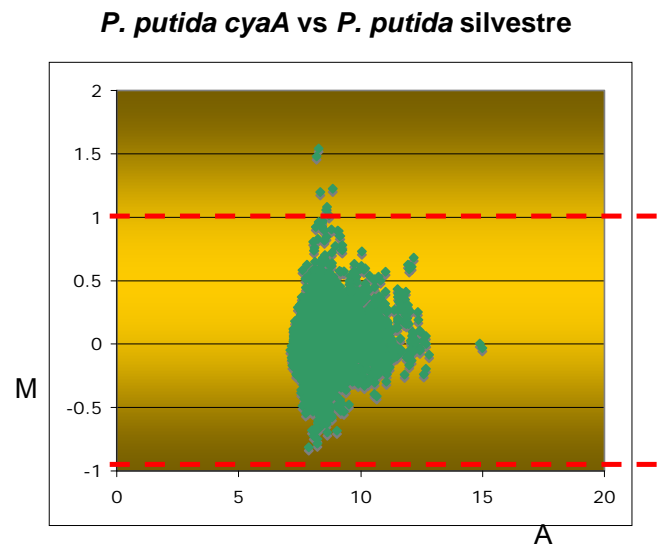
estudio del metabolismo adicional del nitrógeno. Aunque también aparecen diferencias en el panel 3, destinado al estudio del metabolismo básico del nitrógeno. Se observó una diferencia en el crecimiento con D y L-Lysina, D-Alanina y Putresina. También se observó sensibilidad a Hidroxipiridina, el cual es un compuesto quelante lipofílico (Anexo: Parte I).

### 1.2. Ensayo de transcriptómica, MicroChip de ADN

Los cultivos bacterianos se crecieron hasta un DO de 1 en medio con triptona 10 gr/l y CINA 5 gr/l, con agitación suave a 30°C. Una vez alcanzada esa DO se tomó la muestra de ARN como se describe en Materiales y Métodos. Se tomaron tres muestras procedentes de tres experimentos realizados en forma independiente. De esta manera se puede calcular un valor estadístico de confiabilidad denominado valor P. El valor P que hemos utilizado ha sido entre 0.05 y 0.10, esto indica que se puede esperar como máximo un 5 o 10% de falsos positivos respectivamente. Cada punto en el gráfico representa un elemento del MicroChip y cada punto está definido por un valor M y un valor A. Los valores M (eje de ordenada) se expresan en logaritmo en base 2 y representan la expresión diferencial así, valores positivos indican inducción en el experimento respecto del control y valores negativos indican represión en el experimento respecto del control. Los valores A (eje de abscisa) también expresados en escala logarítmica, indican la intensidad de los puntos. Los genes seleccionados como diferencialmente expresados, fueron aquellos que mostraban un valor  $-1 \leq M \leq 1$ .

Los resultados de expresión de *P. putida cyaA* vs *P. putida silvestre* se observan en la Fig. 21. Como podemos observar en el gráfico de puntos, la mayoría de los valores de M están comprendidos entre +1 y -1, solo

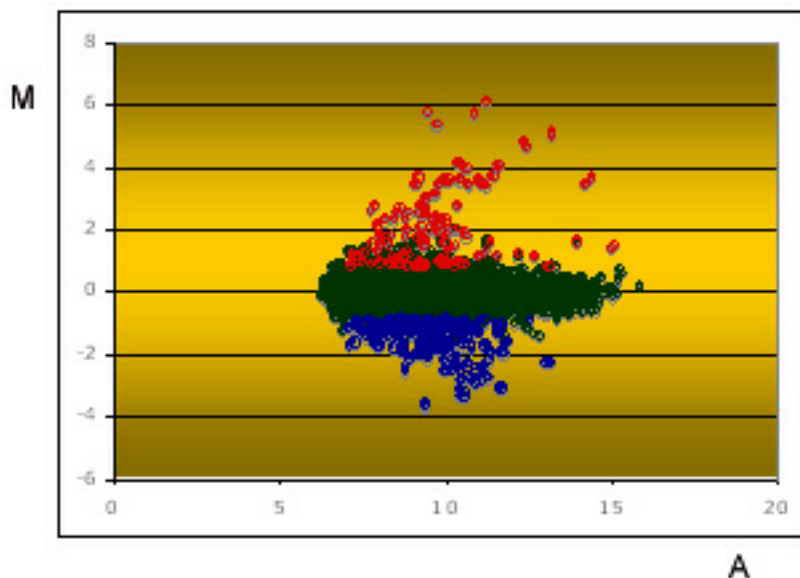
hay pocos valores con un M mayor que uno, pero estos valores los hemos desestimado ya que solo se observa este aumento en 1 de los dos pocillos que existen en el MicroChip para cada gen. Solo hay un gen: PP0388 ADN primasa que presenta un M =1. (Ver Anexo: Parte II para más detalle)



**Figura 21.** Gráfico en donde se representa la expresión diferencial de genes entre *P. putida cyaA* y la cepa silvestre *P. putida* MAD1. **M** representa la diferencia de expresión y **A** representa la intensidad. Las líneas rojas resaltan los valores +1 y -1 de M.

La expresión diferencial resultado de la comparación entre la cepa mutante *P. putida crp* vs *P. putida* silvestre se representan gráficamente en la Fig. 22. Cada punto se detalla en el Anexo: Parte II. Se han tenido en cuenta los genes que presentaban un valor P menor que 0.05, y además que el resultado se repita en los dos pocillos que representan a cada gen en el MicroChip.

## Resultados



**Figura 22.** Gráfico representado la expresión diferencial entre la cepas *P. putida crp* y la cepa *P. putida* silvestre. M: diferencia de expresión. A: intensidad. Los puntos verdes oscuro representan los genes de la cepa mutante que no han cambiado su expresión respecto al control. Los puntos rojos representan los genes que poseen un M mayor o igual a 1 e indican inducción en el experimento respecto al control. Los puntos azules representan los genes que poseen un M menor o igual a -1 e indican represión en el experimento respecto al control

Como observamos en la Fig. 22 existen una gran cantidad de genes que varían su expresión (en el Anexo: Parte II se pueden ver en detalle). Se observaron 47 genes que han sido inducidos y 92 genes que han sido reprimidos en la cepa mutante respecto a la cepa control. Entre los genes más inducidos se encuentran, entre otras, dos proteínas involucradas en el transporte del fosfato: PP2656 (*phosphatase ABC transporter periplasmic phosphate bind*) con un valor M de 5.9 y PP2669 (*phosphate ABC trnasporter permease protein*) con un valor M de 4.15. Curiosamente observamos inducción en los genes reguladores del transporte de fosfatos *phoU* y *phoB*. Con respecto a los genes reprimidos, observamos que el gen PP1059 M= -3.5 (*amino acid premease*) posee uno de los valores de

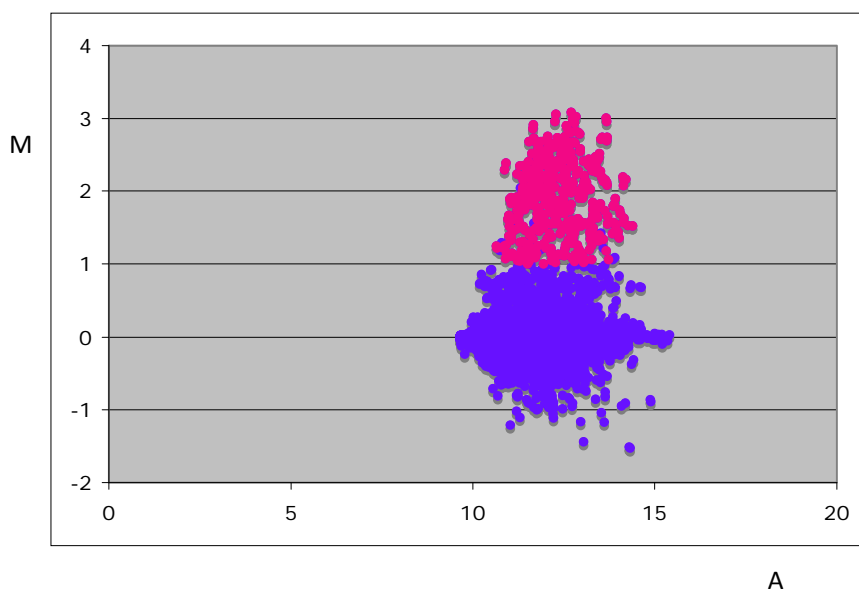
M más bajos. También se encontró entre los genes reprimidos, el gen PP1019 M= -2.76 (*porin B*) (Estos son solo dos ejemplos, para una información en detalle consultar el Anexo: Parte II).

### **1.3. Combinación de inmunoprecipitación de ADN y MicroChip de ADN (*ChIP to Chip*)**

Para realizar la inmunoprecipitación se puso a punto un protocolo, que se detalla en Materiales y Métodos. El ADN obtenido al inmunoprecipitar los complejos Crp/ADN, desde un cultivo de *P. putida crp* que llevaba el plásmido pMZV7; fue contrastado con el ADN inmunoprecipitado desde un cultivo *P. putida crp* que llevaba el plásmido pVLT31. La cantidad de ADN obtenida en la muestra que procedía del cultivo que llevaba el plásmido pMZV7, siempre fue el doble que la obtenida del cultivo que llevaba pVLT31. Se realizaron tres experimentos independientes y todos los datos que se manejaron tienen un valor P menor que 0.05.

En la Fig. 23 se observa un gráfico en donde se representan los puntos del MicroChip de ADN. Aquellos valores que presentan un  $M \geq 1$  son los que están presentes en la muestra que llevaba la proteína. Los genes con un valor M entre  $-1 \leq M \leq 1$ , son los genes que se encuentran en las dos muestras. En este experimento los genes que presentan un valor de  $M \leq -1$  indican los genes presentes en la muestra que lleva el pVLT31. Como podemos observar en la Fig. 23, casi no hay genes que tengan un M con este valor. Este resultado concuerda con la cantidad de ADN inmunoprecipitado en la muestra con la proteína.

## Resultados



**Figura 23.** Distribución de los puntos obtenidos en ChIP to CHIP de acuerdo a su valor de M y A. M indica la diferencia de expresión y A indica la intensidad.

Como podemos observar en la Fig. 23 los puntos que presentan un M mayor que 1 son los genes candidatos a ser regulados por Crp. El resultado arrojado por este estudio ha puesto en evidencia 221 Orfs que han sido inmunoprecipitadas unidas a la proteína Crp. Encontramos 123 proteínas hipotéticas y el resto se encuentran involucradas en procesos celulares como por ejemplo: funciones reguladoras, proteínas de interacción con ADN, genes involucrados en el transporte y la unión de otras proteínas. Una gran cantidad de Orfs inmunoprecipitadas han sido involucradas en procesos de la envuelta celular, biosíntesis y degradación de peptidoglucano, biosíntesis y degradación de lipopolisacárido. En el Anexo: Parte III se detallan todas las Orfs y en la Tabla 8 se muestra un resumen.

En la siguiente Tabla se han resumido los resultados de todos los estudios globales realizados en este capítulo, destacando los genes que



han sido identificados en más de un estudio. Estos genes se convierten en buenos candidatos para ser regulados por la proteína Crp.

Tabla 8: resumen de genes presentes en los estudios globales Phenotypic MicroArray PMs, Inmunoprecipitación y MicroChip de ADN (*CHIP to CHIP*), ensayo de transcriptómica y Búsqueda bioinformática (RSTA).

PMs	<i>CHIP to CHIP</i>	Transcriptómica	RSTA
Resistencia a Azlocillin: dAla-dAlan análogo	ddlA, d-alannian.d-alanina ligasa		
Resistencia a Colistina		pp3801, transportador de cationes periplásmico	
Dificultad para utilizar dipeptidos de aa		Reprimidos permeasa de aa pp4756,pp1059,pp3559	
		Inducidos genes relacionados con el transporte de Fosfatos: <i>phoU,phoB</i> , pp2656, pp5329, pp2658, pp2657, pp2654, pp5326	<i>phoU</i>
	pp4350, aminotrasferasa	Reprimida pp4350, aminotrasferasa	
	pp0374, proteína hipotética	Reprimida pp0374, proteína hipotética	
	pp1938, proteína hipotética	Reprimida pp1938, proteína hipotética	
	pp1941, proteína hipotética	Reprimida pp1941, proteína hipotética	
	pp1946, proteína hipotética	Reprimida pp1946, proteína hipotética	
	pp1960, proteína hipotética	Reprimida pp1960, proteína hipotética	
	pp3468, proteína	Reprimida pp3468, proteína	

## Resultados

hipotética	hipotética
pp3677, proteína hipotética	Reprimida pp3677, proteína hipotética
pp3782, proteína hipotética	Reprimida pp3782, proteína hipotética
pp4434, proteína hipotética	Reprimida pp4434, proteína hipotética
pp4435, proteína hipotética	Reprimida pp4435, proteína hipotética
pp4462, proteína hipotética	Reprimida pp4462, proteína hipotética
pp1110, biosíntesis de serina	Inducida pp1110, biosíntesis de serina
pp4350 aminotransferasa	Reprimida pp4350 aminotransferasa
pp4460, regulado LysR	Reprimido pp4460, regulado LysR
	Inducido <i>fliS</i> , biosíntesis flagelar
pp4345 /pp4344 <i>flhA</i>	<i>flhA</i>

En la Tabla 8 podemos observar que hay muchos genes que están presentes en dos estudios, lo que los convierte en posibles genes a ser regulados por Crp en la bacteria *P. putida*. También es notorio que las funciones de los genes encontrados en todos estos estudios globales, tienen alguna relación con la envuelta celular, lo que podría indicar que la proteína Crp sería un regulador a nivel de la superficie celular.

## Capítulo III

### Caracterización de fenotipos singulares en las mutantes *P. putida crp* y *P. putida cyaA*



De los estudios globales desarrollados en el Capítulo 2, podemos vincular a la proteína Crp con funciones relacionadas a la superficie celular. Utilizando ésta información se decidió estudiar fenotipos/funciones en concreto.

### **1. Crecimiento**

Se realizaron curvas de crecimiento en LB y medio mínimo. También se realizaron curvas de crecimiento utilizando diferentes fuentes de carbono. Al igual que en los ensayos de PMs, no se encontró diferencias en el crecimiento entre las cepas mutantes *P. putida crp* y *P. putida* silvestre.

### **2. Resistencia/Sensibilidad**

Del estudio de PMs se seleccionaron algunos resultados para estudiar el comportamiento en el laboratorio.

#### **2.1. Resistencia al Pirofosfato de sodio $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_3$**

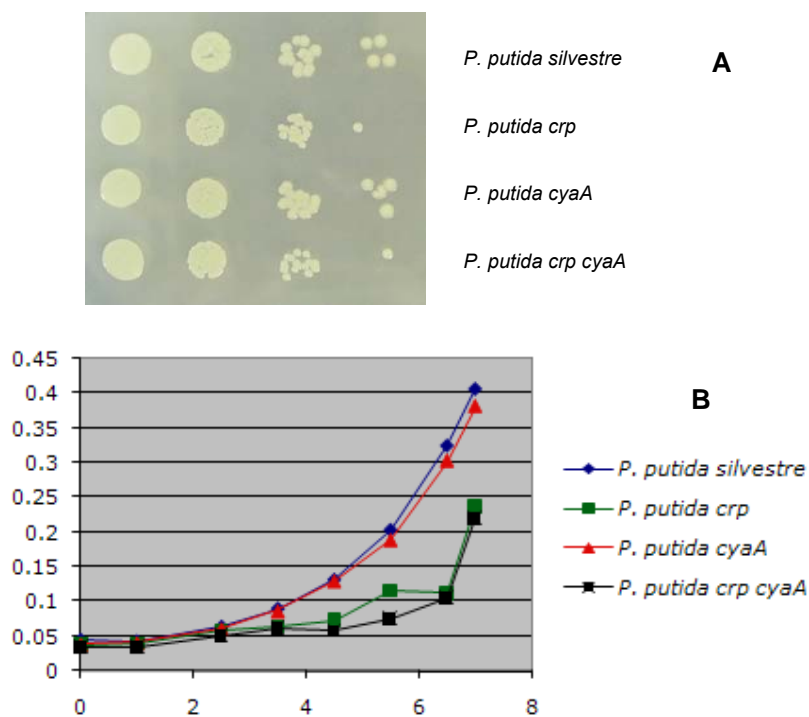
Este compuesto se usa en la industria alimenticia para aumentar la sensibilidad a la temperatura de bacterias patógenas como la *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. La concentración utilizada en la industria alimentaria oscila entre 0 y 0.01 M. En el estudio de PMs se utilizó entre 0,015 y 0,037 M. Nosotros realizamos ensayos de dilución en placa y curvas de crecimiento. No hemos encontrado diferencias en el crecimiento en condiciones de laboratorio.

#### **2.2. Sensibilidad a 9-aminoacridina**

Este compuesto se usa clínicamente como antiséptico y experimentalmente como mutagénico ya que interacciona con el ADN. Se realizaron estudios de dilución en placa y curva de crecimiento como se

## Resultados

puede observa en la Fig. 24. La concentración utilizada fue de 200 mM de 9-aminoacridina.



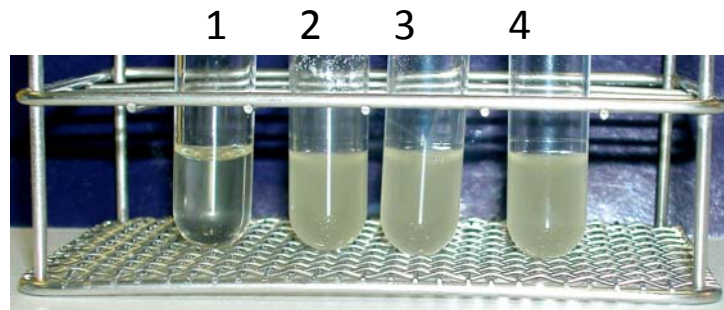
**Figura 24.** Sensibilidad de las cepas *P. putida crp* y *P. putida crp cyaA* a 9-aminoacridina. **A-** ensayo de dilución en placa, **B-** curva de crecimiento. En los 2 estudios se utiliza 200 mM de 9-aminoacridina.

En la Fig. 24 podemos observar que *P. putida crp* y *P. putida crp cyaA* presentan una mayor sensibilidad a 9-aminoacridina. Este fenómeno se observa tanto en dilución en placa como en la curva de crecimiento.

### 2.3. Resistencia a colistina

La colistina es un antibiótico que pertenece al grupo denominado de las polimixinas. Son polipéptidos catiónicos y básicos. Actúan solamente sobre las bacterias Gram Negativas. Se comportan como detergentes catiónicos, desorganizando la superficie de la membrana celular y modificando sus propiedades osmóticas. De esta manera alteran la

barrera de permeabilidad selectiva. Es un antibiótico utilizado en microbiología clínica por su excelente actividad frente a microorganismos multiresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Para estudiar la resistencia a este antibiótico en nuestras mutantes, se utilizaron métodos como: *E-test*, ensayos de micro dilución en tubo y placa y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Hay que recalcar que el resultado era variable, en un ensayo se observaba resistencia a una concentración y en la repetición ya no. Podemos ver en la Fig. 25 que todas las mutantes son resistentes a la colistina en una concentración de 1 µl/ml. Pero este resultado no siempre se reproducía. Se pudo advertir una influencia de las condiciones de cultivo, (cantidad de medio, agitación, temperatura) en la resistencia a colistina por parte de las mutantes.

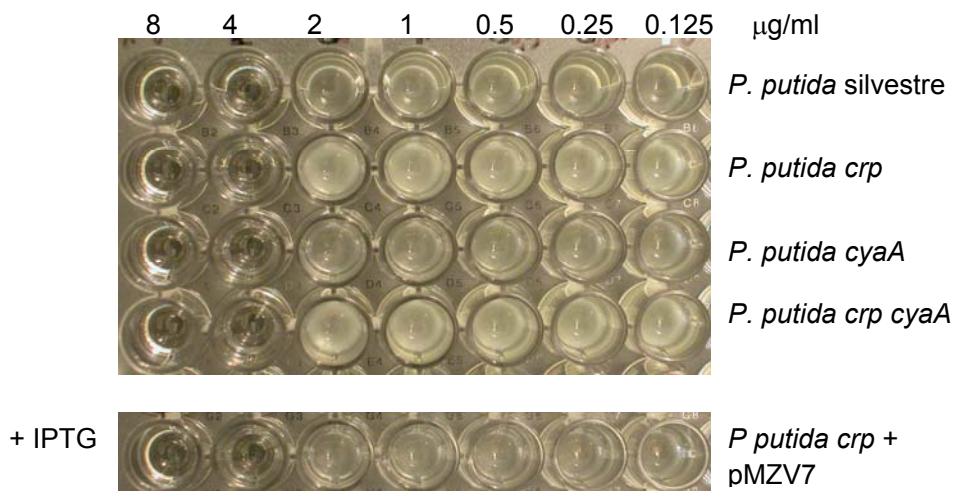


**Figura 25.** Ensayo de dilución en tubo, las estirpes mutantes crecen mejor que la estirpe silvestre en presencia de colistina 1 µl/ml de colistina. 1- *P. putida* silvestre, 2- *P. putida crp*, 3- *P. putida cyaA*, 4- *P. putida crp cyaA*.

El resultado era poco reproducible, pero siempre se observó resistencia por parte de la mutante *P. putida crp* y *P. putida crp cyaA* doble mutante, con respecto a la cepa silvestre. La mutante *P. putida cyaA* muchas veces se comportaba como la cepa silvestre.

## Resultados

Decidimos realizar el ensayo estandarizado para determinar la concentración mínima inhibitoria. En la Fig. 26 se muestra los resultados obtenidos.



**Figura 26.** CMI antibiótico colistina. Se observa una mayor resistencia en las estirpes *P. putida crp* y *P. putida crp cyaA*. La expresión de Crp desde pMZV7 restaura la sensibilidad a colistina. Placa M-H con diferentes concentraciones de Colistina y siempre la misma cantidad de bacterias.

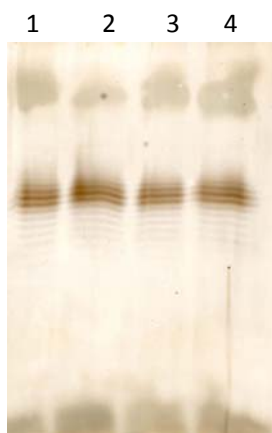
En la Fig. 26 podemos observar que la mutante *P. putida crp* y *P. putida crp cyaA* son mas resistentes a colistina. El punto de corte es 2 µg/ml. También observamos que cuando se expresó el gen *crp* desde el plásmido pMZV7 se recuperó la sensibilidad a colistina. Este resultado fue reproducible en todos los ensayos realizados de CMI. No observamos resistencia en la mutante *P. putida cyaA*. Con respecto al punto de corte indicado para diferenciar a una cepa entre resistente o sensible, es un tema que no esta totalmente claro. En la actualidad no existen estándares publicados por el *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS). Existe una referencia en *Acinetobacter baumannii*, en donde se considera una cepa sensible cuando tienen una CMI menor que 1 µg/ml y resistente cuando tienen una CMI mayor que 4 µg/ml. Según estos



parámetros *P. putida crp* estaría ubicada en el medio de los valores y no se podría considerar resistente, lo que está claro es que resiste más que la cepa silvestre.

### 2.3.1. Visualización de Lipopolisacáridos (LPS)

La resistencia a colistina puede estar mediada por una modificación en el grupo fosfato del core del lípido A del LPS (Kim *et al.*, 2003). Al observar que la resistencia a colistina se mantenía, decidimos realizar un ensayo para observar si el perfil de lipopolisacáridos estaba modificado en la mutante *P. putida crp*. Realizamos una extracción de LPS y luego los visualizamos con una tinción con plata como se detalla en Materiales y Métodos. El resultado se observa en la Fig. 27.



**Figura 27.** Electroforesis mostrando el perfil de LPS, teñido con Nitrato de plata. No vemos diferencia en el perfil de LPS entre las cepas en estudio. 1.- *P. putida* silvestre, 2.- *P. putida crp*, 3.- *P. putida cyaA*, 4.- *P. putida crp cyaA*.

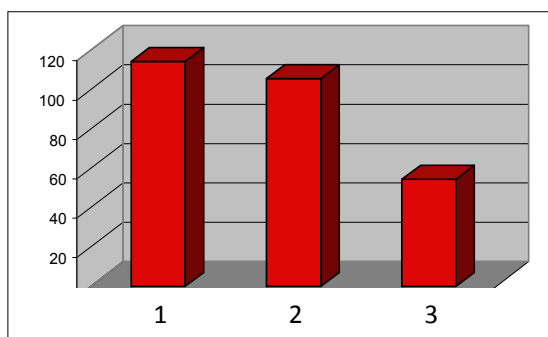
En la Fig. 27 podemos observar que no hay diferencia en el perfil de LPS entre las bacterias.

### 3. Medición de la concentración de cAMP

Los cultivos se crecieron a 30 °C hasta alcanzar exactamente la DO de 1, en este punto se tomó 1 ml. Se centrifugó y las células fueron lavadas 4 veces con PBS1X, seguidamente se centrifugó 5 minutos a 10.000 rpm y

## Resultados

las células fueron resuspendidas en 500  $\mu$ l de PBS 1X, luego se procedió a sonicar por 5 minutos en intervalos de 30 segundos, se centrifugó y el sobrenadante fue lo que se utilizó para medir el cAMP. Se utilizó el *Kit cAMP Enzyme immunoassay Biotrak Amersham*, en dónde se detecta el cAMP por inmunodetección. Observamos el resultado en la Fig. 28

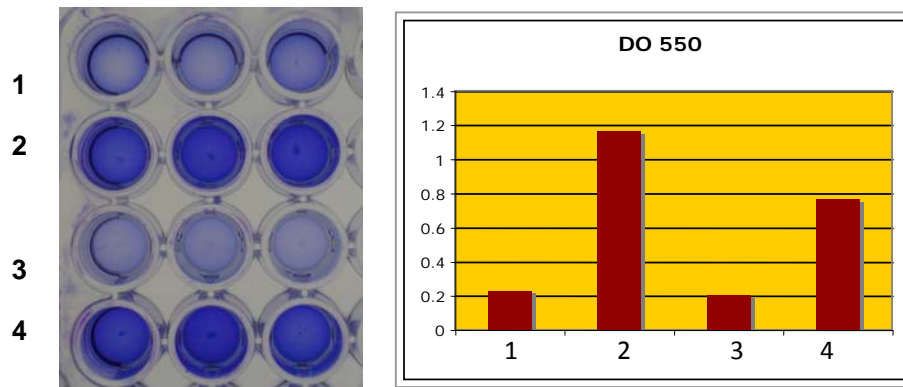


**Figura 28.** Medición de cantidad de cAMP. En este gráfico se representa la cantidad de cAMP en fMol cAMP/10<sup>8</sup> células de cada una de las estirpes en estudio. 1- *P. putida* silvestre, 2- *P. putida crp*, 3- *P. putida cyaA*. En este ensayo podemos observar que la cantidad de cAMP en la cepa mutante en el gen *cyaA* es menor que en las otras dos cepas.

Como podemos observar en la Fig. 28 la cantidad de cAMP en la estirpe *P. putida cyaA* es menor en comparación con las cepa silvestre y la cepa *P. putida crp*. Este es un resultado preliminar, ya que faltan controles pero da una idea de la funcionalidad del gen *cyaA*.

## 4. Ensayos de producción de biofilm experimental

Para estudiar la producción de biofilm se utilizó el método descrito en (O'Toole and Kolter, 1998) En donde la producción de biofilm se evidencia por la habilidad para retener el colorante Cristal Violeta. Los resultados se observan en la Fig. 29.



**Figura 29.** Ensayo de visualización de *biofilm* mediante Cristal Violeta. Se observa una fotografía de la placa en donde se incubaron las bacterias y el color se cuantificó mediante espectrofotometría a 550 nm. Podemos observar que la cantidad de biofilm es mucho mayor en las cepas *P. putida crp* y *P. putida crp cyaA*. 1.- *P. putida silvestre* 2.- *P. putida crp* 3.- *P. putida cyaA* 4.- *P. putida crp cyaA*.

Se observa que la producción de *biofilm* es mayor en la mutante *P. putida crp* y *P. putida crp cyaA*, lo que se evidencia en la retención de mayor cantidad de colorante.

## 5. Ensayos de Movilidad

Los ensayos de movilidad se realizaron según el protocolo descrito en (Rashid and Kornberg, 2000). Las placas se inocularon con palillo, desde una placa LB agar 1,5% crecida el día anterior. Las placas se incubaron a 30°C durante 20 h. No se observó diferencia en *swarming* ni en *twitching*, pero en *swimming* se observa que las mutantes y la doble mutante “se mueven” mucho más que la silvestre (Fig. 30).

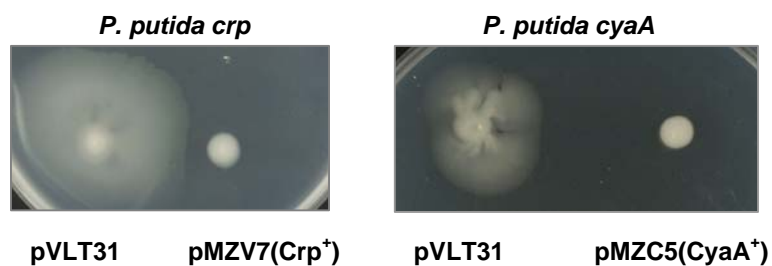
## Resultados



**Figura 30.** Movilidad *Swimming* en *P. putida*. Podemos ver el gran crecimiento en diámetro de las colonias de *P. putida cyaA*, *P. putida crp* y *P. putida crp cyaA* debido al movimiento de nado.

Como observamos en la Fig. 30, los mutantes y el doble mutante se desplazan mucho más que la cepa silvestre. El medio utilizado contiene 0.3% de agarosa especialmente diseñado para observar movimientos de translocación a modo de nado.

Se decidió complementar con las proteínas Crp desde pMZV7, y CyaA desde pMZC5. El resultado se observa en la Fig. 31.



**Figura 31.** Complementación de *P. putida crp* y *P. putida cyaA*. Las placas fueron inoculadas de la misma manera que las del ensayo de motilidad y llevan Tc 5 $\mu$ g/ml para mantenimiento del plásmido y 1 mM de IPTG para inducir la expresión de las proteínas.

Como podemos observar en la figura 31, cuando se expresó la proteína Crp desde el plásmido inducible por IPTG pMZV7, se observó que se volvía al fenotipo silvestre. Lo mismo se vio en la mutante *P. putida cyaA* cuando se expresaba el plásmido pMZC5. Este resultado indica una participación de las proteínas Crp y CyaA de *P putida* en la movilidad *swimming*.

Existen evidencias de que en la motilidad *swimming* está involucrado el flagelo (Henrichsen, 1972), por esto decidimos observar el flagelo en las bacterias en estudio.

### 5.1. Visualización de flagelo

El método de tinción utilizado se describe en (Mayfield and Inniss, 1977). Se contaron 100 bacterias en cada caso y se calculó el porcentaje de bacterias que presentaban “flagelos atípicos” como se muestra en la Fig. 32 y se expresan los porcentajes en la Tabla 9.

Tabla 9: Recuento de bacterias con flagelos atípicos.

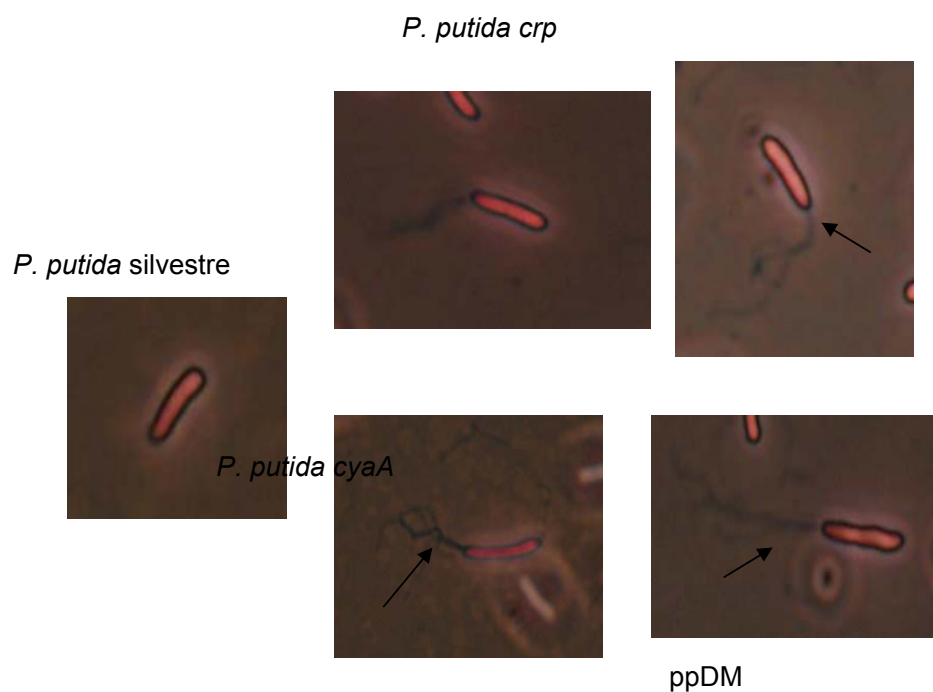
<i>P. putida</i> silvestre	8% de bacterias con flagelos atípicos
<i>P. putida crp</i>	57% de bacterias con flagelos atípicos
<i>P. putida cyaA</i>	44% de bacterias con flagelos atípicos
<i>P. putida crp cyaA</i>	46% de bacterias con flagelos atípicos

Estos datos son de un cultivo ON. Cuando se complementaron las mutantes con sus respectivas proteínas expresadas desde pMZV7 y pMZC5 se observó la recuperación del fenotipo silvestre. En la siguiente Tabla se observan los resultados

## Resultados

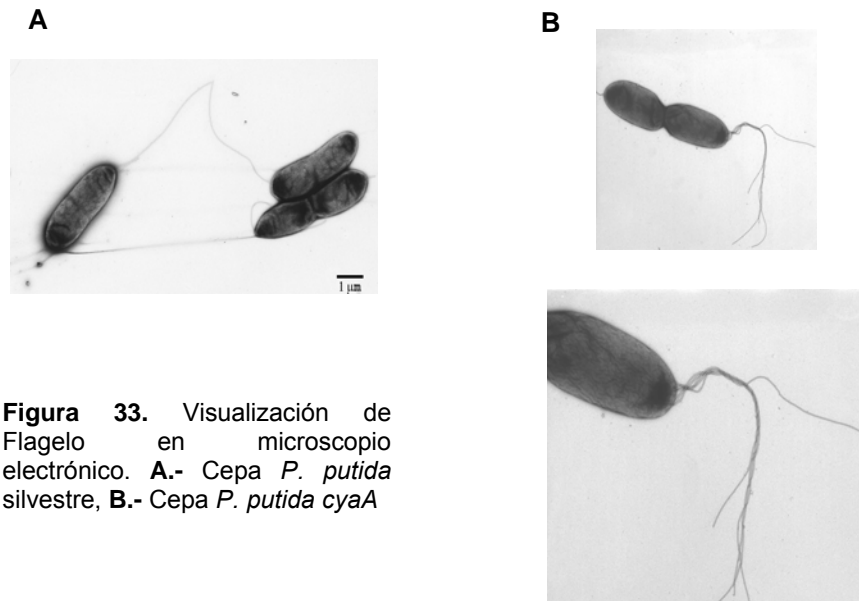
Tabla 10: Recuento luego de la complementación

<i>P. putida crp</i> + pMZV7	16% de bacterias con flagelos atípicos
<i>P. putida cyaA</i> + pMZC5	12% de bacterias con flagelos atípicos



**Figura 32.** Visualización de flagelo en microscopio óptico. Se utilizó ácido tánico como mordiente y se tiñó con cristal violeta. Las flechas negras indican los flagelos atípicos a modo de “penachos” presentes en las cepas mutantes.

Para una mejor observación se utilizó el microscopio electrónico, ver Fig. 33.



**Figura 33.** Visualización de Flagelo en microscopio electrónico. **A.-** Cepa *P. putida* silvestre, **B.-** Cepa *P. putida cyaA*

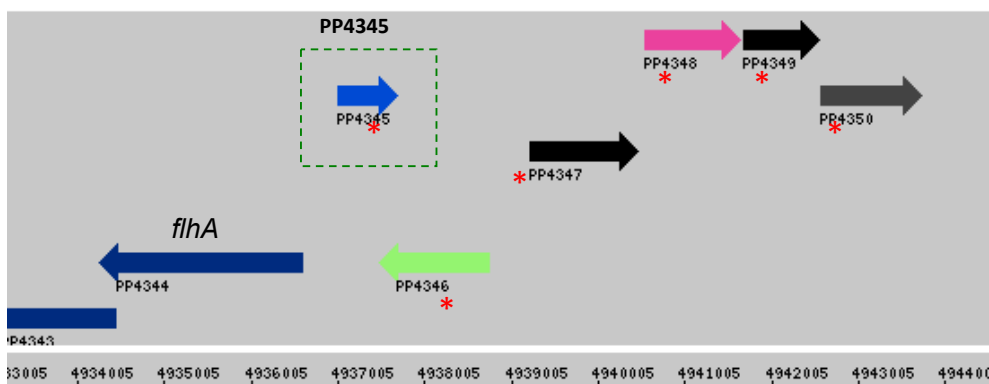
Mediante observación a los microscopios óptico y electrónico, se vio que las mutantes *P. putida crp* y *P. putida cyaA* y *P. putida crp cyaA*, presentan un alto porcentaje de bacterias con estructuras flagelares fuera de lo normal (con aspecto de penachos). Tanto en cultivos ON como en cultivos creciendo a DO 0.5 el porcentaje de bacterias con penachos se ve reducido en las mutantes cuando se expresan las proteínas que complementan la mutación. De esta manera este resultado podría indicar que *crp* y *cyaA* en *P. putida* conseguirían tener algún papel en el normal desarrollo del flagelo.

## 6. Interacción entre Crp y la región promotora del gen *flhA*

Muchos resultados presentados en el trabajo hasta el momento, relacionan a Crp con la motilidad. Por ejemplo, encontramos un aumento de motilidad en la mutante, claramente visible (Fig. 30). Podemos observar también una alteración del normal aspecto de flagelo (Fig. 32 y 33). En la búsqueda bioinformática se evidenció un posible sitio de unión

## Resultados

en la región promotora del gen *flhA* ggcTGGCGAAGGTATCACAgact (-381/-366). Mediante CHIP to CHIP, fue inmunoprecipitada la Orf PP4345, que se encuentra contigua al gen *flhA*. En la Fig. 34 podemos ver la ubicación en el cromosoma de la Orf PP4345.



**Figura 34:** Localización en el cromosoma de la Orf PP4345 y *flhA*. Todas las Orfs con \* fueron inmunoprecipitadas

Decidimos estudiar si existía una interacción directa entre el fragmento que se encuentra entre las Orfs PP4344 (*flhA*) y PP4345 (*transcriptional regulator, GntR family*).

### 6.1. Amplificación y clonación del fragmento entre las Orfs PP4344 y PP4345, fragmento REPO

Con Oligos REPO.R y REPO.F se amplificó desde el cromosoma un fragmento de 482 pb con sitios de restricción a los lados, hacia 5' *EcoRI* y *KpnI* y hacia 3' *PstI* y *BamHI*. Este fragmento fue clonado en un pUC19 y secuenciado. Seguidamente en la Fig. 35 se muestra toda la secuencia REPO y se destaca el posible sitio de unión de Crp.



*flhA*

~~gtcgaattccgggtacc~~CTGAGTGCGATCCACCGCGAGTCCTCTTGATGCAAACTTT  
 GACGCCAGGGGGCGCCTGGGCGTGGCTTTGCAAGAAGCTTTCCAACCTTGG  
 CAGACACCCACACGAAAAGATGAACCGGGCGAGCACCACCGCGTTGACGGGT  
 GGCTCATGAGCAAGCAATCACCAAGAAAAACGAGACCTCCCGCCCAATCGCC  
 TCTACGGCAATGGCCAAAGGCTTAAGCTCTTGGAAAGCCACAGAGAGGGTGG  
 CGCCACGACAAAAAAATCTGAGCGACTTGATCATGCAAAAGCTCACGGTTTC  
 TATGCGGATGTAGAGAGCCAATGACTACTCAAAGGCATGAACATCATGCCAA  
 CTGCTCGATGGTAGCTCTAGTGAGTCTGTGATACCTTCGCCA GCGCTTTTGACT  
 ACATCGCTAGACCCGGAGAACATGGTGGCGAACTCTCTCGAaaactgcagcccggtat  
 cccg

PP4345

**Figura 35.** Región promotora REPO entre las Orfs PP4344 y PP 4345. Se resalta el posible sitio de unión detectado en RSTA y la dirección de los genes contiguos a la región REPO.

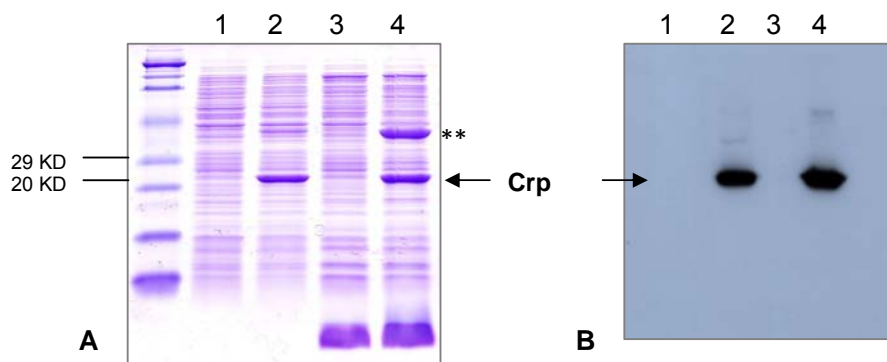
## 6.2. Enriquecimiento en la proteína Crp

A partir de un cultivo de *P. putida crp* llevando el plásmido pMZV7, se procedió a enriquecer en la proteína Crp. Para esto se incubaron dos cultivos uno que llevaba la proteína Crp (*P. putida crp* + pMZV7) y otro que no la llevaba Crp (*P. putida crp* + pVLT31), en un medio LB, Tc, a 30 °C. Cuando los cultivos alcanzaron una DO de 0.3 a 600nm se agregó 1 mM de IPTG, luego de 4 hs, las células fueron cosechadas centrifugándolas y se resuspendieron en 10 ml de PBS 1X más 1 pastilla de inhibidor de proteasa (Roche), se mezcló bien y se sonicó durante 6 minutos en intervalos de 20 segundos. Finalmente se centrifugó 30 minutos a 11.000 rpm. Al sobrenadante se le agregó polietilenimina al 0.3% para precipitar todos los ácidos nucleicos. Luego se centrifugó y se procedió a realizar una precipitación por salado con sulfato de amonio.

**Precipitación salina.** En primer lugar se realizó una prueba con concentraciones crecientes de sulfato de amonio, desde 30% hasta 70%, y se observó, mediante SDS-PAGE y *western blot*, que a 60 % precipitaba

## Resultados

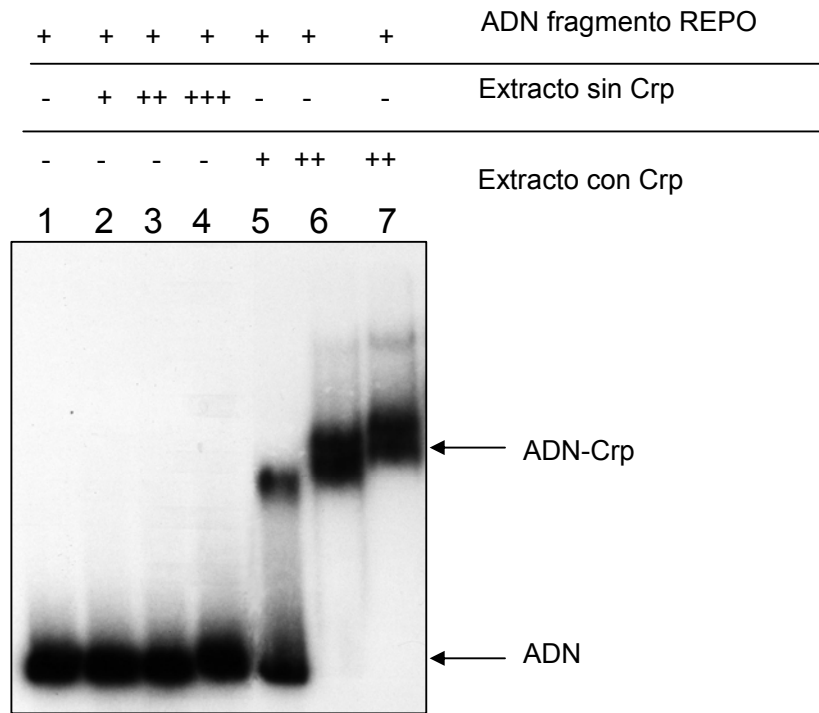
la mayoría de la proteína Crp. Finalmente se dializó contra PBS1X con agitación constante durante toda la noche a 4 °C. En la Fig. 36 podemos observar el extracto enriquecido en Crp.



**Figura 36.** Visualización de la banda mayoritaria correspondiente a la proteína Crp. **A.-** SDS PAGE teñido con coomassie. **B.-** *Western blot* con anti c-Myc. **1.-** Extracto total sin Crp, **2.-** Extracto total con Crp **3.-** Extracto sin Crp después del tratamiento con polietilenimina y precipitación por salado, **4.-** Extracto con Crp después del tratamiento con polietilenimina y precipitación por salado. \*\* Represor Lac co-precipitado con Crp.

Como vemos en la Fig. 36, el extracto que lleva el plasmido pMZV7, es decir Crp, presenta una banda entre 20 y 29 kD que concuerda con el tamaño esperado para Crp (24kD), además esto se comprobó por inmunodetección. Podemos ver que en la Fig. 36 una banda en el extracto que lleva la proteína Crp, y dicha banda se enriquece mucho cuando enriquecemos en la proteína Crp (que está indicada con \*\*). Se procedió a secuenciar esa banda y se comprobó por identificación de huella peptídica que se trataba del *Lac represor*.

**Ensayo de retardo en gel.** Con el extracto enriquecido y el fragmento REPO marcado radiactivamente procedimos a realizar un ensayo de retardo de movilidad electroforética. Se utilizó como control un extracto proteico que no llevaba la proteína. Los resultados se observan en la Fig. 37.



**Figura 37.** Estudio de la movilidad electroforética de fragmento REPO, con y sin Crp. Se observa el retardo de la movilidad cuando está presente la proteína Crp.

Este ensayo muestra que el extracto que lleva la proteína Crp puede retrasar la movilidad electroforética del fragmento REPO.



## **DISCUSSION**



## 1. Crp y CyaA forman el sistema cAMP-Crp en *P. putida*

### 1.1. Identificación de los genes *crp* y *cyaA* en *P. putida*

En *P. putida* fue identificado el gen *cyaA* que codifica para la adenilato ciclasa, CyaA pp5222. La comparación con *cyaA E. coli* da como resultado un gen con 37% de identidad y un 53% de positivo. El gen *cyaA* de *P. putida* codifica para una proteína de 951 aa, con un peso molecular de 108.383 Da. Se le atribuye, según su estructura, la función biológica de biosíntesis de cAMP y se la engloba dentro de la clasificación I de las adenilatos ciclasa, con ubicación subcelular citoplasmática.

Es interesante comentar que solo esta única proteína fue identificada en *P. putida* con alta homología a la adenilato ciclasa de *E. coli*. Como se mencionó anteriormente en la introducción en *P. aeruginosa* se ha comprobado la presencia y la actividad de dos adenilato ciclasa, CyaA y CyaB (Wolfgang *et al.*, 2003); y en *Xantomona campestris* no se ha podido identificar ninguna adenilato ciclasa (de Crecy-Lagard *et al.*, 1990) (da Silva *et al.*, 2002).

En el caso de Crp, se encontró una proteína con una identidad del 62% comparado con CRP de *E. coli*. Según su descripción en base a su estructura de aa, esta proteína presenta una región de unión a ADN y una región de unión a nucleótidos. Tiene 214 aa y un peso molecular de 24.151 Da. El resultado arrojado por BLASTP saca a la luz dos proteínas además de Crp, aunque con una puntuación 5 veces menor que la Crp, con este resultado podríamos subrayar que esta es la única proteína en *P. putida* que se asemeja en estructura de a Crp de *E. coli*.

## Discusión

En *P. putida* podemos alegar la presencia de un sistema cAMP-Crp, ya que en este trabajo fueron identificados los genes protagonistas en el sistema: Crp y CyaA.

### 2. Comparación con otros sistemas cAMP-Crp

Las dos proteínas componentes de este sistema han sido encontradas en otros organismos, y se observa una amplia variedad de formas. En *P. aeruginosa* existe una proteína Vfr, pero se ha detectado la presencia de dos adenilato ciclasa. En *Xantomonas campestris* no existe adenilato ciclasa, y si una proteína homóloga a Crp llamado Clp. Esto hace muy interesante el estudio de las proteínas que forma este sistema ya que al parecer se ha ido modificando es las diferentes especies bacterianas.

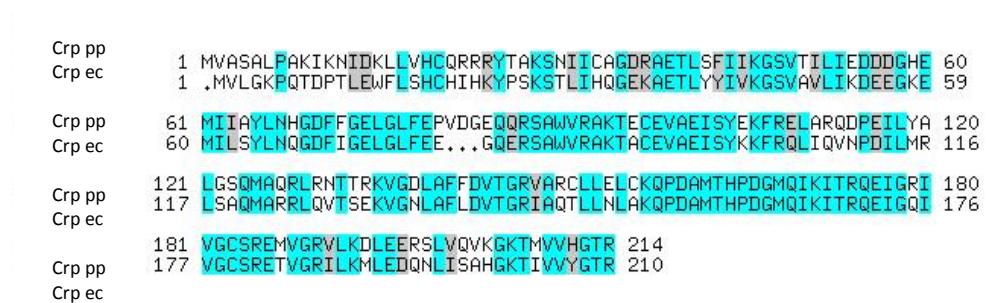
Es sabido la implicación del sistema cAMP-Crp en la utilización de fuentes de carbono en *E. coli* (Botsford and Harman, 1992) y, que la concentración de cAMP cambia según la fuente de carbono que estén utilizando las células (Epstein *et al.*, 1975). En *P. putida* no se ha observado cambios en la concentración intracelular de cAMP cuando las células crecen con glucosa o succinato (Phillips and Mulfinger, 1981). Nosotros en este trabajo presentamos un estudio preliminar en donde medimos la concentración de cAMP en la *P. putida cyaA* y observamos que la cantidad de cAMP es la mitad que en la estirpe silvestre. Este resultado nos da un indicio de que realmente el gen *cyaA* produce cAMP en *P. putida*, pero como se mencionó anteriormente éste fue un experimento preliminar y debemos repetirlo con controles adecuados.

Continuando con la adenilato ciclasa, como se ha indicado anteriormente en el apartado Resultados, la proteína CyaA de *P. putida* no ha sido capaz de complementar la mutación en *E. coli cyaA* mutante, expresada



desde pMZC5. Realmente este resultado ha sido muy sorprendente y hay que seguir trabajando en ello. Tenemos indicios de que la proteína se expresa en *E. coli*. Cuando transformamos la cepa de *E. coli* silvestre con el plásmido pMZC5 e inducimos la expresión del gen *cyaA*, vemos que la viabilidad de la células se ve seriamente afectada. Esto coincide con resultados descritos previamente, en donde se vio que el aumento de 6 veces en la expresión de la adenilato ciclasa conduce a la muerte bacteriana. Indicando que las células requieren un control muy estricto de la expresión de *cyaA* (Reddy *et al.*, 1985). Otro resultado que sustenta que la expresión del gen *cyaA* desde pMZC5, es que dicho plásmido puede complementar a *P. putida cyaA* en el movimiento de translocación *swimming*. Aún así no conocemos con certeza si el plásmido pMZC5 este expresando la proteína CyaA en *E coli cyaA*. Hemos intentado marcar con una señal inmunodetectable esta proteína pero todos los esfuerzos han sido infructuosos hasta el momento.

Con respecto a la proteína Crp, el otro integrante del sistema, la comparación entre Crp de *E. coli* y Crp de *P. putida* nos indica que son altamente homólogas, ver Fig. 38.



**Figura 38.** Alineamiento entre las dos secuencias de aa de las proteínas Crp de *P. putida* (Crp pp) y Crp de *E. coli* (Crp ec).

## Discusión

Análisis por hilvanado (*threading*) de la estructura secundaria en función tan solo de la secuencia amino acídica, indica que el modelo generado sobre el alineamiento arriba indicado genera un casi perfecto solapamiento. Solo existe la excepción de un rulo cercano a la zona de dimerización, Ver Fig. 39.



**Figura 39.** Modelo del monómero de Crp de *P. putida*.

Como se puede observar en las Fig. 38 y 39, las dos proteínas son altamente homólogas. Debido a esto decidimos realizar un estudio de reacción cruzada con anticuerpos realizados contra Crp de *E. coli*. Comparando un extracto proteico con y sin Crp, es decir, un extracto total de la estirpe *P. putida* silvestre y un extracto total de la estirpe *P. putida crp* respectivamente, se observó que el anticuerpo anti-Crp reconocía una única banda en el extracto de *P. putida*. Dicha banda no se detectaba en el extracto proteico que no tenía la proteína Crp. Existen datos en donde se reporta la ausencia de reacción cruzada con anticuerpo anti-Crp en *Pasterurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* (Biville and Guiso, 1985). En el caso de *P. putida*, el estudio de reacción cruzada fue positivo, indicando que estas dos proteínas comparten similitud en secuencia y estructura.

Es sabido que Crp de *E. coli* para ejercer su acción se une directamente a la RNAP por sus zonas AR1, AR2 y AR3. Analizando estas regiones en Crp de *P. putida* encontramos que:

-AR1 contacta con el C-Terminal de la subunidad  $\alpha$  de la ARNP, y consta de los residuos 158/160, en la proteína Crp de *P. putida* lo tenemos intacto.- AR2 contacta con el N-Terminal de la subunidad  $\alpha$  de la ARNP y consta de H19, que esta igual en Crp, H 21 que tenemos un Q en Crp y K101 que tenemos el mismo en Crp. -AR3 que contacta con el sigma de la ARNP y consta de K 53 que tenemos un E en *P. putida* y de E 58 que lo tenemos igual.

Resumiendo 1 aa cambiado en AR2 y 1 aa cambiado en AR3. Vale aclarar que AR1 es el más estudiado, un cambio en este sitio y pierde la capacidad de unión a ARNP, pero no pierde la capacidad de unirse a ADN.

Con respecto a la unión a cAMP, está comprobado que las proteínas Crp de *E. coli*, Vfr de *P. aeruginosa* y Crp de *Streptomyces coelicolor* unen cAMP (Zubay *et al.*, 1970), (Suh *et al.*, 2002), (Derouaux *et al.*, 2004a). En *S. coelicolor* se ha identificado un único miembro de la familia Crp/Fnr. La inactivación de esta proteína produce un defecto en la germinación. Un fenotipo similar se ha visto en la *S. coelicolor cyaA*, mutante incapaz de producir cAMP (Derouaux *et al.*, 2004b) (Susstrunk *et al.*, 1998). Experimentos realizados con Crp de *S. coelicolor* utilizando una columna de afinidad a cAMP, determinaron que Crp de *S. coelicolor* se unía a cAMP. Es interesante mencionar que utilizan 150 mM de NaCl para los lavados de la columna lo que supone una fuerza iónica débil. En esta misma bacteria se ha realizado este experimento con una fuerza iónica

## Discusión

mayor de 1 M NaCl y no se a podido recuperar Crp sino que se obtuvo NDK (Brodbeck *et al.*, 1996). Experimentos con alta concentración de NaCl demostraron que Crp era parcialmente eluída de la columna de afinidad a cAMP (Derouaux *et al.*, 2004a). Nosotros hemos utilizamos este mismo método basado en la columna de afinidad a cAMP para tratar de obtener la proteína Crp de *P. putida* (Resultados no mostrados). Utilizamos una fuerza iónica de 300 mM de NaCl y obtuvimos las proteínas NDK y Hfq. No pudimos obtener la proteína Crp de *P. putida*, este resultado nos deja abierta la duda de si Crp de *P. putida* está realmente uniendo cAMP, la fuerza iónica utilizada no fue muy alta. Se podrían realizar más pruebas variando la fuerza iónica para tratar de observar si existe unión. También sería interesante probar con la columna de cGMP. Con estos resultados preliminares la unión entre Crp y cAMP no está clara en nuestro sistema, y a juzgar por los fenotipos obtenidos podemos pensar que Crp puede o no usar cAMP. Existen evidencias de que proteínas de la familia Crp/Fnr no necesitan cAMP, como por ejemplo Clp de *X. campestris*, ya que esta proteína complementa en la cepa *E. coli crp cyaA* (de Crecy-Lagard *et al.*, 1990)

La comparación de la zona de unión a ADN entre Crp de *P. putida* y Crp de *E. coli* se puede se puede observar en la Fig. 40.

```
Crp.pp  R QEIGQIVGCS RETVGRILK
Crp.ec  R QEIGRIVGCS REMVGRVLK
```

**Figura 40.** Alineamiento de los residuos 170 a 189 que representa la zona de unión a ADN de las proteínas Crp de *P. putida* (Crp pp) y Crp de *E. coli* (Crp ec). Destacan los nucleótidos que varían.

Estudios de complementación se realizaron en *E. coli crp* mutante y pudimos comprobar que la proteína Crp de *P. putida* era capaz de complementar la mutación en *E. coli crp*, en la utilización de maltosa. De

lo que se puede deducir que, Crp de *P. putida* puede unir ADN en *E. coli* de manera eficaz para ejercer su acción reguladora. Este es un dato muy importante, ya que no todas las proteínas pertenecientes a la familia Crp/Fnr que se han descrito complementan en *E. coli crp*, como es el caso del Crp de *S. coleicolor* (Derouaux *et al.*, 2004a).

Al comprobar que Crp de *P. putida* era capaz de reconocer y unir una secuencia correspondiente a Crp de *E. coli* decidimos realizar una búsqueda bioinformática. Utilizando una secuencia consenso, la cual fue diseñada tomando como base, secuencias de unión descritas previamente para Crp de *E. coli* y Vfr de *P. aeruginosa*.

### **3. Posibles dianas del complejo cAMP-Crp en *P. putida***

#### **3.1. Búsqueda bioinformática**

En la búsqueda bioinformática de posibles sitios de reconocimiento-unión de Crp en el genoma de *P. putida* nosotros hemos encontrado 50 secuencias que son más o menos homólogas a la secuencia consenso de Crp. Otros análisis bioinformáticos realizado en *E. coli* han descrito que Crp tendría afinidad por 200 sitios en el cromosoma (Robison *et al.*, 1998). En otro estudio, utilizando la secuencia consenso de unión de Crp, se ha propuesto 46 posibles sitios de unión, alguno de los cuales ya han sido caracterizados (Tan *et al.*, 2001). Estos estudios previos avalan la fiabilidad de la técnica.

En los sitios identificados en el genoma de *P. putida*, la secuencia de 22 pb se encuentra ubicada desde el +1, entre -381 y -24, con lo que cubriría todas las zonas en el promotor. Los genes encontrados varían mucho en lo que respecta a su función. Se hallaron genes involucrados en síntesis de aa, genes codificantes de proteína transportadoras, genes reguladores

como *phoU*, etc. Esto da un indicio del amplio espectro de acción que podría tener la proteína Crp en la regulación global *P. putida*.

### 3.2. Profundidad genómica funcional del gen *crp*

Para estudiar la profundidad genómica funcional de este gen en *P. putida* utilizamos diferentes aproximaciones: transcriptómica, Inmunoprecipitación selectiva de ADN combinado con MicroChip de ADN (ChIP to Chip), PMs. Cada estudio individualmente, aporta una información muy valiosa en si misma, pero nosotros buscamos solapamiento entre estos estudios realizados.

#### 3.2.1. PMs

En este estudio observamos muchos puntos interesantes, en primer lugar las dos mutantes presentaron casi los mismos fenotipos, lo que nos podría estar indicando que las proteínas actúan de manera conjunta, aunque si se observaban fenotipos por separado. Los fenotipos ganados eran muchos menos que los perdidos. En los fenotipos ganados vemos que CyaA no tiene fenotipos individuales todos son compartidos con Crp, en cambio si se ve que la mutante *crp* es más resistente a Azlocillin, feniletanol y a un pH 4.4. Estos datos están indicando alguna modificación a nivel de membrana, ya que esta resistencia es a compuestos que principalmente afectan a la envuelta celular.

Con respecto a los fenotipos perdidos, se demuestra claramente una deficiencia en la utilización de dipéptido de aa. Este estudio se realiza en el marco de buscar alteraciones en el metabolismo secundario del nitrógeno, también hay deficiencia en las mutantes en la utilización de aminoácidos pertenecientes al metabolismo central del nitrógeno. Esto abre la cuestión, si es que no están entrando en la célula o no se están metabolizando. Según estos datos se puede pensar que los cambios son

a nivel de pared ya que hay resistencia y sensibilidades pero no vemos ninguna diferencia en el crecimiento entre las mutantes y la silvestre cuando se cambia la fuente de carbono. Este mismo estudio se ha realizado en mutante Crp en *E. coli* y si se observa diferencia en el crecimiento cuando se cambia las fuentes de carbono (Gosset *et al.*, 2004).

### 3.2.2. Transcriptómica

En el ensayo de transcriptómica vemos que hay 139 genes que alteran su expresión cuando mutamos el gen *crp*, esto aporta otra evidencia de la regulación global de Crp en *P. putida*. La variedad de genes encontrados es mucha, aunque el panorama general es diferente al encontrado en *E. coli* cuando se muta Crp (Gosset *et al.*, 2004), en este ensayo tampoco vemos alteración en la expresión en los genes involucrado en el metabolismo del carbono. Aunque está claro que es difícil comparar este tipo de ensayos ya que las condiciones de cultivo y la toma del ARN es crucial.

Entre los genes inducidos encontramos en su gran mayoría transportadores y hay algunos reguladores. Los genes que más suben su expresión en la mutante son dos transportadores de fosfatos. El regulador *phoB* también esta inducido, indicando una posible implicación de Crp en lo relacionado a fosfato. Dentro de los genes inducidos se encuentran dos componentes del sistema Tat: TatC y TatB, conocido sistema de transporte en bacterias que transporta proteínas a través de la membrana (Alami *et al.*, 2003).

Los genes reprimidos son muchos más que los inducidos, lo que indicaría que Crp podría actuar como activador en el contexto natural de la célula. El gen que presenta una mayor diferencia de expresión con respecto al

## Discusión

control, es decir el gen que se encuentra más reprimido en la mutante *crp*, es una aminoácido permeasa, este dato es muy interesante ya que en PMs vemos que la mutante crece peor que la cepa wt cuando se encuentran creciendo con dipéptido de aa.

Estudios comparativos se han realizado en Crp utilizando ROMA (Cao *et al.*, 2002), y se ha descrito a Crp como un activador y se han identificado 152 operones de los cuales 24 habían sido descritos con anterioridad. Sin embargo comparando con análisis de transcriptómica *in vivo* solo se ha identificado 17 operones, de los cuales 7 coinciden con los identificados mediante el método ROMA. Se ha involucrado a Crp en la regulación de operones que manejan el transporte y metabolismo de carbohidratos, tales como *fucP1* para fucosa y *kdgT* para gluconato. También regula la transcripción de genes involucrados en producción de energía, metabolismo de amino ácidos, transporte de iones, metabolismo de nucleótidos, además de participar en la regulación de genes reguladores como *melR*, *rpoH*, *blgG*, *fis* y *pdhR* (Zheng *et al.*, 2004).

### 3.2.3. ChIP to Chip

La metodología ChIP to Chip fue desarrollada en levaduras (Ren *et al.*, 2000) y ha sido aplicada en diferentes bacterias (Laub *et al.*, 2002) (Molle *et al.*, 2003). Recientemente se ha utilizado esta metodología en *E. coli* (Grainger *et al.*, 2005) (Grainger *et al.*, 2007). Nosotros presentamos el primer estudio en *P. putida* de distribución global *in vivo* de la proteína Crp. Los MicroChip de ADN que utilizamos, poseen oligos de 50 pb que representan cada gen de *P. putida*. Esos oligos representan las 50 pb justo del centro del gen. Esto nos obligó a obtener fragmentos de ADN inmunoprecipitados grandes, para así poder ser detectados en el MicroChip. Aunque obtuvimos muchas Orfs, es muy probable que no hallamos detectado todos los posibles genes que Crp está uniendo, así



que este experimento habría que repetirlo con un MicroChip de ADN que posea también las regiones intergénicas. Pero de todos modos la información que hemos obtenidos es muy valiosa y el desarrollo y puesta a punto de un protocolo para la utilización de esta metodología, es de una gran utilidad para futuros experimentos. Hemos encontrado 221 Orfs, de las cuales 123 son proteínas hipotéticas, entre las Orfs restantes que están descritas, la mayoría son reguladores, otros son genes que participan en funciones relacionadas con la envuelta celular, también genes involucrados en transporte y unión de proteínas, entre otras, que se pueden ver con más detalle en el Anexo: Parte III. Es interesante destacar que aparecen Orfs que se encuentran contiguas en el cromosoma, lo que indicaría que están dentro de un operón, y al ser inmunoprecipitadas todas, nos da un indicio de que Crp podría estar regulando todo ese operón.

Cada experimento es un dato muy importante en el estudio de este sistema pero hemos querido centrarnos en los genes que aparecían en más de un estudio (ver Tabla 8), estos genes se presentan como firmes candidatos a ser regulados por Crp. De todos modos una impresión general es que en ésta bacteria el sistema cAMP-Crp no está involucrado en la regulación del metabolismo del carbono, sino en funciones relacionadas con la superficie celular.

#### **4. Caracterización fenotípica**

Con respecto a un fenotipo concreto, hemos realizado experimentos de crecimiento en el laboratorio, además de los realizados en PMs, utilizando diferentes fuentes de carbono, y comprobamos que no hay diferencia en las curvas de crecimiento entre las bacterias que expresan y las que no el gen *crp*. Lo que si comprobamos es la clara implicación de Crp y CyaA en

## Discusión

la motilidad *swimming*. En este tipo de movimiento de translocación, se necesita el flagelo y nosotros vemos una clara alteración en la estructura del flagelo en microscopía óptica y electrónica. Quizás se puede atribuir esta habilidad de las mutantes para nadar, a su gran desarrollo flagelar.

Se ha relacionado el flagelo con el biofilm, en este trabajo se presentan resultados en donde se ve claramente que la mutante *crp* produce más biofilm, al igual que la doble mutante *crp cyaA*, pero no así la mutante *cyaA*. Esto es muy interesante ya que la alteración en el flagelo la vemos en las dos mutantes, pero el biofilm solo en una, es evidente que la producción de biofilm está regulada por muchos otros factores pero según estos resultados, el cAMP no intervendría y si lo haría Crp.

La implicación de Crp en la motilidad y la observación de la alteración del flagelo nos llevo a pensar que quizás Crp podía estar regulando algún gen implicado en la biogénesis flagelar. Además, en la bibliografía ya se han relacionado otras proteínas de la familia Crp-Fnr con motilidad, el caso mejor caracterizado es la regulación que ejerce Vfr sobre *fleQ* (Dasgupta *et al.*, 2002). En los estudio globales realizados habían aparecido algunos genes flagelares. Especialmente el gen *flhA*, el cual según el estudio bioinformático tenía una secuencia de unión a Crp y fue inmunoprecipitado en *ChIP to Chip*.

Buscando información sobre *flhA* en otras bacterias, encontramos que en *Aeromonas hydrophyla* cuando está mutado el gen *flhA* disminuye el *swimming* y el *swarming*, y disminuye la síntesis de flagelo (Canals *et al.*, 2006). En *Bacillus turigiensis* la mutante en *flhA*, gen caracterizado dentro de los genes flagelares clase II en esta bacteria, fue defectiva en *swimming* y aflagelada, demostrándose que la flagelina no se exporta fuera de la célula, pero si hay en el interior (Ghelardi *et al.*, 2002).

Interesantemente este mutante también fue defectivo en la secreción de hemolisina B y fosoflipasa C, demostrándose también, que se acumulaban intracelularmente (Ghelardi *et al.*, 2002).

Mediante PCR extrajimos del cromosoma el fragmento que contenía el promotor del gen *flhA* y decidimos trabajar con él en experimentos in vitro. Realizamos un retardo en gel para observar si un extracto enriquecido en la proteína Crp era capaz de unir este fragmento marcado radiactivamente. Los resultados develaron que la motilidad electroforética era retardada cuando estaba presente la proteína Crp, lo que indicaría que Crp efectivamente se une a este fragmento. Este experimento abre muchas preguntas y es quizás el punto “caliente” para continuar con el desarrollo de la investigación de Crp.

Otro fenotipo muy interesante que hemos encontrado en la mutante Crp es la resistencia de ésta al antibiótico catiónico colistina. Esto es algo muy importante ya que los futuros avances en el esclarecimiento en este fenómeno en *P. putida* se pueden extrapolar a *P. aeruginosa* u otras bacterias patógenas. También es un punto interesante para continuar con la investigación. En este trabajo podemos asociar el fenómeno de resistencia a que el antibiótico no este entrando ya que hemos encontrado un transportador de cationes reprimido en el MicroChip de ADN. No vemos diferencia en el perfil de LPS. En *Pseudomonas putida* los estudios sobre la composición de LPS no son muchos (de Weger *et al.*, 1987; de Weger *et al.*, 1989), sin embargo en el trabajo realizado por (Rodríguez-Herva *et al.*, 1999) se ve que a los mutantes que les falta el antígeno O de LPS son más sensibles a agentes químicos, sumando un dato más a la importancia de la integridad de la membrana para mantener la resistencias o sensibilidades.

## Discusión

No podemos dejar de nombrar que vemos un fenotipo claro de alteración en la formación de biofilm conjuntamente con resistencia a colistina, agente que tienen como diana la membrana celular. Como se mencionó en la introducción éstos dos procesos juntos han sido relacionados en la subpoblación móvil de la estructura de biofilm experimental en *P. aeruginosa*. Quizás estemos en frente a un regulador que participa en la primera instancia de desarrollo de los dos procesos.

En conclusión la mayoría de los datos indican una implicación de Crp en la regulación a nivel de pared celular.

Sabemos que la envuelta bacteriana juega un rol en la interacción entre las células y su medioambiente (Rodríguez-Herva *et al.*, 1999). Se ha comprobado la función detectora de cambios de la pared en respuesta a la toxicidad por compuestos aromáticos. En un estudio realizado por Domínguez y sus colaboradores, se ve que en las células de *Pseudomonas putida* expuestas a compuestos aromáticos como tolueno o xileno, cambian fuertemente su expresión los genes relacionados con la envuelta celular, como por ejemplo, genes del metabolismo de lípidos, transporte, síntesis de pilis y flagelo (Dominguez-Cuevas *et al.*, 2006). Es especial los genes relacionados con la movilidad y quimiotaxis fueron reprimidos, estos datos fueron contrastados con un experimento de motilidad en donde se observa la reducción de la motilidad *swimming* cuando las bacterias son expuestas a los agentes estresantes (Dominguez-Cuevas *et al.*, 2006).

Quizás el complejo cAMP-Crp participe en la señal que traduce los estímulos ambientales recogidos por la pared celular y regule la expresión de los genes que están relacionados con la misma. Por nuestros resultados podemos decir que la proteína Crp también podría actuar sin la

necesidad de cAMP, lo que abre una línea en las investigaciones para confirmarlo. Este trabajo sienta las bases para futuros estudios en *P. putida* de un sistema muy importante como es el cAMP- Crp.



## **CONCLUSIONES**





Los resultados de este trabajo nos llevan a obtener las siguientes conclusiones:

1. En el genoma de *P. putida* se han identificado una proteína homóloga a la adenilato ciclasa de *E. coli*, denominada CyaA, y una proteína homóloga a la Crp *E. coli*, denominada Crp. La proteína Crp de *P. putida* complementa la mutación de su homóloga en *E. coli*.
2. Utilizando dos secuencias consenso de unión de Crp, se identificaron 50 posibles sitios de reconocimiento en el genoma de *P. putida*.
3. Estudios fenotípicos a gran escala, demostraron que las mutaciones en los dos genes comparten el 75 % de los fenotipos encontrados.
4. En estudios de transcriptómica la mutación en Crp alteró la expresión de 139 genes.
5. La proteína Crp está involucrada en producción de biofilm en *P. putida*.
6. La proteína Crp está involucrada en resistencia al antibiótico catiónico colistina en *P. putida*.
7. El sistema cAMP-Crp está involucrado en motilidad *swimming* y en el desarrollo del flagelo en *P. putida*. La proteína Crp se une *in vitro* al fragmento que contienen el promotor del gen *flhA*.



## **BIBLIOGRAFIA**



- Abeyrathne, P.D., Daniels, C., Poon, K.K., Matewish, M.J., and Lam, J.S. (2005) Functional characterization of WaaL, a ligase associated with linking O-antigen polysaccharide to the core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **187**: 3002-3012.
- Adler, J., and Templeton, B. (1967) The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **46**: 175-184.
- Aiba, H., Fujimoto, S., and Ozaki, N. (1982) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res* **10**: 1345-1361.
- Aiba, H., Mori, K., Tanaka, M., Ooi, T., Roy, A., and Danchin, A. (1984) The complete nucleotide sequence of the adenylate cyclase gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **12**: 9427-9440.
- Alami, M., Luke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H.G., Brunner, J., and Muller, M. (2003) Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **12**: 937-946.
- Albus, A.M., Pesci, E.C., Runyen-Janecky, L.J., West, S.E., and Iglewski, B.H. (1997) Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**: 3928-3935.
- Aldridge, P., and Hughes, K.T. (2001) How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol* **9**: 209-214.
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., and Ramphal, R. (1997) A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol* **179**: 5574-5581.
- Assinder, S.J., and Williams, P.A. (1990) The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv Microb Physiol* **31**: 1-69.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K ((1994) )** *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons

## Bibliografía

New York.

Bagdasarian, M., Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F.C., Bagdasarian, M.M., Frey, J., and Timmis, K.N. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.

Bardy, S.L., Ng, S.Y., and Jarrell, K.F. (2003) Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**: 295-304.

Bartlett, D.H., Frantz, B.B., and Matsumura, P. (1988) Flagellar transcriptional activators FlbB and Flal: gene sequences and 5' consensus sequences of operons under FlbB and Flal control. *J Bacteriol* **170**: 1575-1581.

Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Sargent, J.L., Levesque, R.C., and Mattick, J.S. (2002) Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**: 3605-3613.

Bernardo, L.M., Johansson, L.U., Solera, D., Skarfstad, E., and Shingler, V. (2006) The guanosine tetraphosphate (ppGpp) alarmone, DksA and promoter affinity for RNA polymerase in regulation of sigma-dependent transcription. *Mol Microbiol* **60**: 749-764.

Bertani, I., Sevo, M., Kojic, M., and Venturi, V. (2003) Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas*. *Arch Microbiol* **180**: 264-271.

Biville, F., and Guiso, N. (1985) Evidence for the presence of cAMP, cAMP receptor and transcription termination factor rho in different gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol* **131**: 2953-2960.

Bochner, B.R., Gadzinski, P., and Panomitros, E. (2001) Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res* **11**: 1246-1255.

- Bochner, B.R. (2003) New technologies to assess genotype-phenotype relationships. *Nat Rev Genet* **4**: 309-314.
- Botsford, J.L., and Harman, J.G. (1992) Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* **56**: 100-122.
- Bourret, R.B., Charon, N.W., Stock, A.M., and West, A.H. (2002) Bright lights, abundant operons--fluorescence and genomic technologies advance studies of bacterial locomotion and signal transduction: review of the BLAST meeting, Cuernavaca, Mexico, 14 to 19 January 2001. *J Bacteriol* **184**: 1-17.
- Brodbeck, M., Rohling, A., Wohlleben, W., Thompson, C.J., and Susstrunk, U. (1996) Nucleoside-diphosphate kinase from *Streptomyces coelicolor*. *Eur J Biochem* **239**: 208-213.
- Busby, S., and Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199-213.
- Busby, S.a.K., A (1996) *The CAP modulon: In: Regulation of gene expression in Escherichia coli*. New York.
- Canals, R., Ramirez, S., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J.G., Tomas, J.M., and Merino, S. (2006) Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol* **188**: 542-555.
- Cao, M., Kobel, P.A., Morshedi, M.M., Wu, M.F., Paddon, C., and Helmann, J.D. (2002) Defining the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J Mol Biol* **316**: 443-457.
- Casadoban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the Lac genes to selected promoters in *E. coli* using bacteriophage lambda and Mu. . *J Mol Biol*: 541

## Bibliografía

Cases, I., de Lorenzo, V., and Perez-Martin, J. (1996) Involvement of sigma 54 in exponential silencing of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid Pu promoter. *Mol Microbiol* **19**: 7-17.

Cases, I. (1998) Regulación fisiológica del promotor Pu del plásmido TOL pWWO de *Pseudomonas putida*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.

Cases, I., and de Lorenzo, V. (1998) Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **1**: 303-310.

Cases, I., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1999) The IANtr (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the sigma54-dependent Pu promoter of the TOL plasmid. *J Biol Chem* **274**: 15562-15568.

Chilcott, G.S., and Hughes, K.T. (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 694-708.

Choy, W.K., Zhou, L., Syn, C.K., Zhang, L.H., and Swarup, S. (2004) MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* **186**: 7221-7228.

Ciacchi-Woolwine, F., Blomfield, I.C., Richardson, S.H., and Mizel, S.B. (1998) *Salmonella* flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. *Infect Immun* **66**: 1127-1134.

Cossart, P., and Gicquel-Sanzey, B. (1982) Cloning and sequence of the *crp* gene of *Escherichia coli* K 12. *Nucleic Acids Res* **10**: 1363-1378.

da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B.,



- Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C., and Kitajima, J.P. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459-463.
- Danchin, A. (1993) Phylogeny of adenylyl cyclases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **27**: 109-162.
- Dasgupta, N., Ferrell, E.P., Kanack, K.J., West, S.E., and Ramphal, R. (2002) fleQ, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* **184**: 5240-5250.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., and Ramphal, R. (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**: 809-824.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- de Crecy-Lagard, V., Glaser, P., Lejeune, P., Sismeiro, O., Barber, C.E., Daniels, M.J., and Danchin, A. (1990) A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *J Bacteriol* **172**: 5877-5883.

## Bibliografía

- de Lorenzo, V., Cases, I., Herrero, M., and Timmis, K.N. (1993a) Early and late responses of TOL promoters to pathway inducers: identification of postexponential promoters in *Pseudomonas putida* with lacZ-tet bicistronic reporters. *J Bacteriol* **175**: 6902-6907.
- de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B., and Timmis, K.N. (1993b) Analysis of *Pseudomonas* gene products using lacIq/P<sub>trp</sub>-lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17-24.
- de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**: 386-405.
- de Weger, L.A., Jann, B., Jann, K., and Lugtenberg, B. (1987) Lipopolysaccharides of *Pseudomonas* spp. that stimulate plant growth: composition and use for strain identification. *J Bacteriol* **169**: 1441-1446.
- de Weger, L.A., van Loosdrecht, M.C., Klaassen, H.E., and Lugtenberg, B. (1989) Mutational changes in physiochemical cell surface properties of plant-growth-stimulating *Pseudomonas* spp. do not influence the attachment properties of the cells. *J Bacteriol* **171**: 2756-2761.
- Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M., and Verstraete, W. (2001) Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ Microbiol* **3**: 649-657.
- Derouaux, A., Dehareng, D., Lecocq, E., Halici, S., Nothaft, H., Giannotta, F., Moutzourelis, G., Dusart, J., Devreese, B., Titgemeyer, F., Van Beeumen, J., and Rigali, S. (2004a) Crp of *Streptomyces coelicolor* is the third transcription factor of the large CRP-FNR superfamily able to bind cAMP. *Biochem Biophys Res Commun* **325**: 983-990.
- Derouaux, A., Halici, S., Nothaft, H., Neutelings, T., Moutzourelis, G., Dusart, J., Titgemeyer, F., and Rigali, S. (2004b) Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **186**: 1893-1897.

- Dominguez-Cuevas, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Marques, S., Ramos, J.L., and de Lorenzo, V. (2006) Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J Biol Chem* **281**: 11981-11991.
- Duetz, W.A., Marques, S., de Jong, C., Ramos, J.L., and van Andel, J.G. (1994) Inducibility of the TOL catabolic pathway in *Pseudomonas putida* (pWW0) growing on succinate in continuous culture: evidence of carbon catabolite repression control. *J Bacteriol* **176**: 2354-2361.
- Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C., and Krakowka, S. (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* **64**: 2445-2448.
- Ebright, R.H. (1993) Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol* **8**: 797-802.
- Eilen, E., Pampeno, C., and Krakow, J.S. (1978) Production and properties of the alpha core derived from the cyclic adenosine monophosphate receptor protein of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **17**: 2469-2473.
- Epstein, W., Rothman-Denes, L.B., and Hesse, J. (1975) Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 2300-2304.
- Felsenstein, J. (1989) *PHYMLIP-phylogeny inference package*, *Cladistic* **5**.
- Fenchel, T. (2002) Microbial behavior in a heterogeneous world. *Science* **296**: 1068-1071.
- Fernandez, S., de Lorenzo, V., and Perez-Martin, J. (1995) Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol Microbiol* **16**: 205-213.
- Franklin, F.C., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M., and Timmis, K.N. (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated

## Bibliografía

aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 7458-7462.

Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Gominet, M., Lereclus, D., Wong, A.C., and Senesi, S. (2002) Requirement of flhA for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* **184**: 6424-6433.

Gosset, G., Zhang, Z., Nayyar, S., Cuevas, W.A., and Saier, M.H., Jr. (2004) Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 3516-3524.

Grainger, D.C., Hurd, D., Harrison, M., Holdstock, J., and Busby, S.J. (2005) Studies of the distribution of *Escherichia coli* cAMP-receptor protein and RNA polymerase along the *E. coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17693-17698.

Grainger, D.C., Aiba, H., Hurd, D., Browning, D.F., and Busby, S.J. (2007) Transcription factor distribution in *Escherichia coli*: studies with FNR protein. *Nucleic Acids Res* **35**: 269-278.

Gunn, J.S., Ryan, S.S., Van Velkinburgh, J.C., Ernst, R.K., and Miller, S.I. (2000) Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* **68**: 6139-6146.

Haagensen, J.A., Klausen, M., Ernst, R.K., Miller, S.I., Folkesson, A., Tolker-Nielsen, T., and Molin, S. (2007) Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **189**: 28-37.

Hanahan, D., and Meselson, M. (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* **100**: 333-342.

Helmann, J.D., and Chamberlin, M.J. (1987) DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia*

coli and Salmonella typhimurium is controlled by an alternative sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6422-6424.

Henrichsen, J. (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**: 478-503.

Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6557-6567.

Hitchcock, P.J., and Brown, T.M. (1983) Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* **154**: 269-277.

Houthaeve, T., Gausepohl, H., Mann, M., and Ashman, K. (1995) Automation of micro-preparation and enzymatic cleavage of gel electrophoretically separated proteins. *FEBS Lett* **376**: 91-94.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Kohler, T., Rekik, M., and Harayama, S. (1990) Growth-phase-dependent expression of the Pseudomonas putida TOL plasmid pWW0 catabolic genes. *J Bacteriol* **172**: 6651-6660.

Ishizuka, H., Hanamura, A., Kunimura, T., and Aiba, H. (1993) A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **10**: 341-350.

Kanack, K.J., Runyen-Janecky, L.J., Ferrell, E.P., Suh, S.J., and West, S.E. (2006) Characterization of DNA-binding specificity and analysis of binding sites of the Pseudomonas aeruginosa global regulator, Vfr, a homologue of the Escherichia coli cAMP receptor protein. *Microbiology* **152**: 3485-3496.

Kaniga, K., Delor, I., and Cornelis, G.R. (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of Yersinia enterocolitica. *Gene* **109**: 137-141.

## Bibliografía

- Katz, E., and Demain, A.L. (1977) The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev* **41**: 449-474.
- Kessler, B., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1992) A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the P<sub>m</sub> promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**: 293-301.
- Kim, W., Killam, T., Sood, V., and Surette, M.G. (2003) Swarm-cell differentiation in Salmonella enterica serovar typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics. *J Bacteriol* **185**: 3111-3117.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., and Adhya, S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* **62**: 749-795.
- Korner, H., Sofia, H.J., and Zumft, W.G. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 559-592.
- Krakow, J.S., and Pastan, I. (1973) Cyclic adenosine monophosphate receptor: loss of cAMP-dependent DNA binding activity after proteolysis in the presence of cyclic adenosine monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 2529-2533.
- Kutsukake, K. (1997) Autogenous and global control of the flagellar master operon, flhD, in Salmonella typhimurium. *Mol Gen Genet* **254**: 440-448.
- Laub, M.T., Chen, S.L., Shapiro, L., and McAdams, H.H. (2002) Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the Caulobacter cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4632-4637.
- Lazdunski, A.M., Ventre, I., and Sturgis, J.N. (2004) Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**: 581-592.
- Lee, E.J., Glasgow, J., Leu, S.F., Belduz, A.O., and Harman, J.G. (1994) Mutagenesis of the cyclic AMP receptor protein of Escherichia coli:

- targeting positions 83, 127 and 128 of the cyclic nucleotide binding pocket. *Nucleic Acids Res* **22**: 2894-2901.
- Lee, M.C., Weng, S.F., and Tseng, Y.H. (2003) Flagellin gene *fliC* of *Xanthomonas campestris* is upregulated by transcription factor Clp. *Biochem Biophys Res Commun* **307**: 647-652.
- Lequette, Y., and Greenberg, E.P. (2005) Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **187**: 37-44.
- Macnab, R.M. (1996) *Flagella and Motility*. In *Escherichia coli and Salmonella Thyphymurium Cellular and Molecular biology*. Washington, DC.
- Macnab, R.M. (1999) The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J Bacteriol* **181**: 7149-7153.
- Marques, S., Holtel, A., Timmis, K.N., and Ramos, J.L. (1994) Transcriptional induction kinetics from the promoters of the catabolic pathways of TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* for metabolism of aromatics. *J Bacteriol* **176**: 2517-2524.
- Mayfield, C.I., and Inniss, W.E. (1977) A rapid, simple method for staining bacterial flagella. *Can J Microbiol* **23**: 1311-1313.
- Merino, S., Rubires, X., Aguilar, A., and Tomas, J.M. (1997) The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains. *FEMS Microbiol Lett* **151**: 213-217.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Liu, J.S., and Losick, R. (2003) The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **50**: 1683-1701.
- Monod (1942) Recherche sur la croissance des cultures bacteriennes. Herman. In *Actualité's scientifiques et industrielles* Herman, Paris.
- Mori, H., Isono, K., Horiuchi, T., and Miki, T. (2000) Functional genomics of *Escherichia coli* in Japan. *Res Microbiol* **151**: 121-128.

## Bibliografía

Murray, M.G., and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325.

Nakazawa, T. (2002) Travels of a Pseudomonas, from Japan around the world. *Environ Microbiol* **4**: 782-786.

Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R.T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J.A., Timmis, K.N., Dusterhoft, A., Tummeler, B., and Fraser, C.M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799-808.

O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449-461.

Olivera, E.R., Carnicero, D., Jodra, R., Minambres, B., Garcia, B., Abraham, G.A., Gallardo, A., Roman, J.S., Garcia, J.L., Naharro, G., and Luengo, J.M. (2001) Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ Microbiol* **3**: 612-618.

Page, R.D. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**: 357-358.

**Palleroni, N. (1984. )** *Family I.Pseudomonadaceae.* . Baltimore.

Perlman, R.L., and Pastan, I. (1969) Pleiotropic deficiency of carbohydrate utilization in an adenyl cyclase deficient mutant of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **37**: 151-157.

Phillips, A.T., and Mulfinger, L.M. (1981) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas*



aeruginosa during induction and carbon catabolite repression of histidase synthesis. *J Bacteriol* **145**: 1286-1292.

Pratt, L.A., and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**: 285-293.

Prieto, M.a.G.J. (1997) identification of a Novel positive regulator of the 4-Hidroxiphenylacetate catabolic Pathway of Escherichia Coli. *Biochemical and Biophysical research communications.*: 759-765.

Rabaan, A.A., Gryllos, I., Tomas, J.M., and Shaw, J.G. (2001) Motility and the polar flagellum are required for Aeromonas caviae adherence to HEp-2 cells. *Infect Immun* **69**: 4257-4267.

Raibaud, O., Vidal-Ingigliardi, D., and Kolb, A. (1991) Genetic studies on the promoter of malT, the gene that encodes the activator of the Escherichia coli maltose regulon. *Res Microbiol* **142**: 937-942.

Ramos, J.L., Marques, S., and Timmis, K.N. (1997) Transcriptional control of the Pseudomonas TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu Rev Microbiol* **51**: 341-373.

Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Rojas, A., Teran, W., and Segura, A. (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* **56**: 743-768.

Rashid, M.H., and Kornberg, A. (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4885-4890.

Reddy, P., Peterkofsky, A., and McKenney, K. (1985) Translational efficiency of the Escherichia coli adenylate cyclase gene: mutating the UUG initiation codon to GUG or AUG results in increased gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 5656-5660.

Ren, B., Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., Volkert, T.L., Wilson,

## Bibliografía

- C.J., Bell, S.P., and Young, R.A. (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* **290**: 2306-2309.
- Robison, K., McGuire, A.M., and Church, G.M. (1998) A comprehensive library of DNA-binding site matrices for 55 proteins applied to the complete Escherichia coli K-12 genome. *J Mol Biol* **284**: 241-254.
- Rodriguez-Herva, J.J., Reniero, D., Galli, E., and Ramos, J.L. (1999) Cell envelope mutants of Pseudomonas putida: physiological characterization and analysis of their ability to survive in soil. *Environ Microbiol* **1**: 479-488.
- Saier, M.H., Jr. (1989) Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbiol Rev* **53**: 109-120.
- Sambrook J, F.E.a.M.T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manula*. EEUU.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., and Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**: 258-268.
- Schwartz, D.B., J.R. (1970) *Mutants missing a factor necessary for the expression of eatabolite-sensitive operons in E. coli. in "The Lactose Operon"* New York.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**: 850-858.
- Smith, R.S., Wolfgang, M.C., and Lory, S. (2004) An adenylate cyclase-controlled signaling network regulates Pseudomonas aeruginosa virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* **72**: 1677-1684.
- Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**: Article3.

- Smyth, G.K., Michaud, J., and Scott, H.S. (2005) Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21**: 2067-2075.
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., and Bertin, P. (1999) Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J Bacteriol* **181**: 7500-7508.
- Stanley, P.M. (1983) Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can J Microbiol* **29**: 1493-1499.
- Stein, D.C. (1992) Plasmids with easily excisable *xylE* cassettes. *Gene* **117**: 157-158.
- Suh, S.J., Runyen-Janecky, L.J., Maleniak, T.C., Hager, P., MacGregor, C.H., Zielinski-Mozny, N.A., Phibbs, P.V., Jr., and West, S.E. (2002) Effect of *vfr* mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **148**: 1561-1569.
- Susstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A., and Thompson, C.J. (1998) Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **30**: 33-46.
- Tan, K., Moreno-Hagelsieb, G., Collado-Vides, J., and Stormo, G.D. (2001) A comparative genomics approach to prediction of new members of regulons. *Genome Res* **11**: 566-584.
- Team, R.D.C. (2004) R:A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

## Bibliografía

- Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M., and Harshey, R.M. (2000) Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **182**: 6308-6321.
- Trent, M.S., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J., and Raetz, C.R. (2001) An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem* **276**: 43122-43131.
- Ullmann, A., and Monod, J. (1968) Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **2**: 57-60.
- Ullmann, A. (1996) Catabolite repression: a story without end. *Res Microbiol* **147**: 455-458.
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P., and O'Gara, F. (2001) *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 289-295.
- Weber, I.T., and Steitz, T.A. (1987) Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol* **198**: 311-326.
- West, S.E., Sample, A.K., and Runyen-Janecky, L.J. (1994) The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J Bacteriol* **176**: 7532-7542.
- Whitchurch, C.B., Beatson, S.A., Comolli, J.C., Jakobsen, T., Sargent, J.L., Bertrand, J.J., West, J., Klausen, M., Waite, L.L., Kang, P.J., Tolker-Nielsen, T., Mattick, J.S., and Engel, J.N. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* *fimL* regulates multiple virulence functions by intersecting with Vfr-modulated pathways. *Mol Microbiol* **55**: 1357-1378.
- Whitfield, C. (1995) Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol* **3**: 178-185.

- Whitfield, C., Amor, P.A., and Koplín, R. (1997) Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol Microbiol* **23**: 629-638.
- Williams, P.A., and Murray, K. (1974) Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J Bacteriol* **120**: 416-423.
- Wolfgang, M.C., Lee, V.T., Gilmore, M.E., and Lory, S. (2003) Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell* **4**: 253-263.
- Wosten, M.M., and Groisman, E.A. (1999) Molecular characterization of the PmrA regulon. *J Biol Chem* **274**: 27185-27190.
- Zheng, D., Constantinidou, C., Hobman, J.L., and Minchin, S.D. (2004) Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res* **32**: 5874-5893.
- Zubay, G., Schwartz, D., and Beckwith, J. (1970) Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**: 104-110.



**ANEXO**



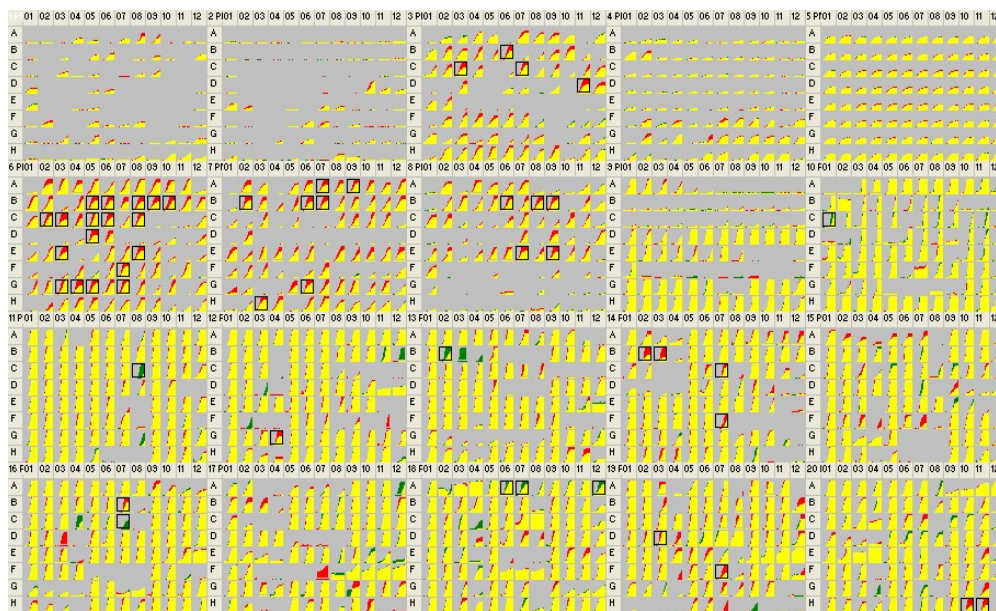


## Anexo Parte I: Resultados de *Phenotypic microArray*

Paneles de PMs: cada panel contiene 20 cuadros, en los cuales hay diferentes condiciones de cultivo. Los recuadros negros muestran en donde se han encontrado mayores diferencias entre la cepa mutante y la cepa silvestre.

Panel 1 y 2 Metabolismo del Carbono, panel 3 Metabolismo Básico del Nitrógeno, panel 4 Metabolismo de Fósforos y Sulfuros, panel 5 Rutas biosintéticas, Paneles 6, 7 y 8 Metabolismo adicional del nitrógeno, panel 9 estrés iónico y osmótico, panel 10 estrés por pH, paneles del 11 al 20 estudio de sensibilidad de 240 compuestos, los cuales son inhibidores de diferentes rutas y funciones.

Resultados de la comparación en el crecimiento entre la cepa *P. putida* silvestre y *P. putida crp*



## Anexo

**Detalle del resultado de PMs:** la diferencia en crecimiento se expresa en números, considerando el 0 como no diferencia, en los valores positivos que las mutantes crecen mejor que la silvestre y en los valores negativos las mutantes crecen peor que la silvestre.

Strain Number	Other	
Test	Put	SID_45 <i>P. putida crp</i>
Ref	Pput	SID_43 <i>P. putida silvestre</i>

Phenotypes Gained - Faster Growth / Resistance				
PM	Wells	Test	Difference	Mode of Action
PM18	A06, A07	Sodium pyrophosphate	176	chelating agent
PM18	A12	Phenylethanol	110	membrane
PM16	C07	Protamine sulfate	64	membrane, ATPase
PM11	C08	Colistin	122	membrane, transport
PM10	C01	pH 4.5 + L-Methionine	88	pH, decarboxylase
PM13	B02	Azlocillin	115	wall, lactam

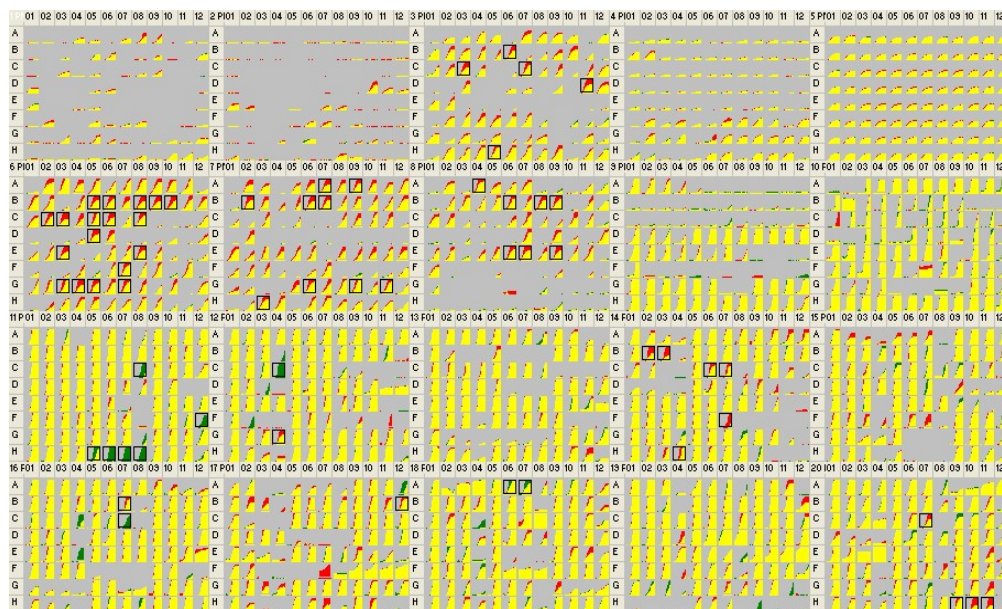
Phenotypes Lost - Slower Growth / Sensitivity				
PM	Wells	Test	Difference	Mode of Action
PM14	C07	1-Hydroxy- pyridine-2-thione	-75	chelator, lipophilic
PM14	B02, B03	9-Aminoacridine	-209	DNA intercalator

PM16	B07	Sulfanilamide	-87	folate antagonist
PM19	D03	Disulfiram	-76	fungicide
PM06	B05	Arg-Ala	-78	N-source
PM06	B06	Arg-Arg	-93	N-source
PM06	B08	Arg-Gln	-76	N-source
PM06	B09	Arg-Glu	-74	N-source
PM06	B10	Arg-Ile	-93	N-source
PM06	C02	Arg-Phe	-74	N-source
PM06	C03	Arg-Ser	-92	N-source
PM06	C05	Arg-Tyr	-81	N-source
PM06	C06	Arg-Val	-90	N-source
PM06	C08	Asn-Val	-82	N-source
PM06	D05	Gln-Gln	-104	N-source
PM06	E03	Gly-Arg	-67	N-source
PM06	E08	Gly-Lys	-77	N-source
PM06	F07	His-Leu	-89	N-source
PM06	G03	Ile-Ala	-77	N-source
PM06	G04	Ile-Arg	-107	N-source
PM06	G05	Ile-Gln	-94	N-source
PM06	G07	Ile-His	-89	N-source
PM07	A07	Lys-Arg	-58	N-source
PM07	A09	Lys-Ile	-68	N-source
PM07	B02	Lys-Ser	-88	N-source
PM07	B06	Lys-Val	-81	N-source
PM07	B07	Met-Arg	-87	N-source

## Anexo

PM07	G06	Tyr-Gln	-91	N-source
PM07	H03	Val-Arg	-69	N-source
PM08	B06	Ile-Asn	-68	N-source
PM08	B08	Leu-Asn	-71	N-source
PM08	B09	Leu-His	-89	N-source
PM08	E07	Val-Gln	-97	N-source
PM08	E09	Val-Lys	-84	N-source
PM03	B06	L-Lysine	-62	N-source, amino acid
PM03	C03	D-Alanine	-62	N-source, amino acid
PM03	C07	D-Lysine	-70	N-source, amino acid
PM03	D11	Putrescine	-75	N-source, amino acid
PM12	G04	Spectinomycin	-83	protein synthesis
PM19	F07	Blasticidin S	-72	protein synthesis
PM20	H10, H11	Oleandomycin	-155	protein synthesis, macrolide
PM14	F07	Piperacillin	-61	wall, lactam

Resultados de la comparación en el crecimiento entre la cepa *P. putida silvestre* y *P. putida cyaA*



**Detalle del resultado de PMs.** La diferencia en crecimiento se expresa en números, tomando 0 como no diferencia, valores positivos: las mutantes crecen mejor que la silvestre y valores negativos la mutante crece peor que la silvestre.

Strain Number Other

Test Pput SID\_44\_P. putida cyaA

Ref Pput SID\_43\_P. putida silvestre

Phenotypes Gained - Faster Growth / Resistance				
PM	Wells	Test	Difference	Mode of Action
PM18	A06, A07	Sodium pyrophosphate	175	chelating agent
PM16	C07	Protamine sulfate	85	membrane, ATPase
PM11	C08	Colistin	122	membrane,

## Anexo

				transport
PM11	F12	Neomycin	109	protein synthesis, aminoglycoside
PM11	H05, H06, H07, H08	Kanamycin	546	protein synthesis, aminoglycoside
PM12	C04	Paromomycin	187	protein synthesis, aminoglycoside

### Phenotypes Lost - Slower Growth / Sensitivity

PM	Wells	Test	Difference	Mode of Action
PM20	C07	Atropine	-65	acetylcholine receptor, antagonist
PM17	B12	Ethionamide	-73	anti-tuberculo- static
PM14	H04	EGTA	-71	chelator, Ca <sup>++</sup>
PM14	C06, C07	1-Hydroxy- pyridine-2- thione	-163	chelator, lipophilic
PM14	B02, B03	9-Aminoacridine	-201	DNA intercalator
PM16	B07	Sulfanilamide	-74	folate antagonist
PM06	B05	Arg-Ala	-78	N-source
PM06	B06	Arg-Arg	-85	N-source
PM06	B08	Arg-Gln	-75	N-source
PM06	B09	Arg-Glu	-71	N-source
PM06	B10	Arg-Ile	-92	N-source
PM06	C02	Arg-Phe	-77	N-source
PM06	C03	Arg-Ser	-90	N-source
PM06	C05	Arg-Tyr	-73	N-source

PM06	C06	Arg-Val	-88	N-source
PM06	C08	Asn-Val	-80	N-source
PM06	D05	Gln-Gln	-100	N-source
PM06	E03	Gly-Arg	-66	N-source
PM06	E08	Gly-Lys	-78	N-source
PM06	F07	His-Leu	-86	N-source
PM06	G03	Ile-Ala	-78	N-source
PM06	G04	Ile-Arg	-108	N-source
PM06	G05	Ile-Gln	-93	N-source
PM06	G07	Ile-His	-89	N-source
PM07	A07	Lys-Arg	-60	N-source
PM07	A09	Lys-Ile	-65	N-source
PM07	B02	Lys-Ser	-87	N-source
PM07	B06	Lys-Val	-80	N-source
PM07	B07	Met-Arg	-81	N-source
PM07	G06	Tyr-Gln	-87	N-source
PM07	G09	Tyr-His	-62	N-source
PM07	G11	Tyr-Lys	-55	N-source
PM07	H03	Val-Arg	-70	N-source
PM08	A04	Ala-Gln	-51	N-source
PM08	B06	Ile-Asn	-64	N-source
PM08	B08	Leu-Asn	-68	N-source
PM08	B09	Leu-His	-86	N-source
PM08	E06	Val-Ala	-67	N-source
PM08	E07	Val-Gln	-99	N-source

## Anexo

PM08	E09	Val-Lys	-82	N-source
PM03	B06	L-Lysine	-60	N-source, amino acid
PM03	C03	D-Alanine	-62	N-source, amino acid
PM03	C07	D-Lysine	-76	N-source, amino acid
PM03	D11	Putrescine	-77	N-source, amino acid
PM03	H05	Ala-His	-52	N-source, amino acid
PM12	G04	Spectinomycin	-75	protein synthesis
PM20	H09, H10, H11	Oleandomycin	-239	protein synthesis, macrolide
PM14	F07	Piperacillin	-80	wall, lactam



## Anexo Parte II: Tablas de resultados de ensayo de transcriptómica

Resultados de la expresión diferencial entre *P. putida cyaA* vs *P. putida* silvestre

ID	Name	M
PP0388	DNA primase gb AE015451.1 :c474983-473001	1.081857796
PP0388	DNA primase gb AE015451.1 :c474983-473001	0.844121598

Resultados de la expresión diferencial entre *P. putida crp* vs *P. putida* silvestre.

El valor de M que se presenta en la tabla es una valor promedio de los dos pocillos que representan a cada gen en el MicroChip de ADN. Los genes están ordenados según el valor M

Genes inducidos en *P. putida crp* respecto al control.

ID	Name	M.
gj 18150858:c51837-50914	xyIE gj 18150858:c51837-50914	2.6
PP2656	phosphate ABC transporter periplasmic phosphate-bind gb AE015451.1 :3043339-3044385	5.9
PP5329	phosphate ABC transporter periplasmic phosphate-bind gb AE015451.1 :c6077689-6076691	5.6
PP2645	magnesium-translocating P-type ATPase gb AE015451.1 :3030691-3033453	5.09
PP2669	outer membrane protein putative gb AE015451.1 :c3057344-3056355	4.74
PP2658	phosphate ABC transporter permease protein gb AE015451.1 :3045421-3046314	4.15
PP2670	hypothetical protein gb AE015451.1 :3057324-3058658	4.08
PP2657	phosphate ABC transporter permease protein gb AE015451.1 :3044456-3045424	3.81

## Anexo

PP2646	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :3033457-3033852	3.7
PP2671	sensor histidine kinase gb AE015451.1 :3058719-3059993	3.6
PP2644	hypothetical protein gb AE015451.1 :3030247-3030393	3.58
PP3243	acetyltransferase GNAT family gb AE015451.1 :c3679115-3678606	3.58
PP4544	hypothetical protein gb AE015451.1 :5161231-5162475	3.58
PP3244	magnesium transporter MgtC family gb AE015451.1 :c3679846-3679133	3.52
PP1726	ABC transporter periplasmic binding protein gb AE015451.1 :c1926862-1925798	3.46
PP5139	cadmium translocating P-type ATPase gb AE015451.1 :c5866141-5863889	3.43
PP2695	transcriptional regulator LysR family gb AE015451.1 :3086649-3087545	3.18
PP5258	aldehyde dehydrogenase family protein gb AE015451.1 :c6003927-6002437	2.89
PP1400	dicarboxylate MFS transporter gb AE015451.1 :c1595418-1594099	2.7
PP2659	phosphate ABC transporter ATP-binding protein gb AE015451.1 :3046311-3047150	2.7
PP5326	phosphate ABC transporter ATP-binding protein gb AE015451.1 :c6072515-6071670	2.69
PP5171	sulfate ABC transporter periplasmic sulfate-binding gb AE015451.1 :c5897379-5896351	2.55
PP5172	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :c5897591-5897409	2.48
PP2661	hypothetical protein gb AE015451.1 :3047943-3048542	2.37
PP5320	DNA-binding response regulator PhoB gb AE015451.1 :6065091-6065819	2.36
PP4108	4-aminobutyrate aminotransferase putative	2.23

	gb AE015451.1 :4643130-4644380	
PP1725	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :c1925698-1924862	2.21
PP2660	hypothetical protein gb AE015451.1 :3047167-3047943	2.02
PP1040	Sec-independent protein translocase TatB putative gb AE015451.1 :c1190098-1189808	1.93
PP4471	magnesium transporter gb AE015451.1 :c5078753-5077311	1.91
PP1111	synthetase putative gb AE015451.1 :1270312-1271100	1.89
PP5327	phosphate ABC transporter permease protein gb AE015451.1 :c6074246-6072576	1.87
PP5257	oxidoreductase FAD-binding gb AE015451.1 :c6002279-6000993	1.86
PP5321	sensory box histidine kinase PhoR gb AE015451.1 :6065868-6067175	1.8
PP2668	ABC efflux transporter ATP-binding protein gb AE015451.1 :c3056358-3055618	1.58
PP1000	ornithine carbamoyltransferase catabolic gb AE015451.1 :c1139642-1138632	1.53
PP5328	phosphate ABC transporter permease protein gb AE015451.1 :c6076273-6074264	1.505
PP1039	Sec-independent periplasmic protein translocator TatC gb AE015451.1 :c1189811-1189050	1.47
PP0153	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :c161965-161750	1.45
PP1112	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :1271097-1272308	1.45
PP5325	phosphate transport system regulatory protein PhoU gb AE015451.1 :c6071568-6070798	1.38
PP0234	porin E gb AE015451.1 :288581-289915	1.18
PP0999	carbamate kinase gb AE015451.1 :c1138467-1137538	1.17

## Anexo

PP5217	polyphosphate kinase gb AE015451.1 :c5952947-5950764	1.17
PP5008	polyhydroxyalkanoate granule-associated protein GA1 gb AE015451.1 :c5705793-5705374	1.03
PP1568	hypothetical protein gb AE015451.1 :1762135-1762359	0.93
PP1625	ferredoxin 4Fe-4S gb AE015451.1 :c1822535-1822212	0.93
PP4375	flagellar biosynthetic protein FliS gb AE015451.1 :c4966234-4965839	0.92

Genes reprimidos en *P. putida crp* respecto al control. El valor M indica un promedio entre los dos valores M de cada gen. Los genes están ordenados según el valor M.

ID	Name	M
PP4756	amino acid permease gb AE015451.1 :c5415774-5414383	-3.6
PP1017	sugar ABC transporter permease protein gb AE015451.1 :1160187-1161032	-3.29
PP0323	sarcosine oxidase beta subunit gb AE015451.1 :388128-389378	-3.115
PP1059	amino acid permease gb AE015451.1 :1209390-1210808	-3.05
PP1015	sugar ABC transporter periplasmic sugar-binding prot gb AE015451.1 :1157866-1159152	-2.95
PP1019	porin B gb AE015451.1 :1162231-1163574	-2.76
PP4665	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :5291424-5291768	-2.74
PP0315	Rieske 2Fe-2S family protein gb AE015451.1 :c379412-378120	-2.71
PP1741	glycine betaine-binding protein putative gb AE015451.1 :1941456-1942319	-2.46
PP1016	sugar ABC transporter permease protein gb AE015451.1 :1159286-1160194	-2.45

PP5279	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :6029648-6030007	-2.38
PP0296	glycine betaine/L-proline ABC transporter periplasmi gb AE015451.1 :c356201-355254	-2.37
PP0310	oxidoreductase FMN-binding gb AE015451.1 :370518-372578	-2.35
PP3747	glycolate oxidase iron-sulfur subunit gb AE015451.1 :4276603-4277838	-2.35
PP0326	sarcosine oxidase gamma subunit gb AE015451.1 :392814-393446	-2.33
PP1018	sugar ABC transporter ATP-binding subunit gb AE015451.1 :1161036-1162190	-2.31
PP0308	dipeptidase putative gb AE015451.1 :368919-369896	-2.29
PP4435	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :5032480-5032833	-2.24
PP3504	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :3974810-3975076	-2.02
PP2183	formate dehydrogenase gamma subunit putative gb AE015451.1 :2488543-2489025	-2
PP3745	glycolate oxidase subunit GlcD gb AE015451.1 :4274042-4275541	-2
PP0328	formaldehyde dehydrogenase glutathione-independent gb AE015451.1 :394617-395816	-1.95
PP1024	2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-gb AE015451.1 :1167774-1168481	-1.9
PP3628	choline/carnitine/betaine transporter family protein gb AE015451.1 :4123522-4125267	-1.85
PP3437	CBS domain protein gb AE015451.1 :c3895055-3893484	-1.77
PP0325	sarcosine oxidase alpha subunit gb AE015451.1 :389725-392739	-1.75
PP3155	outer membrane ferric siderophore receptor putative gb AE015451.1 :c3575341-3573212	-1.74
PP0313	electron transfer flavoprotein beta subunit putativ	-1.72

Anexo

	gb AE015451.1 :375952-376722	
PP5130	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :c5853727-5852672	-1.705
PP0311	iron-sulfur cluster-binding protein gb AE015451.1 :372757-374709	-1.69
PP4652	membrane protein putative gb AE015451.1 :5277038-5278258	-1.63
PP3122	CoA-transferase subunit A putative gb AE015451.1 :3533320-3534018	-1.62
PP0312	electron transfer flavoprotein alpha subunit gb AE015451.1 :374955-375941	-1.6
PP0327	formyltetrahydrofolate deformylase gb AE015451.1 :393458-394315	-1.58
PP3754	beta-ketothiolase gb AE015451.1 :4283396-4284580	-1.57
PP3808	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :c4335766-4335545	-1.55
PP3801	cation ABC transporter periplasmic cation-binding pr gb AE015451.1 :4329654-4330556	-1.53
PP0881	dipeptide ABC transporter permease protein gb AE015451.1 :c1021984-1020974	-1.51
PP3749	hypothetical protein gb AE015451.1 :4278192-4278707	-1.46
PP1014	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :1156511-1157761	-1.45
PP2411	major facilitator family transporter gb AE015451.1 :c2758188-2756851	-1.44
PP2337	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :2666789-2667979	-1.435
PP3559	amino acid transporter permease protein putative gb AE015451.1 :4038148-4039047	-1.36
PP3951	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A gb AE015451.1 :4457362-4458057	-1.36
PP5307	ferric siderophore transport system inner membrane p gb AE015451.1 :6054614-6055042	-1.36

PP0894	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :c1036178-1035780	-1.34
PP4244	ferric regulator PfrI gb AE015451.1 :4831494-4832024	-1.34
PP5308	ferric siderophore transport system periplasmic bind gb AE015451.1 :6055039-6055770	-1.34
PP2136	fatty oxidation complex alpha subunit gb AE015451.1 :2437078-2439225	-1.33
PP3799	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :4328751-4329071	-1.33
PP3125	transcriptional regulator Cro/CI family gb AE015451.1 :3536360-3536902	-1.32
PP4736	L-lactate dehydrogenase gb AE015451.1 :5385268-5386413	-1.32
PP0913	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :c1055829-1054498	-1.31
PP3925	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :4430229-4431296	-1.3
PP5029	formiminoglutamase gb AE015451.1 :c5731330-5730527	-1.3
PP3123	CoA-transferase subunit B putative gb AE015451.1 :3534054-3534710	-1.29
PP3295	YeeE/YedE family protein gb AE015451.1 :3729028-3729507	-1.28
PP3756	transcriptional regulator TetR family gb AE015451.1 :4285455-4286036	-1.26
PP4350	aminotransferase class V NifS/IscS family gb AE015451.1 :4942565-4943728	-1.26
PP5178	putrescine ABC transporter permease protein gb AE015451.1 :c5905652-5904732	-1.26
PP5269	alanine racemase catabolic gb AE015451.1 :c6019190-6018117	-1.25
PP4434	D-amino acid dehydrogenase small subunit gb AE015451.1 :5031207-5032505	-1.23
PP0324	sarcosine oxidase delta subunit gb AE015451.1 :389393-	-1.2

## Anexo

	389728	
PP1020	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :1163692-1164546	-1.2
PP4067	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase putative gb AE015451.1 :4591739-4593691	-1.17
PP4636	beta-ketothiolase gb AE015451.1 :5259457-5260635	-1.16
PP4064	isovaleryl-CoA dehydrogenase gb AE015451.1 :4588022-4589296	-1.125
PP0785	cysZ protein gb AE015451.1 :c901279-900551	-1.11
PP5317	chorismate-pyruvate lyase putative gb AE015451.1 :6063103-6063660	-1.11
PP4179	heat shock protein HtpG gb AE015451.1 :c4723562-4721658	-1.105
PP0895	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :1036294-1036884	-1.1
PP1382	membrane protein putative gb AE015451.1 :c1575010-1574486	-1.1
PP1009	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gb AE015451.1 :c1151009-1150008	-1.08
PP1960	hypothetical protein gb AE015451.1 :c2221622-2220300	-1.07
PP5067	potassium efflux system protein KefA putative gb AE015451.1 :5781517-5784825	-1.07
PP5096	YGGT family protein gb AE015451.1 :5819552-5820142	-1.07
PP1502	OmpA family protein gb AE015451.1 :c1708111-1707320	-1.06
PP3784	conserved domain protein gb AE015451.1 :4311279-4312430	-1.045
PP4149	peptide ABC transporter permease protein gb AE015451.1 :4688098-4689117	-1.025
PP4735	L-lactate transporter gb AE015451.1 :5383535-5385205	-1
PP1938	hypothetical protein gb AE015451.1 :2192592-2192903	-0.99
PP2087	cmpX protein gb AE015451.1 :2378718-2379542	-0.985



PP3544	transcriptional regulator GntR family gb AE015451.1 :4016096-4017505	-0.98
PP4460	transcriptional regulator LysR family gb AE015451.1 :5062617-5063543	-0.98
PP5179	putrescine ABC transporter ATP-binding protein gb AE015451.1 :c5906791-5905649	-0.975
PP0556	acetoin catabolism protein gb AE015451.1 :c646092-645037	-0.94
PP5030	imidazolonepropionase gb AE015451.1 :c5732546-5731341	-0.94
PP2437	acyl-CoA dehydrogenase putative gb AE015451.1 :2783545-2784789	-0.93
PP3933	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :c4439025-4438264	-0.93
PP5148	conserved hypothetical protein gb AE015451.1 :c5874499-5874074	-0.875
PP0835	protein-export membrane protein SecD gb AE015451.1 :971707-973569	-0.855
PP0880	dipeptide ABC transporter permease protein gb AE015451.1 :c1020963-1020037	-0.88

### Anexo Parte III: Tabla de resultados CHIP to CHIP

Todas las Orfs que fueron inmunoprecipitadas y luego identificadas por medio del MicroChip de ADN, se detallan en la siguiente tabla. Han sido ordenadas de acuerdo a su función descrita en TIGR.

Nombre del gen	TIGR Cellular role(s):
PP0300 metallopeptidase, putative	Unknown function: Enzymes of unknown specificity
PP1951 oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family	Unknown function: Enzymes of unknown specificity
PP3328 ring-cleaving dioxygenase, putative	Unknown function: Enzymes of unknown specificity
PP4463 carbon-nitrogen hydrolase family protein	Unknown function: Enzymes of unknown specificity
PP0651 acetyltransferase, GNAT family	Unknown function
PP1937 helicase, putative	Unknown function
PP1952 metallo-beta-lactamase family protein	Unknown function
PP4450 phosphoglycerate mutase family protein	Unknown function
PP4452 NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase family protein	Unknown function
PP2382 Transport and binding proteins	Transport and binding proteins: Unknown substrate
PP4461 major facilitator family transporter	Transport and binding proteins: Unknown substrate
PP0037 oprP, porin P	Transport and binding proteins: Porins
PP3656 aromatic compound-specific porin, putative	Transport and binding proteins: Porin. COMMENT: Appears to be in an operon of genes involved in the import and degradation of an

	aromatic compound.
PP3849 m-binding protein, hemolysin-type	Transport and binding proteins: Cations and iron carrying compounds
PP3025 transporter, LysE family	Transport and binding proteins: Amino acids, peptides and amines
PP3845 ABC transporter, periplasmic polyamine-binding protein, putative	Transport and binding proteins: Amino acids, peptides and amines
PP4427 amino acid ABC transporter, permease protein	Transport and binding proteins: Amino acids, peptides and amines
PP4433 amino acid MFS transporter	Transport and binding proteins: Amino acids, peptides and amines
PP4425 amino acid ABC transporter, ATP- binding protein	Transport and binding proteins, Amino acids, peptides and amines
PP0046 porin, putative	Transport and binding proteins
PP1779 lipopolysaccharide ABC export system, ATP-binding protein	Transport and binding proteins
PP4465 porin, putative	Transport and binding proteins
PP2101 DNA-binding response regulator, LuxR family	Regulatory functions: DNA interactions, Signal transduction: Two-component systems
PP0636 cold shock DNA-binding domain protein	Regulatory functions: DNA interactions Adaptations to atypical conditions
PP1942 transcriptional regulator, LysR family	Regulatory functions: DNA interactions
PP3159 , benR, benABC operon transcriptional activator BenR	Regulatory functions: DNA interactions
PP3779 transcriptional regulator, LysR family	Regulatory functions: DNA interactions
PP4424 transcriptional regulator, AsnC family	Regulatory functions: DNA interactions

## Anexo

PP4460 transcriptional regulator, LysR family	Regulatory functions: DNA interactions
PP4464 transcriptional regulator, LysR family	Regulatory functions: DNA interactions
PP3689 serine/threonine protein phosphatase, putative	Regulatory functions, Protein interactions
PP2947 transcriptional regulator MvaT, P16 subunit, putative	Regulatory functions, DNA interactions
PP4467 transcriptional regulator, LysR family	Regulatory functions, DNA interactions
PP4476 transcriptional regulator, LysR family	Regulatory functions, DNA interactions
PP0036 transcriptional regulator, putative	Regulatory functions
PP1366 transcriptional regulator MvaT, P16 subunit	Regulatory functions
PP1935 transcriptional regulator, Cro/CI family	Regulatory functions
PP3693 transcriptional regulator MvaT, P16 subunit, putative	Regulatory functions
PP3896 transcriptional regulator, Cro/CI family	Regulatory functions
PP4345 transcriptional regulator, GntR family	Regulatory functions
PP1943 formyltetrahydrofolate deformylase purU-3	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides: Purine ribonucleotide biosynthesis
PP4927 toxin secretion ABC transporter protein, HlyB family	Protein fate: Protein and peptide secretion and trafficking
PP4240 microcin b17 processing protein mcbd, putative	Protein fate: Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides
PP3986 ISPpu13, transposase Orf1	Mobile and extrachromosomal element functions: Transposon functions
PP5404 transposition protein, TnsC-related	Mobile and extrachromosomal element functions: Transposon

protein	functions
PP5405 transposase, TnsB-related protein	Mobile and extrachromosomal element functions: Transposon functions
PP2268 phage endodeoxyribonuclease I	Mobile and extrachromosomal element functions: Prophage functions
PP3987 site-specific recombinase, phage integrase family	Mobile and extrachromosomal element functions: Prophage functions
PP4409 site-specific recombinase, phage integrase family	Mobile and extrachromosomal element functions: Prophage functions
PP2270 DNA primase/helicase	Mobile and extrachromosomal element functions: Prophage function
PP3968 ISPpu13, transposase Orf2	Mobile and extrachromosomal element functions, Transposon functions
PP4024 ISPpu15, transposase Orf1	Mobile and extrachromosomal element functions, Transposon functions
PP0638 ISPpu15, transposase Orf1	Mobile and extrachromosomal element functions
PP4092 ISPpu15, transposase Orf1	Mobile and extrachromosomal element functions
PP1778 lipopolysaccharide ABC export system, ATP-binding protein	lipopolysaccharide ABC export system, permease protein
PP0731 phosphatidylserine synthase, putative	Fatty acid and phospholipid metabolism: Biosynthesis
PP2973 dgkA-2, diacylglycerol kinase	Fatty acid and phospholipid metabolism, Biosynthesis
PP4347 hypothetical protein	Esta al lado de ddlA, D-alanine--D-alanine ligase A, role, Cell envelope: Biosynthesis and degradation of murein sacculus and

## Anexo

	peptidoglycan
PP4242 conserved domain protein	Esta al lado de PP4243 pyoverdine synthetase
PP1957 oxidoreductase, Pdr/VanB family	Energy metabolism: Other
PP3657 nitrobenzoate reductase, putative	Energy metabolism: Other
PP4462 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase, putative	Energy metabolism: Other
PP5267 cytochrome c5	Energy metabolism: Electron transport
PP1944 aminomethyltransferase, putative	Energy metabolism: Amino acids and amines
PP4434, dadA-1, D-amino acid dehydrogenase, small subunit	Energy metabolism: Amino acids and amines
PP1948 benzaldehyde dehydrogenase	Energy metabolism, Fermentation
PP0649 MutT/nudix family protein	DNA metabolism: DNA replication, recombination, and repair
PP1116 site-specific recombinase, resolvase family	DNA metabolism: DNA replication, recombination, and repair
PP1962 site-specific recombinase, phage integrase family	DNA metabolism: DNA replication, recombination, and repair  Mobile and extrachromosomal element functions: Prophage functions
PP4742, hsdS, type I restriction-modification system, S subunit	DNA metabolism, Restriction/modification
PP3026 phage recombinase, putative	DNA metabolism, DNA replication, recombination, and repair
PP4466 dioxygenase, TauD/TfdA family	Central intermediary metabolism: Other
PP1306 S-type pyocin family protein	Cellular processes: Toxin production and resistance
PP3781 oxygen-independent	Cellular processes: Toxin

Coproporphyrinogen III oxidase family protein	production and resistance
PP0047 DNA-binding heavy metal response regulator, putative	Cellular processes: Detoxification  Regulatory functions: DNA interactions  Signal transduction: Two-component systems
PP1940 methyl-accepting chemotaxis transducer	Cellular processes: Chemotaxis and motility
PP0045 cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter, outer membrane protein, CzcC family	Cellular processes, Detoxification
PP3786 aminotransferase	Cellular processes ,Toxin production and resistance
PP1890 type 1 pili chaperone protein FimC	Cell envelope: Surface structures, Protein fate: Protein folding and stabilization, Cellular processes: Cell adhesion
PP1891 fiml, type 1 pili subunit Fiml	Cell envelope: Surface structures, Cellular processes: Cell adhesion
PP2974 membrane protein, putative	Cell envelope: Other
PP0034 glycosyl transferase, group 2 family protein	Cell envelope: Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharide
PP1786 glycosyl transferase, putative	Cell envelope: Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides
PP1806 KpsF/GutQ family protein	Cell envelope: Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides
PP2269 N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, putative	Cell envelope: Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and

## Anexo

	lipopolysaccharides  Mobile and extrachromosomal element functions: Prophage functions
PP4346 ddlA, D-alanine--D-alanine ligase A	Cell envelope, Biosynthesis and degradation of murein sacculus and peptidoglycan
PP1790 acylneuraminate cytidyltransferase, putative	Cell envelope , Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides
PP3305 membrane protein, TerC family	Cell envelope
PP1945 olD-1, 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolas	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers: Folic acid
PP3658 aromatic compound MFS transporter, putative	aromatic compound MFS transporter, putative
PP1110 serine O-acetyltransferase, putative	Amino acid biosynthesis: Serine family
PP3778 pyrroline-5-carboxylate reductase, putative	Amino acid biosynthesis: Glutamate family
PP4348 cystathionine beta-lyase, putative	Amino acid biosynthesis: Aspartate family
PP0374 hypothetical protein	Al lado esta PP0372 acetylornithine aminotransferase, putative
PP1941 hypothetical protein	
PP0028 conserved hypothetical protein	
PP0031 hypothetical protein	
PP0032 hypothetical protein	
PP0035 GtrA family protein	
PP0042 conserved hypothetical protein	
PP0048 hypothetical protein	



PP0299 conserved hypothetical protein
PP0329 hypothetical protein
PP0330 conserved hypothetical protein
PP0331 hypothetical protein
PP0331 hypothetical protein
PP0536 hypothetical protein
PP0639 hypothetical protein
PP0640 hypothetical protein
PP0646 hypothetical protein
PP0647 hypothetical protein
PP0648 conserved hypothetical protein
PP0650 conserved hypothetical protein
PP0727 conserved hypothetical protein
PP0728 conserved hypothetical protein
PP0780 hypothetical protein
PP0782 conserved hypothetical protein
PP0783 hypothetical protein
PP0784 hypothetical protein
PP1117 Hipotetical protein
PP1136 conserved hypothetical protein
PP1514 conserved domain protein
PP1745 oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family
PP1754 conserved hypothetical protein
PP1787 hypothetical protein
PP1788 hypothetical protein

## Anexo

PP1789 hydrolase, haloacid dehalogenase-like family
PP1809 hypothetical protein
PP1809 hypothetical protein
PP1818 hypothetical protein
PP1884 hypothetical protein
PP1887 hypothetical protein
PP1920 hypothetical protein
PP1921 hypothetical protein
PP1922 hypothetical protein
PP1925 monooxygenase, putative
PP1936 hypothetical protein
PP1938 hypothetical protein
PP1946 oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family
PP1947 conserved hypothetical protein
PP1950 conserved hypothetical protein
PP1954 conserved hypothetical protein
PP1955 cytochrome P450 family protein
PP1956 hypothetical protein
PP1958 hypothetical protein
PP1959 hypothetical protein
PP1960 hypothetical protein
PP1961 Hypothetical Proteins
PP1963 hypothetical protein
PP1963 hypothetical protein

PP2062 conserved hypothetical protein
PP2075 hypothetical protein
PP2075 hypothetical protein
PP2227 multicomponent potassium-proton antiporter, subunit E, putative
PP2277 hypothetical protein
PP2278 hypothetical protein
PP2291 hypothetical protein
PP2292 hypothetical protein
PP2294 hypothetical protein
PP2611 hypothetical protein
PP2612 hypothetical protein
PP2684 hypothetical protein
PP2770 conserved hypothetical protein
PP2809 hypothetical protein
PP2950 conserved hypothetical protein
PP2980 conserved hypothetical protein
PP3012 hypothetical protein
PP3012 hypothetical protein
PP3024 hypothetical protein
PP3067 hypothetical protein
PP3102 conserved hypothetical protein
PP3104 hypothetical protein
PP3105 hypothetical protein
PP3105 hypothetical protein
PP3110 hypothetical protein

## Anexo

PP3113 ISPpu13, transposase Orf1
PP3160 hypothetical protein
PP3389 hypothetical protein
PP3468 hypothetical protein
PP3469 hypothetical protein
PP3471 hypothetical protein
PP3536 hypothetical protein
PP3616 hypothetical protein
PP3618 hypothetical protein
PP3619 hypothetical protein
PP3676 hypothetical protein
PP3677 hypothetical protein
PP3678 hypothetical protein
PP3679 hypothetical protein
PP3680 hypothetical protein
PP3684 hypothetical protein
PP3686 hypothetical protein
PP3690 hypothetical protein
PP3694 hypothetical protein
PP3695 conserved hypothetical protein
PP3699 hypothetical protein
PP3700 hypothetical protein
PP3701 hypothetical protein
PP3704 hypothetical protein
PP3705 hypothetical protein

PP3706 conserved hypothetical protein
PP3707 Hipotetical protein
PP3708 Hipotetical protein
PP3709 Hypothetical Proteins
PP3710 hypothetical protein
PP3780 hypothetical protein
PP3782 hypothetical protein
PP3783 conserved hypothetical protein
PP3846 carbon-nitrogen hydrolase family protein
PP3850 hypothetical protein
PP3851 hypothetical protein
PP3852 hypothetical protein
PP3988 hypothetical protein
PP4022 conserved domain protein
PP4027 hypothetical protein
PP4028 hypothetical protein
PP4047 hypothetical protein
PP4086 conserved domain protein
PP4087 conserved domain protein
PP4094 conserved hypothetical protein
PP4227 conserved domain protein
PP4228 hypothetical protein
PP4241 conserved domain protein
PP4349 hypothetical protein
PP4350 aminotransferase, class V, NifS/IscS

## Anexo

family
PP4410 hypothetical protein
PP4410 hypothetical protein
PP4412 hypothetical protein
PP4422 succinate-semialdehyde dehydrogenase, putative
PP4423 conserved hypothetical protein
PP4435 conserved hypothetical protein
PP4447 hypothetical protein
PP4448 conserved hypothetical protein
PP4488 conserved hypothetical protein
PP4743 hypothetical protein
PP4746 ISPpu15, transposase Orf1
PP4883 hypothetical protein
PP4885 hypothetical protein
PP4886 conserved hypothetical protein
PP4925 hypothetical protein
PP5129 conserved hypothetical protein
PP5238 conserved hypothetical protein
PP5401 hypothetical protein