

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



DISEÑO DE CIRCUITOS GENÉTICOS PARA LA TRADUCCIÓN DE REACCIONES QUÍMICAS EN FENOTIPOS SELECCIONABLES (*Trampas Genéticas*), BASADOS EN LA INTERACCIÓN ENTRE REGULADORES TRANSCRIPCIONALES Y SUS MOLÉCULAS EFECTORAS.

TESIS DOCTORAL

Carlos Álvarez Carreño

Memoria presentada por Carlos Álvarez Carreño para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de la Tesis Doctoral:

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

Este trabajo fue realizado en el Centro Nacional de Biotecnología y ha sido financiado en parte por una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU-2005) del Ministerio de Educación y Ciencia.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	10
ABREVIATURAS	11
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN	15
1. Genotecas Metagenómicas.	17
1.1 Genotecas en fago <i>lambda</i> .	18
1.2 Genotecas en plásmidos, cósmidos y/o fósmidos.	18
1.3 Genotecas de cromosomas artificiales bacterianos (BACs).	18
2. Análisis de Genotecas Metagenómicas.	19
2.1 Análisis por secuencia para la búsqueda de actividades enzimáticas en genotecas metagenómicas.	20
2.2 Análisis por función para la búsqueda de actividades enzimáticas en genotecas metagenómicas.	22
2.2.1 Tamizado basado en crecimiento condicional.	23
2.2.2 Tamizado basado en el uso de sustratos/productos cromogénicos.	25
2.2.3 Tamizado por SIGEX (<i>Substrate-Induced Gene Expression</i>).	26
3. Trampas Genéticas.	27
3.1 Los reguladores transcripcionales.	30
3.2 Los genes informadores.	31
3.2.1 El gen de la β -galactosidasa (<i>lacZ</i>).	31
3.2.2 El gen de la proteína verde fluorescente (<i>gfp</i>).	31
3.2.3 Los genes <i>luxCDABE</i> de bioluminiscencia (<i>lux</i>).	31
3.3 <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas putida</i> como organismos receptores de las trampas genéticas.	32

Índice

3.4 Sistemas de inserción de reguladores transcripcionales, promotores y genes informadores en bacterias.	33
3.4.1 Sistema <i>attB/attP</i> de las integrasas de fagos.	33
3.4.2 Minitransposones mini-Tn5 y mini-Tn7.	34
4. La interacción entre moléculas efectoras y reguladores transcripcionales como elementos clave en la construcción de trampas genéticas.	35
4.1 El regulador transcripcional XylR y su interacción con el efector.	35
4.2 Modelo estructural del extremo N-terminal de XylR.	36
4.3 Caracterización de la unión entre XylR y su efector: Entrecruzamiento químico.	38
4.3.1 El bromuro de bencilo como efector funcionalizado.	38
4.3.2 Hipótesis de la reactividad de bromuro de bencilo y con los aminoácidos de XylR.	39
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Cepas y plásmidos.	47
2. Medios y condiciones de cultivo.	51
2.1 Condiciones de inducción con efector en medio líquido.	51
2.2 Condiciones de inducción con efector en medio sólido.	51
3. Manipulación de ácidos nucleicos.	53
3.1 Técnicas generales.	53
3.2 Secuenciación de ADN.	53
3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	53
4. Construcción del plásmido pCAC5 y derivados.	54
5. Manipulaciones genéticas.	56
5.1 Técnicas genéticas en <i>E. coli</i> .	56
5.2 Técnicas genéticas en <i>P. putida</i> .	56
6. Construcción de cepas informadoras de <i>P. putida</i> .	57
7. Inserción de reguladores transcripcionales y promotores en cepas informadoras de <i>P. putida</i> .	57

8. Eliminación de los genes de resistencia a antibióticos en las cepas derivadas de <i>P. putida</i> KT2440.	58
9. Eliminación del extremo derecho del transposón Tn7 en las cepas <i>P. putida</i> KTMoOx- Δ R, <i>P. putida</i> KTDBT- Δ R, <i>P. putida</i> KTBx- Δ R, <i>P. putida</i> KTBx5- Δ R, <i>P. putida</i> KTDntR- Δ Gm, <i>P. putida</i> KT2MoOxLUX, <i>P. putida</i> KT2DBTLUX, <i>P. putida</i> KT2Bx5LUX y <i>P. putida</i> KT2DntRLUX.	60
10. Ensayos de bioluminiscencia de las cepas <i>P. putida</i> para comprobar su capacidad biosensora.	60
10.1 Ensayos en medio líquido.	60
10.2 Ensayos en medio sólido.	61
11. Ensayos de la cepas <i>P. putida</i> para comprobar su capacidad como trampas genéticas.	62
11.1 Movilización de plásmidos como controles positivos y negativos de las trampas genéticas.	62
11.2 Registro de la Bioluminiscencia Específica en medio líquido.	62
11.3 Registro de la bioluminiscencia en medio sólido.	62
12. Cálculo de la eficacia de las trampas genéticas.	62
13. Medición y cálculo de la Bioluminiscencia Específica.	63
14. Ensayos de actividad β -galactosidasa en la cepa <i>E. coli</i> CC118 <i>Pu-lacZ</i> .	64
15. Ensayos de registro de Bioluminiscencia Específica en la cepa <i>P. putida</i> KTBx en presencia y ausencia de <i>m</i> -xileno y bromuro de bencilo en función del tiempo.	64
16. Cálculo de la velocidad de producción de Bioluminiscencia Específica de la cepa <i>P. putida</i> KTBx.	64
17. Purificación de la proteína XylR-His.	65
18. Reacción de la proteína XylR-His con bromuro de bencilo.	66
19. Identificación y secuencia de los péptidos marcados.	66
RESULTADOS	69
1. Diseño y construcción de un sistema de dos transposones Tn5/Tn7 para la implantación de trampas genéticas y biosensores en bacterias Gram-negativas.	71

Índice

1.1 Construcción de los vectores pTn5LacZ, pTn5Lux y pTn5GFP para la inserción de genes informadores mediante el transposón mini-Tn5.	72
1.2 Construcción del vector pCAC5 para la inserción de reguladores transcripcionales y promotores mediante el transposón mini-Tn7.	72
1.3 Eliminación de los marcadores de presión selectiva.	72
1.4 Activación de la fusión transcripcional promotor/gen informador	73
2. Trampa genética para la identificación de monooxigenasas de anillo.	75
2.1 El regulador transcripcional DmpR.	75
2.2 Construcción de la trampa genética para monooxigenasas de anillo en la cepa <i>P. putida</i> KT2440.	76
2.3 Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTMoOx como biosensor de fenol.	77
2.4 Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTMoOx como trampa genética para monooxigenasas de anillo.	78
3. Trampa genética para la identificación de actividades de biodesulfurización de dibenzotiofeno.	79
3.1 Los reguladores transcripcionales HbpR y HbpRCBP6.	80
3.2 Construcción de la trampa genética para actividades de biodesulfurización de dibenzotiofeno en la cepa <i>P. putida</i> KT0LUX.	81
3.3 Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTDBT como biosensor de 2-hidroxibifenilo.	81
3.4 Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTDBT como trampa genética para la identificación de actividades de biodesulfurización de dibenzotiofeno.	81
4. Trampa genética para la identificación de actividades de dehidroclorinación de lindano.	83
4.1 El regulador transcripcional XylR5.	84
4.2 Construcción de una trampa genética para la identificación de actividades de dehidroclorinación de lindano en la cepa de <i>P. putida</i> KT0LUX.	84
4.3 Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTBx5 como biosensor de 1,2,4-TCB.	84
4.4 Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTBx5 como trampa genética para la identificación de actividades de dehidroclorinación de γ -HCH.	85
5. Biosensor para la detección de salicilato como intermedio en las rutas de degradación de antraceno y naftaleno.	86

	Índice
5.1 El regulador transcripcional DntR.	87
5.2 Construcción de un biosensor de salicilato en la cepa <i>P. putida</i> KT0LUX.	87
5.3 Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTDntR como biosensor de salicilato.	88
6. Entrecruzamiento químico de la proteína XylR y bromuro de bencilo.	88
6.1 Evidencias <i>in vivo</i> de la interacción entre bromuro de bencilo y la proteína XylR.	88
6.1.1 Ensayos de actividad β -galactosidasa con XylR.	89
6.1.2 Ensayos de actividad β -galactosidasa con la proteína XylR-His.	91
6.1.3 Ensayos de registro de Bioluminiscencia Específica en la cepa <i>P. putida</i> KTBx en presencia y ausencia de <i>m</i> -xileno y bromuro de bencilo.	93
6.2 Evidencia <i>in vitro</i> de la interacción de la proteína XylR-His con bromuro de bencilo.	95
6.2.1 Resultados del análisis de espectrometría de masas de la proteína XylR-His antes y después de la reacción con bromuro de bencilo.	96
6.2.2 Mapeo de los aminoácidos marcados en el modelo del dominio A de XylR.	98
DISCUSIÓN	103
1. Trampas genéticas.	105
1.1 Las genotecas metagenómicas y los hospedadores bacterianos.	105
1.2 El sistema de dos transposones: Eficacia y ortogonalidad.	107
1.3 El sistema de dos transposones: Dos inserciones frente a una transposición.	107
1.4 Los reguladores transcripcionales, los promotores y los genes informadores.	108
1.5 Las tres trampas genéticas y un biosensor.	108
1.6 Perspectivas futuras.	109
2. Entrecruzamiento químico.	110
2.1 Experimentos <i>in vivo</i> : Actividad β -galactosidasa.	111

Índice

2.2 Experimentos de cinética de producción de bioluminiscencia.	112
2.3 Experimentos <i>in vitro</i> : XylR-His con bromuro de bencilo.	112
2.4 El modelo del dominio A de XylR y el entrecruzamiento químico.	115
2.5 Perspectivas futuras.	116
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXO	135
Anexo I: Inserción de circuitos genéticos en <i>E. coli</i>.	137
1. Cepas de <i>E. coli</i> .	137
2. Construcción de cepas informadoras de <i>E. coli</i> .	138
3. Inserción de reguladores transcripcionales y promotores en cepas informadoras de <i>E. coli</i> .	138
4. Eliminación del extremo derecho del transposón Tn7 en las cepas <i>E. coli</i> JSBx-LacZ, <i>E. coli</i> XLODmpR-LacZ y <i>E. coli</i> XLBDmpR-LacZ..	138
Anexo II: Interacción entre bromuro de bencilo y la proteína de fusión MBP-XylR.	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Construcción y análisis de una genoteca metagenómica.	21
Fig. 2	Línea temporal de proyectos metagenómicos basados en análisis de secuencia.	23
Fig. 3	Ventajas y desventajas de los análisis por secuencia y por función de actividades enzimáticas en genotecas metagenómicas.	24
Fig. 4	Ejemplos de análisis de función por tamizado con sustratos/productos cromogénicos.	27
Fig. 5	Esquema de una trampa genética.	29
Fig. 6	Los genes informadores <i>lacZ</i> , <i>gfp</i> y <i>lux</i> .	32
Fig. 7	Modelo del dominio A de XylR.	37
Fig. 8	Estructura de tolueno y bromuro de bencilo.	39
Fig. 9	Hipótesis de la reacción de entrecruzamiento entre un residuo cisteína de XylR y bromuro de bencilo.	40
Fig. 10	Estructura química de los distintos reactivos usados en los ensayos de inducción.	52
Fig. 11	Mapa del vector suicida pCAC5.	55
Fig. 12	Esquema de la inserción cromosómica de los segmentos Tn5LacZ, Tn5LUX y Tn5GFP.	58
Fig. 13	Eliminación de las resistencias a Km y Gm en la cepa <i>P. putida</i> KTMoOxLUX.	59
Fig. 14	Eliminación del extremo derecho del transposón Tn7 en cepas con fusión transcripcional <i>Pu-lux</i> .	61
Fig. 15	Identificación de clones positivos usando la trampa genética para monooxigenasas de anillo.	63
Fig. 16	Esquema del análisis por espectrometría de masas de los aminoácidos modificados por la reacción con bromuro de bencilo.	67
Fig. 17	Esquema del sistema de dos transposones Tn5/Tn7 para la implantación de trampas genéticas en bacterias Gram-negativas.	71
Fig. 18	Diseño de las herramientas genéticas para la implantación de trampas genéticas.	74

Índice de Figuras

Fig. 19	Construcción de la cepa <i>P. putida</i> KTMoOx.	77
Fig. 20	Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTMoOx como biosensor de fenol.	78
Fig. 21	Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTMoOx como trampa genética para monooxigenasas de anillo.	79
Fig. 22	Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTDBT como biosensor de 2-HBP.	82
Fig. 23	Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTDBT como trampa genética para la identificación de actividades de biodesulfurización de DBT.	83
Fig. 24	Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTBx5 como biosensor de 1,2,4-TCB.	85
Fig. 25	Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTBx5 como trampa genética para la identificación de actividades de dehidroclorinación de γ -HCH.	86
Fig. 26	Validación de la cepa <i>P. putida</i> KTDntR como biosensor de ácido salicílico.	88
Fig. 27	Evidencias <i>in vivo</i> de la interacción de XylR y MBP-XylR con <i>m</i> -xileno y bromuro de bencilo.	90
Fig. 28	Actividad β -galactosidasa de la cepa <i>E. coli</i> CC118 <i>Pu-lacZ</i> (pCON916) en distintas condiciones de exposición a <i>m</i> -xileno y Br [^] Ph.	90
Fig. 29	Evidencias <i>in vivo</i> de la interacción de XylR y XylR-His con <i>m</i> -xileno y bromuro de bencilo.	92
Fig. 30	Registro de la producción de Bioluminiscencia Específica de la cepa <i>P. putida</i> KTBx en función del tiempo.	94
Fig. 31	Determinación de la relación de competitividad o acompetitividad entre <i>m</i> -xileno y bromuro de bencilo.	95
Fig. 32	Mapeo de los residuos R118 y C175 en el modelo del dominio A de XylR.	98
Fig. 33	Mapeo de los distintos residuos modificados en el modelo del dominio A de XylR.	100

Fig. 34	Toma de muestras para la construcción de genotecas metagenómicas.	110
Fig. 35	Esquema de la estructura modular de XylR y los aminoácidos marcados en los distintos dominios.	114
Fig. 36	Mapeo de residuos interaccionantes con el efector y marcados con bromuro de bencilo en la superficie del modelo estructural del dominio A de XylR.	116
Fig. 37	Evidencias <i>in vivo</i> de la interacción de XylR y MBP-XylR con <i>m</i> -xileno y bromuro de bencilo.	141
Fig. 38	Actividad β -galactosidasa de las cepas <i>E. coli</i> CC118 <i>Pu-lacZ</i> (pMalC2TXylR) en distintas condiciones de exposición a <i>m</i> -xileno y Br [^] Ph.	142

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Número de especies estimadas (y accesibles) en la Naturaleza.	19
Tabla 2	Cepas de <i>Escherichia coli</i> .	47
Tabla 3	Cepas de <i>Pseudomonas putida</i> .	47
Tabla 4	Plásmidos.	48
Tabla 5	Oligonucleótidos empleados en este trabajo para reacciones de PCR y secuenciación de plásmidos.	54
Tabla 6	Vectores derivados de pCAC5 con los reguladores transcripcionales y los promotores.	56
Tabla 7	Aminoácidos en XylR susceptibles de reaccionar con bromuro de bencilo e incremento de masa (Da) aportada por la modificación tras la reacción.	66
Tabla 8	Secuencia y longitud de los péptidos cuya masa ha sido modificada por reacción de alguno de los residuos con bromuro de bencilo.	97
Tabla 9	Posición en la proteína XylR-His de los aminoácidos que han reaccionado con bromuro de bencilo.	97
Tabla 10	Datos sobre la exposición al medio de los residuos modificados con bromuro de bencilo en el modelo del dominio A de XylR.	99
Tabla 11	Cepas de <i>Escherichia coli</i> insertadas con circuitos genéticos.	137

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
Nx	Ácido nalidíxico
ADN	Ácido desoxirribonucleíco
Ap	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BAC	Cromosoma bacteriano artificial (<i>Bacterial artificial chromosome</i>)
Br [^] Ph	Bromuro de bencilo
Cm	Cloramfenicol
COMT	Catecol O-metiltransferasa
Da	Dalton
DBT	Dibenzotiofeno
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
Gb	Giga pares de bases
<i>gfp</i>	Gen de la proteína verde fluorescente
Gm	Gentamicina
2-HBP	2-Hidroxibifenilo
γ -HCH	γ -1,2,3,4,5,6-Hexaclorociclohexano (γ -Lindano)
IPTG	Isopropil- β -D-galactopiranosido
Kb	Kilo pares de bases
kDa	Kilodaltons
Km	Kanamicina
<i>lacZ</i>	Gen de la β -galactosidasa
LB	Luria-Bertani
<i>lux</i>	Gen de la bioluminiscencia (<i>luxCDABE</i>)
MBP	Proteína de unión a maltosa (<i>Maltose binding protein</i>)
MCS	Sitio de clonación múltiple
MM	Medio mínimo

Abreviaturas

OD ₆₀₀	Densidad óptica medida como Absorbancia a $\lambda=600$ nm
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- α -D-galactopiranosido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pip	Piperacilina
Rif	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
Sac	Sacarosa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIGEX	<i>Substrate-Induced Gene Expression</i>
Sm	Estreptomicina
TAE	Tris acético EDTA
Tc	Tetraciclina
1,2,4-TCB	1,2,4-Triclorobenceno
Tn7R	Extremo derecho del transposón Tn7
ToMO	Tolueno / <i>o</i> -xileno monooxigenasa
U.A.	Unidades arbitrarias
X-Gal	5-Bromo-4-Cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
Xil	<i>m</i> -xileno

SUMMARY

Microbial Biotechnology has taken advantage of the huge variety of biological functions found in bacteria, fungi, archaea or virus for medical, chemical industry or biosensing applications among others. These applications have relied on the study of cultured microorganisms; nevertheless it is widely accepted that uncultured microbes comprise the majority of the Biodiversity of planet Earth. In order to analyze the genomes and therefore the biological activities of uncultured microbes, metagenomics has become a powerful discipline. Metagenomic approaches analyze the DNA content from microbial communities independently of whether they are culturable or not. Metagenomic libraries generate environmental gene pools in which to search for genuine new enzymatic activities. This search can be driven either by sequence or function analysis, being the latest the more efficient to identify novel and active enzymes. We have elaborated new function-driven screening concepts to search enzymatic activities in microbial metagenomes, named *genetic traps*. The general outline of this approach is based on the use of transcriptional regulators that are blind to the substrate but respond to the reaction product of a given chemical transformation. Such a regulator activates a promoter fused to a reporter gene leading to a selectable phenotype. Therefore bacteria endowed with such genetic traps could be used as recipients of metagenomic expression libraries; only those cells that bear DNA fragments, encoding the desired reaction, provide a measurable/detectable property. The insertion of such genetic circuits in bacterial chromosomes (*E. coli* and *P. putida*) relies on a Tn5/Tn7 transposon delivery system. Sequential insertions of promoterless reporter genes (within Tn5) and transcriptional regulators and promoters (within Tn7), along with deletion of antibiotic markers and transcription terminators, format given strains as specific genetic traps for predetermined reactions. Following this strategy, strains that reveal ring monooxygenases, DBT desulfurization, lindane (1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane) dehydrochlorination activities and production of salicylate have been constructed. These genetic circuits have been assembled using transcriptional regulators like DmpR, HbpRCBP6, XylR5 or DntR and *lux* reporter gene.

The interaction between transcriptional regulators and their effector molecules is the key event for the correct functioning of a genetic trap. In order to better characterize this interaction, chemical crosslinking assays between XylR protein and benzyl bromide

Summary

were carried out as well. XylR is a transcriptional regulator that interacts with toluene, *m*-xylene or *p*-xylene. Benzyl bromide is a chemical analog of these effectors. Benzyl bromide interacts *in vivo* with XylR and not only mimics the aromatic structure of toluene, but also carries a bromine atom, which confers high reactivity to the benzyl group. Reaction *in vitro* between XylR and such functionalized effector molecule, leads to covalent bond formation between certain XylR residues and this molecule. Further mass spectroscopy analysis of this protein, before and after reaction with benzyl bromide, provided information about which residues had reacted. Finally, mapping of the reacting XylR aminoacids on a structural model of XylR N-terminal domain, shed some light on the real interaction between aromatic effector molecules and XylR as well as on the three-dimensional structure of its N-terminal module.

INTRODUCCIÓN

1. Genotecas Metagenómicas.

La Biodiversidad del planeta ha sido ampliamente estudiada en lo referente a organismos superiores como animales y plantas, llegándose a estimar que han sido caracterizadas más de un 90% de las especies de estos dos grupos (Ferrer, 2004). Sin embargo, los microorganismos como bacterias, hongos, arqueas o virus, que representan un alto porcentaje de la Biodiversidad en la Biosfera, sólo han sido estudiados en una pequeña proporción (Whitman *et al.*, 1998). El 99% de estos grupos no han sido cultivados ni caracterizados, lo que supone que se desconoce la gran mayoría de especies de estos microorganismos. Este dato permite asumir que el conjunto de la microbiota no cultivable que existe en la Biosfera representa la mayor parte de la Biodiversidad del planeta (Riesenfeld, 2004; ver Tabla 1).

Se estima que sólo el 1% de los microorganismos presentes en un nicho ecológico de un determinado ambiente se puede cultivar y caracterizar usando técnicas habituales de laboratorio. En este contexto, la información genética que se puede obtener de un ecosistema queda muy sesgada y el análisis o estudio del contenido restante se convierte en un problema a resolver. La estrategia para abordar esta cuestión, ha emergido como un campo nuevo denominado metagenómica (Handelsman *et al.*, 1998). Esta disciplina analiza el complemento genético de las comunidades microbianas independientemente de que sus miembros sean cultivables o no. El término deriva del concepto estadístico *meta*-análisis que es el proceso de combinar estudios diferentes de un mismo caso y del término *genoma* que es el material genético de un organismo (Rondon *et al.*, 2000; Schloss, 2003). El metagenoma por lo tanto, se considera como el conjunto de todo el material genético de una muestra ambiental que está constituido por los genomas de los distintos organismos individuales presentes.

Todo el ADN que conforma el metagenoma de una muestra se puede considerar como un paisaje genético en el que se pueden llevar a cabo estudios filogenéticos, que permitan conocer la composición en especies de esa muestra. También como un conjunto de genes inexplorado donde buscar nuevas funciones y enzimas que no hayan sido descritos. La forma de analizar el ADN metagenómico consiste en clonar este ADN ambiental usando distintos vectores y transformarlo en un hospedador bacteriano

Introducción

(*E. coli* u otros) dando lugar a una genoteca metagenómica. La construcción de ésta comienza con la extracción de ADN de la muestra de interés para su posterior ensamblaje en distintos tipos de vectores de propagación. La elección de uno u otro sistema de clonación se debe hacer en función del objeto de estudio al que se quiere someter a la genoteca. Los casos más típicos son aquellos en los que se quiere obtener el máximo grado de información genética (filogenia, estructura de la comunidad etc.) o en los que se buscan enzimas o proteínas con un alto grado de expresión y funcionalización (Ferrer, 2004).

Se pueden distinguir tres tipos diferentes de sistemas donde construir una genoteca metagenómica:

1.1 Genotecas en fago *lambda*. El sistema *lambda* para la construcción de genotecas metagenómicas se basa en el uso de vectores capaces de aceptar insertos de hasta un máximo de 12 Kb. Las genotecas construidas en fago *lambda* suelen presentar un alto nivel de expresión de los genes del ADN metagenómico en el hospedador en el que son construidas (*E. coli*). Esta característica permite someter con éxito a la genoteca a un tamizado para determinadas actividades enzimáticas, como demuestra el descubrimiento de actividades oxidoreductasas, lacasas o quitinasas (Cottrell, 1999; Schloss, 2003; Riesenfeld, 2004).

1.2 Genotecas en plásmidos, cósmidos y/o fósmidos. En la construcción de estas genotecas se clonan fragmentos de ADN metagenómico de tamaños de entre 3-10 Kb en el caso de plásmidos y hasta 15-120 Kb para cósmidos o fósmidos, utilizando normalmente *E. coli* como hospedador heterólogo. Las genotecas así construidas pueden presentar problemas a la hora de expresar el contenido genético del segmento de ADN ambiental clonado, por presentar un nivel bajo de expresión o porque el producto genético sea tóxico para el hospedador. Sin embargo, las colecciones construidas en este tipo de vectores han permitido el hallazgo de nuevas enzimas tipo lipasas, esterases, proteasas o amilasas (Lorenz, 2003).

1.3 Genotecas de cromosomas artificiales bacterianos (BACs). Las genotecas construidas en cromosomas artificiales bacterianos (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC) son capaces de albergar segmentos metagenómicos de 5-120 Kb y si bien son

útiles para la búsqueda de algunas actividades enzimáticas (Gillespie *et al.*, 2002) son difíciles de construir y de conservar. Aunque proporcionan una gran información genética por el elevado tamaño de inserto que tienen (hasta 300 Kb), presentan el inconveniente de tener bajos niveles de expresión (Kouker y Jaeger, 1987).

Tabla 1. Número de especies estimadas (y accesibles) en la Naturaleza.

Organismo	Especies Estimadas	Accesibilidad (% del total) ¹
Animales	3.5×10^4	> 90
Artrópodos / Invertebrados	10^6 - 10^7	~ 10
Nematodos	5×10^5	~ 3
Plantas superiores	2.7×10^5	> 90
Algas	10^4 - 10^5	~ 70
Hongos	1.5×10^6	~ 5
Bacterias	10^4-10^5	~ 1-10
Arqueas	10^5-10^6	~ 0.1-1
Virus	10^5-10^6	≤ 4

¹Más del 90% de las especies de animales y plantas superiores han sido caracterizados. El porcentaje es mucho menor para hongos, bacterias, arqueas y virus (Ferrer, 2004).

2. Análisis de Genotecas Metagenómicas.

La relativa facilidad para extraer ADN de muestras ambientales así como el desarrollo de tecnologías para la construcción de genotecas metagenómicas ha permitido que se hayan generado colecciones con una alta representatividad de diversos ecosistemas del planeta (Wackett, 2001). Este rápido incremento de clones con ADN metagenómico a analizar, ha ido parejo en los últimos 10 años con un gran desarrollo de técnicas para secuenciar tales clones. El gran avance en las técnicas de secuenciación ha permitido la secuenciación de ≥ 4000 genomas de distintos organismos (www.genomesonline.org) y se espera que el Proyecto del Microbioma Humano ponga a disposición de la comunidad científica la secuencia de los genomas de 1000 microorganismos al año (Carreño y de Lorenzo, 2009). También son reseñables los trabajos llevados a cabo por Venter *et al.* en el contexto de las expediciones del buque *Sorcerer II* que, tomando muestras oceánicas, construyendo genotecas y secuenciándolas dobló el número de secuencias de las bases de datos disponibles en 2007 (Yooseph *et al.*, 2007).

Introducción

Es interesante destacar que estos datos no se restringen únicamente a secuencias de muestras microbianas que incluyen bacterias, hongos y arqueas sino que también incluyen metagenomas víricos denominados *viromas*. El análisis de las fracciones virales de muestras de distintos orígenes como sedimentos marinos, agua marina o heces humanas o equinas entre otras (Edwards y Rohwer, 2005), ha puesto de manifiesto que los viromas albergan un amplísimo número de actividades biológicas.

Por lo tanto, parece evidente que la capacidad de secuenciación y de extracción de ADN metagenómico de muestras de distintos orígenes, está proveyendo a la comunidad científica de un amplio conjunto de datos referentes a la fracción no cultivable de microorganismos de la Biosfera. Sin embargo, el análisis de esta plétora de datos requiere, no sólo herramientas bioinformáticas potentes para el análisis y ensamblaje de las secuencias sino también, ensayos que permitan identificar nuevos genes y enzimas funcionales en las genotecas. Para realizar esta búsqueda de nuevas actividades enzimáticas en genotecas metagenómicas se pueden usar dos tipos de abordajes: [i] análisis por secuencia y [ii] análisis por función.

2.1 Análisis por secuencia para la búsqueda de actividades enzimáticas en genotecas metagenómicas. Esta estrategia se basa en la similaridad entre secuencias de ADN metagenómico de las genotecas y secuencias de ADN que codifican genes con actividades enzimáticas conocidas. Una primera forma de llevar a cabo este tipo de análisis es plaquear los clones de la genoteca, ya sean colonias o placas de lisis por fagos, en un medio adecuado, disponerlos en una membrana y amplificar por PCR usando oligonucleótidos específicos. Los oligonucleótidos usados en este abordaje están diseñados a partir de secuencias de ADN conocidas de las actividades que se quieran detectar en el análisis. De tal forma que aquellos clones que amplifiquen un fragmento de ADN tendrán un segmento de ADN metagenómico que codificará la actividad enzimática en cuestión. Otra forma de realizar este análisis es secuenciar los distintos clones de la genoteca y hacer búsquedas por homología en las bases de datos disponibles. Esta estrategia es muy fructífera a la hora de identificar clones con actividades enzimáticas ya que haciendo uso de herramientas informáticas compara directamente las secuencias de ADN metagenómico con secuencias publicadas de una forma rápida y eficaz. Aunque a día de hoy esta estrategia es la más satisfactoria para extraer el máximo de información de las secuencias de ADN metagenómico que se

publican, las actividades enzimáticas que se encuentran tienen que tener un alto grado de similitud con las proteínas o enzimas que ya están caracterizadas. En este sentido es importante destacar que la búsqueda de actividades enzimáticas en secuencias provenientes de metagenomas ambientales requiere de herramientas bioinformáticas analíticas muy potentes (Raes *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008; Huson *et al.*, 2009).

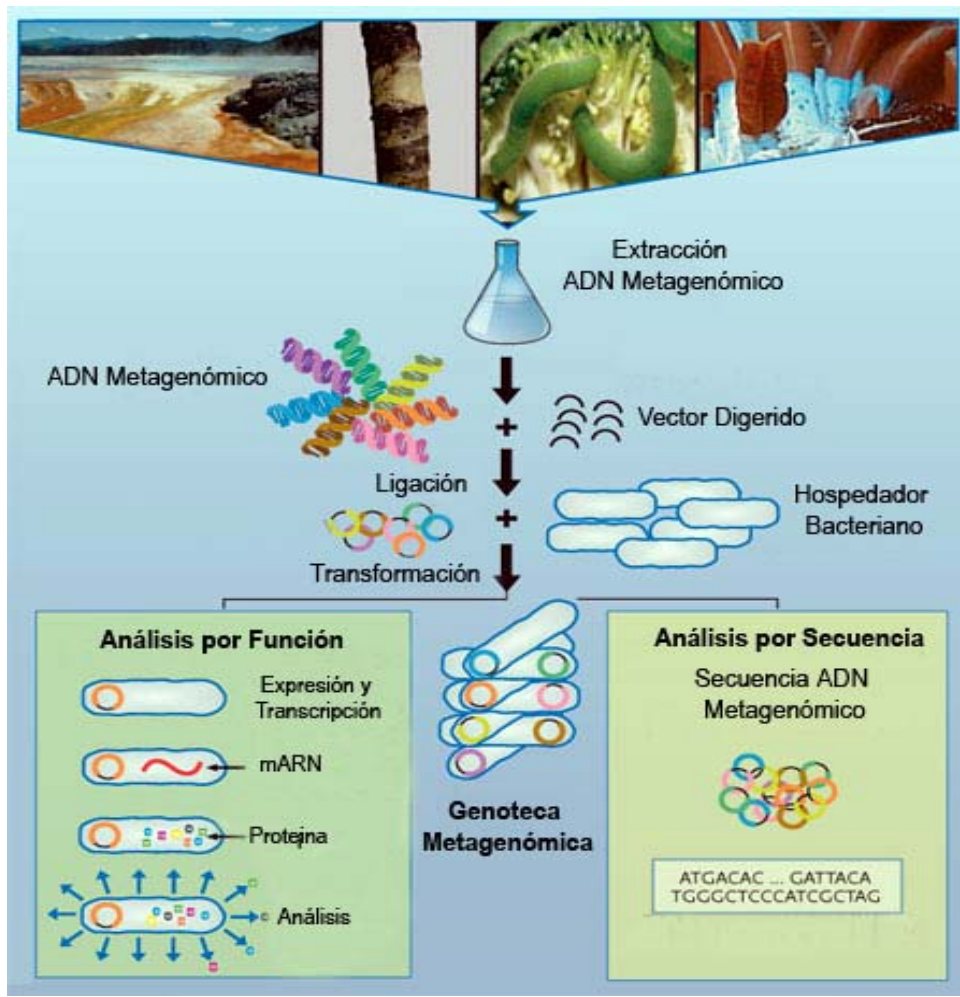


Fig. 1. Construcción y análisis de una genoteca metagenómica. El proceso comienza con la extracción de ADN genómico de la muestra de interés. Este ADN es digerido y clonado en el vector elegido para la construcción de la genoteca (fago *lambda*, plásmido, cósmido, fósido o BAC). A continuación se transforma esta ligación en un hospedador bacteriano (*E. coli* o *P. putida*). Finalmente el contenido genético de la genoteca se analiza bien por análisis de secuencia o por análisis de función (figura modificada y descargada de <http://journals.asm.org/cgi/figsearch>).

Una de las mayores ventajas del análisis por secuencia para la búsqueda de actividades enzimáticas respecto del análisis por función, es que las actividades enzimáticas se pueden asignar tentativamente a ciertas secuencias sin necesidad de la expresión de los

Introducción

genes que los codifican. Sin embargo, existen algunas desventajas como que [i] el análisis por secuencia no puede determinar si el producto del gen que se ha identificado es funcional y [ii] este abordaje, aunque es muy prometedor y eficaz está limitado a encontrar enzimas similares a otras conocidas y no a encontrar proteínas totalmente desconocidas (Carreño y de Lorenzo, 2009).

En cualquier caso es indiscutible que a día de hoy este tipo de análisis ha dado unos resultados excelentes, como por ejemplo se infiere de los resultados del Proyecto del Mar de los Sargazos (Venter *et al.*, 2004). En este trabajo se marcó un hito al producir 1.6 Gb de nuevas secuencias que incluían más de 10^6 segmentos de ADN y un número equivalente de entradas de proteínas potenciales. Además se encontraron 69900 nuevos genes y se distinguieron secuencias de 1800 tipos diferentes de especies de microorganismo de los que 148 no habían sido descritos nunca. Otro ejemplo de la capacidad de este tipo de análisis fue la publicación de casi el genoma completo de dos microorganismos no cultivables denominados *Leptospirillum* (Grupo II) y *Ferroplasma* (Tipo II) que se obtuvieron de muestras tomadas de un biofilm acidófilico con baja diversidad proveniente de los sedimentos de una mina (Tyson *et al.*, 2004).

2.2 Análisis por función para la búsqueda de actividades enzimáticas en genotecas metagenómicas. Esta es una estrategia que, si bien ha sido menos explotada que el análisis por secuencia, permite identificar genes totalmente funcionales en las genotecas. Estos clones positivos llevan segmentos de ADN que codifican para genes completos y expresan enzimas activas, que en algunos casos pueden no tener similitud a secuencias publicadas (Rajendhran y Gunasekaran, 2008; Steele *et al.*, 2009). El problema de esta estrategia radica en que se tiene que diseñar un procedimiento experimental para cada caso que permita la selección del clon de interés en el conjunto de la genoteca (Ferrer *et al.*, 2009). Para que esto ocurra el gen debe estar completo y su expresión en el organismo hospedador (*E. coli* u otra) debe dar lugar a una enzima funcional cuya actividad no debe ser tóxica. Además el resultado de la actividad de la enzima que se desea encontrar en la genoteca se tiene que poner de manifiesto de una forma clara y sencilla. Para ello existen un gran número de estrategias diferentes con el fin de llevar a cabo un tamizado por actividad que permiten convertir la expresión de las enzimas buscadas en un fenotipo fácilmente

identificable (Daniel, 2005). Algunos de estos ensayos de actividad se describen a continuación.

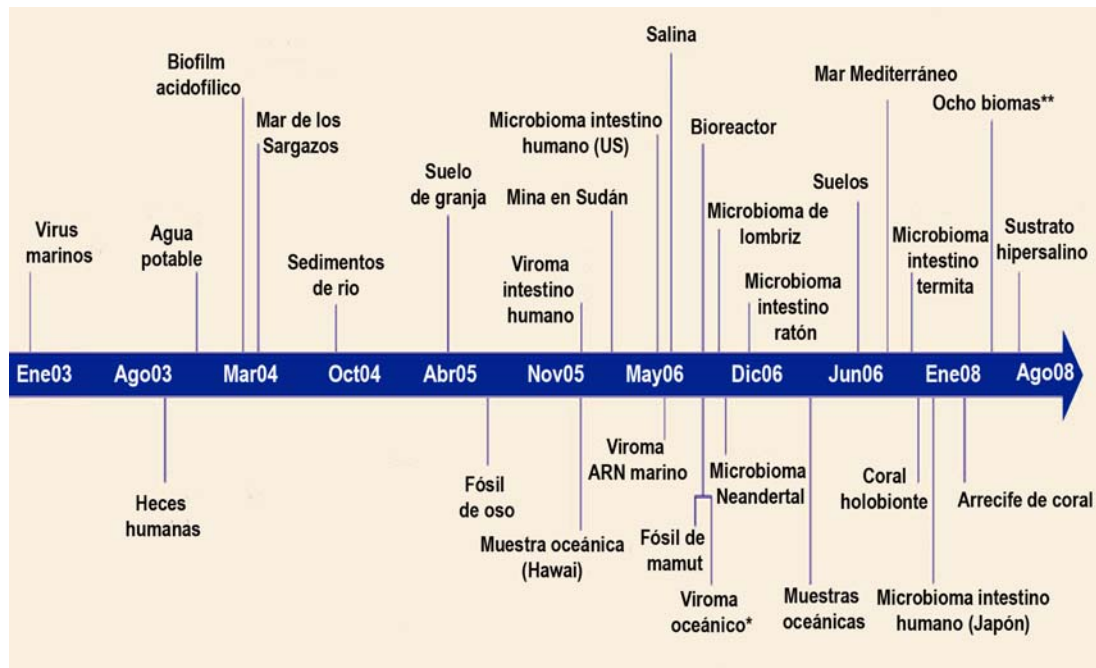


Fig. 2. Línea temporal de proyectos metagenómicos basados en análisis de secuencia.

*Los viromas oceánicos (Agosto 2006) se obtuvieron del Mar de los Sargazos, Golfo de México, costa de la Columbia Británica y el Océano Ártico.**Los ocho biomas (Marzo 2008) fueron de estromatolitos, intestino de pez, piscifactorías, viroma de mosquito, de pulmón humano y marino y muestras de intestino bovino y de pollo (figura modificada de Hugenholtz y Tyson, 2008).

2.2.1 Tamizado basado en crecimiento condicional. Uno de los ensayos de actividad más simple es aquél en el que el clon positivo se selecciona por crecimiento condicional usando como sistema de selección bien un medio determinado donde plaquear la genoteca, o bien un hospedador determinado donde transformar y expresar la genoteca (e.g. mutantes). La aplicación más sencilla de esta aproximación sería la de la búsqueda de genes de resistencia de antibióticos en genotecas metagenómicas. Esta búsqueda se hace plaqueando la genoteca en un medio con el antibiótico contra el cuál se quiere encontrar la resistencia. De tal forma que sólo aquellos clones de la genoteca que sean capaces de crecer llevarán un segmento de ADN que codifique para la resistencia de dicho antibiótico (Diaz-Torres *et al.*, 2003).

ANÁLISIS POR FUNCIÓN	
VENTAJAS	DESVENTAJAS
Descubrimiento de genes nuevos.	Depende de la expresión del gen por el hospedador.
Selección de genes enteros.	Requiere de la producción de proteínas funcionales por el hospedador.
Identificación de proteínas funcionales.	Requiere el diseño de ensayos de actividad para tamizado.

ANÁLISIS POR SECUENCIA	
VENTAJAS	DESVENTAJAS
Independiente de la expresión de los genes.	Descubrimiento de genes similares a los conocidos.
Tamizado por similitud de secuencia.	Selección de genes no completos.
Tamizado por PCR de colonia.	No se identifican proteínas funcionales.

Fig. 3. Ventajas y desventajas de los análisis por secuencia y por función de actividades enzimáticas en genotecas metagenómicas (figura modificada de Daniel, 2005).

Siguiendo una estrategia similar se pueden aislar clones de una genoteca en *E. coli* con tolerancia a elevadas concentraciones de metales pesados como el níquel (Mirete *et al.*, 2007). También eligiendo el hospedador adecuado donde construir la genoteca se pueden encontrar actividades de interés. Un ejemplo, fue el descrito por Majerník *et al.* (2001), en el que usando como hospedador una cepa de *E. coli* deficiente en el sistema de transporte de los iones Na^+/H^+ se identificaron en la genoteca dos genes que complementaban esta mutación. En este caso, el análisis por actividad se llevó a cabo plaqueando la genoteca en un medio con LiCl. De esta forma, sólo aquellos clones capaces de resistir el efecto tóxico del Li^+ sobre la piruvato kinasa, eran identificados positivamente al expresar un sistema de transporte de cationes monovalentes. Este análisis por función de genotecas se puede aplicar no sólo para buscar enzimas que actúen sobre cierto estímulo químico sino también para encontrar enzimas que actúen en determinadas condiciones físicas. Uno de estos ejemplos es la identificación de clones de una genoteca en *E. coli* con una especial capacidad para crecer a bajas temperaturas (Ferrer *et al.*, 2003). En este ejemplo se identificaron clones de una genoteca que codificaban para la chaperona Cpn60 de *Oleispira Antarctica* RB8, que permitía a la la cepa de *E. coli* donde se construyó la genoteca variar su temperatura de crecimiento mínima de $+7.5^\circ$ a -13.7°C .

2.2.2 Tamizado basado en el uso de sustratos/productos cromogénicos. Existe un ensayo de actividad enzimática en el que una vez que la enzima que se quiere identificar se ha expresado y actuado sobre el sustrato, el producto resultante de la catálisis es fácilmente identificable a simple vista ya que es coloreado, luminiscente o fluorescente. Existen sustratos naturales que al ser transformados en sus correspondientes productos dan lugar a un compuesto coloreado. Un ejemplo de esta clase son algunos hidrocarburos aromáticos que por acción de una actividad oxigenasa dan lugar a índigo, que es un colorante de color azul (O'Connor *et al.*, 1997). En esta transformación anillos aromáticos tipo indol (como el presente en el triptófano) son oxidados a dihidrodiol que al deshidratarse dan lugar a grupos indoxilo que dimerizan formando índigo (Ensley *et al.*, 1983). Para la búsqueda de actividades tipo oxigenasa, basta con plaquear las genotecas y o bien esperar que el contenido de triptófano en las cepas sea suficiente para formar índigo o bien esparcir indol en la placa y buscar colonias azules (Fig. 4B). Otro ejemplo de este tipo es la búsqueda de actividades *meta*-catecol-dioxigenasa. Estas enzimas son capaces de romper la estructura aromática del catecol dando lugar a un semialdehído de color amarillo. Muchas rutas catabólicas de anillos mono/di aromáticos tienen actividades de este tipo, que son fácilmente identificables en una genoteca metagenómica esparciendo catecol en la placa donde se plaquea la genoteca y esperando a ver formación de color amarillo (Fig. 4A; Junca y Pieper, 2003; Junca *et al.*, 2004).

Otro ejemplo similar de tamizado de una genoteca basándose en sustratos/productos cromogénicos fue el desarrollado por Knietzsch *et al.* (2003). En este caso se pudo aislar enzimas que oxidaban polioles de cadena corta (C2-C4) de una genoteca porque los carbonilos resultantes de la oxidación reaccionaban con reactivo de Schiff previamente añadido en la placa donde se plaquea la genoteca. La reacción del carbonilo resultante con el reactivo de Schiff (pararosanilina y bisulfito sódico) da lugar a un derivado de color rojo oscuro fácilmente reconocible (Fig. 4D).

Sin embargo, por norma general los sustratos o los productos de una reacción enzimática no son coloreados, bioluminiscentes o fluorescentes *per se*. Por este motivo para identificar ciertas actividades enzimáticas se usan sustratos modificados químicamente. Estos sustratos modificados deben parecerse estructuralmente al sustrato natural de la enzima y estar funcionalizados con grupos que confieran al

Introducción

sustrato o al producto resultante de la biotransformación una característica seleccionable. En muchos ejemplos un sustrato modificado es hidrolizado como resultado de la actividad catalítica de la enzima buscada y el producto de la hidrólisis es coloreado. En este sentido se han generado sustratos como el acetato de α -naftilo, el rojo brillante ostazin hidroxietil-celulosa o la β -ciclodextrina que han permitido respectivamente la identificación de actividades esterasas, celulasas y amilasas (Fig. 4C; Ferrer *et al.*, 2005 a,b).

Además de los ensayos por función arriba descritos en el que la aparición de un producto coloreado se asocia con una actividad, también existen ejemplos en los que la pérdida de color va asociada a la expresión de una determinada enzima. En este sentido la aparición de zonas claras en placas con LB-agar y leche desnatada ha permitido la identificación de proteasas (Fig. 4E; Gupta *et al.*, 2002) al igual que la dispersión de un sustrato opaco ha servido para la identificación de celulasas, quitinasas o lipasas en genotecas de ADN ambiental (Steele *et al.*, 2009).

2.2.3 Tamizado por SIGEX (*Substrate-Induced Gene Expression*). Existe otro tipo de análisis por función de genotecas metagenómicas para la búsqueda de genes catabólicos que se conoce como SIGEX (*Substrate-Induced Gene Expression*). Este tipo de análisis desarrollado por Uchiyama *et al.* (2005), se basa en el hecho de que la presencia en el medio de un determinado compuesto químico puede inducir la expresión de los genes catabólicos correspondientes. En algunos casos los operones bacterianos, que regulan el metabolismo de un número significativo de compuestos, se localizan en los genomas adyacentes a los reguladores transcripcionales y los promotores que los regulan. Este dato sirve como base para la clonación de ADN metagenómico delante de un gen informador tipo *gfp* sin promotor, seguido de una separación de las células en función de la fluorescencia emitida (FACS *Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Aquellos clones que en presencia de un determinado sustrato emitan fluorescencia probablemente llevarán un segmento de ADN con un regulador que interacciona con ese sustrato y el ADN de uno o más enzimas catabólicos.

Si bien este sistema ha resultado útil para la identificación en genotecas de operones implicados en la degradación de benzoato y catecol (Uchiyama *et al.*, 2005) y en la identificación de reductasas de compuestos nitroaromáticos (Uchiyama y Watanabe,

2008), el concepto presenta un conjunto de limitaciones. Algunas de ellas son que [i] los reguladores transcripcionales no siempre están en *cis* con respecto a los operones, [ii] estos operones catabólicos no son regulados necesariamente y se pueden expresar constitutivamente y [iii] los reguladores transcripcionales y los promotores pueden ser activados por efectores distintos de los sustratos de la ruta metabólica que regulan.

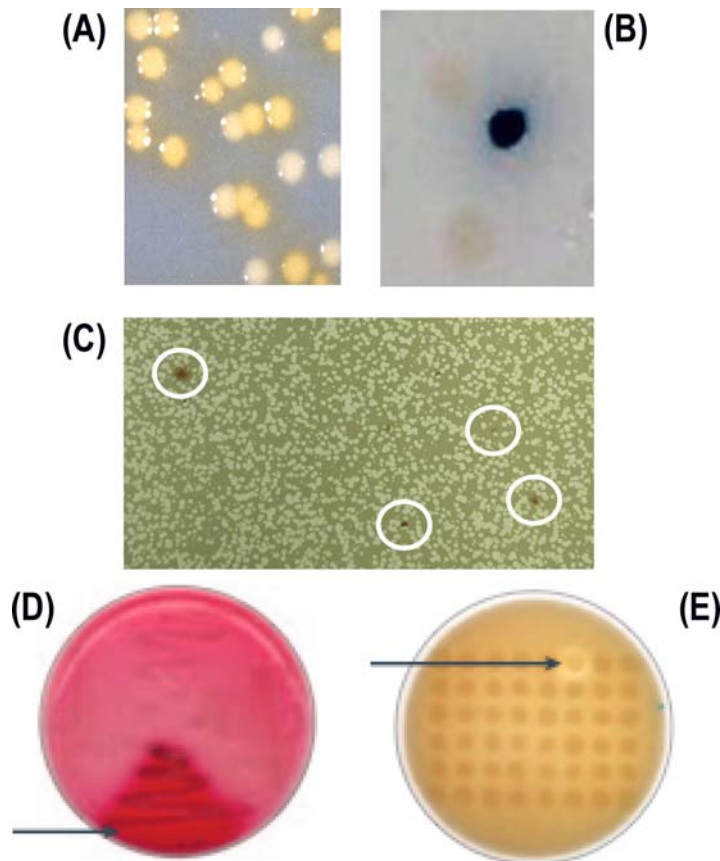


Fig. 4. Ejemplos de análisis de función por tamizado con sustratos/productos cromogénicos. (A) La adición de catecol a una placa con clones que expresan *meta*-catecol dioxigenasas da lugar a colonias amarillas. (B) Colonia azul expresando una oxigenasa de anillo en una placa esparcida con indol. (C) Genoteca metagenómica construida en fago *lambda* plaqueada en placas de LB-agar con acetato de α -naftilo. La aparición de placas de lisis pardas revela la existencia de actividades esterazas en la genoteca. (D) Colonias de color rojo con activades alcohol oxidoreductasas. (E) La actividad proteasa de un clon en una genoteca se detecta por la aparición de una zona clara en placas con LB-agar y leche desnatada (modificado de Carreño y de Lorenzo, 2009 y Daniel, 2005)

Introducción

Finalmente existe un tercer tipo de análisis por función de genotecas metagenómicas, en el que la transformación química, que se busca en la genoteca, se identifica por la activación de una trampa genética (Galvao *et al.*, 2005). Este concepto y su desarrollo están en la base de esta Tesis Doctoral.

3. Trampas Genéticas.

Los sistemas de análisis por función de genotecas descritos hasta ahora han resultado de gran valor para la identificación de actividades enzimáticas que van desde resistencias a antibióticos o actividades tipo proteasas hasta esterasas, lipasas u oxigenasas. Todas estas actividades si bien son de gran interés, sólo representan una pequeña fracción de la información contenida en el metagenoma microbiano. Este metagenoma ha demostrado contener actividades enzimáticas que han permitido que comunidades de microorganismos sean viables en nichos ecológicos altamente contaminados. En muchos casos esta contaminación tiene lugar como resultado de la actividad industrial, que introduce contaminantes en ecosistemas en los que nunca habían existido antes de la acción humana. Estos compuestos xenobióticos si bien son persistentes y tóxicos, pueden ser mineralizados por comunidades microbianas gracias a las enzimas biodegradativas presentes en éstas. Sin embargo la búsqueda de estas actividades enzimáticas relacionadas con la biodegradación de compuestos xenobióticos requiere de un análisis por función distinto de los anteriormente descritos. Hemos denominado este análisis por función *trampa genética* y permite identificar en una genoteca de ADN ambiental actividades que catalizan reacciones químicas específicas implicadas en la mineralización de compuestos xenobióticos.

El objetivo de una trampa genética es poner de manifiesto si una determinada reacción química ha tenido o no lugar catalizada por los productos génicos de un segmento de ADN metagenómico. La idea general es que la trampa se active cuando el sustrato A de la reacción a detectar, generalmente un contaminante ambiental, se transforme en un producto B. Con esto la trampa genética cumple dos características: [i] ser sensible sólo a la presencia de B en el medio y no a la del sustrato A y [ii] traducir la transformación química de A en B en un fenotipo seleccionable, resultado de la expresión condicional de genes informadores. Para construir un sistema capaz de

cumplir estos dos requisitos es necesario el uso de elementos genéticos, módulos o partes que permiten el ensamblaje de biosensores. Estos componentes genéticos son reguladores transcripcionales, promotores y genes informadores que elegidos y organizados de la forma apropiada transformen la aparición del producto de la reacción buscada (B) en un fenotipo fácilmente reconocible y medible (van der Meer *et al.*, 2004).

El funcionamiento de una trampa genética comienza con la activación de un regulador transcripcional por interacción de éste con el producto (B) y no con el sustrato (A) de la reacción. De tal forma que cuando B está en el medio, el regulador activa la transcripción de su promotor, que al estar fusionado con un gen informador da lugar a un nuevo fenotipo. Éste sólo será observable si algún segmento de ADN metagenómico de la genoteca ha catalizado la transformación de A en B.

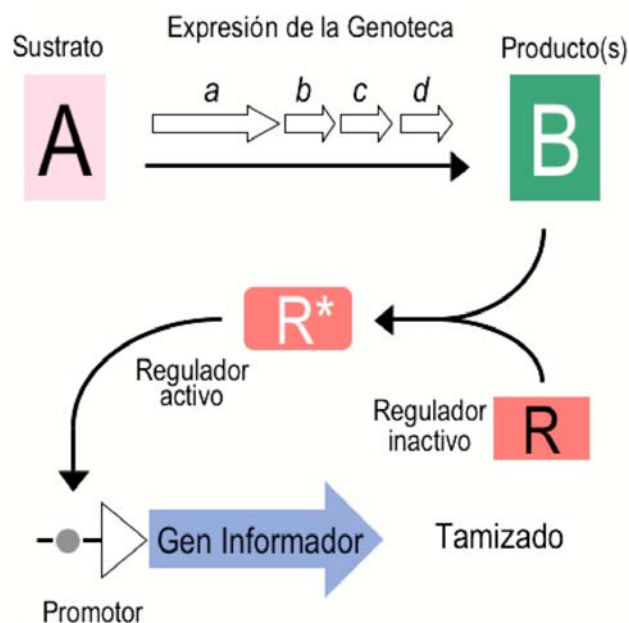


Fig. 5. Esquema de una trampa genética. Los elementos claves de la trampa genética [i] el regulador transcripcional y su promotor y [ii] el gen informador se activan cuando ha tenido lugar la transformación para la que se diseña la trampa.

La elección de un regulador transcripcional adecuado y de un gen informador capaz de generar un fenotipo fácilmente reconocible es crucial para el diseño del circuito genético que conformará la trampa en cuestión.

3.1 Los reguladores transcripcionales. Las proteínas reguladoras o factores transcripcionales y los promotores regulados por éstos son elementos claves en el control de los operones catabólicos de las bacterias. Estos factores permiten que los microorganismos usen compuestos xenobióticos altamente tóxicos y persistentes en el ambiente como fuentes de carbono. La regulación de estos operones viene gobernada por reguladores transcripcionales de distintos tipos (van der Meer *et al.*, 2004; Carbajosa *et al.*, 2009), que en general comparten determinadas características. Las propiedades más significativas son que [i] activan la transcripción desde su promotor cuando han interactuado con su molécula efectora y [ii] todos se unen a ADN, concretamente a un promotor bien determinado, en la mayor parte de los casos por un motivo hélice-giro-hélice. Existe una gran variedad de reguladores transcripcionales que forman distintas familias, como los reguladores transcripcionales tipo NtrC, LysR o AraC. Los reguladores de la familia NtrC controlan el catabolismo de compuestos aromáticos mediante la regulación de promotores sigma 54. Se caracterizan por tener una estructura modular que consta de un dominio A de unión al efector, en el extremo N-terminal, un dominio B que enlaza el A con un dominio C, responsable de la activación del promotor y un dominio D de unión al ADN. Entre los reguladores de esta familia se encuentran XylR, que responde a tolueno y xilenos, DmpR a fenol, PhnR a fenantreno y naftaleno y HbpR a 2-HBP. La familia LysR presenta una estructura muy diferente a la NtrC siendo el extremo N-terminal el que interacciona con el ADN, el C-terminal el responsable de la multimerización y los dominios centrales los que se unen al efector. Algunos de sus miembros son CbnR que responde a clorocatecol, NahR a naftaleno y salicilato o BenM a benzoato. Otras notables familias de reguladores son las de AraC, siendo XylS el más estudiado que responde a benzoato, los reguladores tipo IclR que responden a compuestos aromáticos y no aromáticos y las familias MarR y GntR (Díaz, 2000).

Aunque existe una gran variedad de compuestos xenobióticos para los cuales no se han descrito reguladores transcripcionales, se han creado variantes de los reguladores transcripcionales silvestres con nuevas especificidades (Garmendia *et al.*, 2001; Galvao *et al.*, 2007; Beggah, 2008). Esta capacidad de generar reguladores mutantes *a la carta* junto con la gran variedad de factores transcripcionales silvestres, proporciona un amplio abanico donde elegir a la hora de construir trampas genéticas y biosensores bacterianos.

3.2 Los genes informadores. El otro elemento clave en la construcción de una trampa genética es el gen informador ya que su expresión es determinante para la correcta identificación de las actividades de interés en la genoteca. Existen gran variedad de genes informadores que varían desde aquellos que dan lugar a una señal óptica coloreada (*lacZ*), fluorescente (*gfp*) o bioluminiscente (*lux*), a un cambio en la temperatura de nucleación de hielo (*inaZ*; Wolber *et al.*, 1986) o hasta un fenotipo seleccionable como la resistencia a un antibiótico (van Sint Fiet *et al.*, 2006). Todos estos genes informadores han sido ampliamente utilizados en la construcción de cepas bacterianas como biosensores, siendo *lacZ*, *gfp* y *lux* los más comunes.

3.2.1 El gen de la β -galactosidasa (*lacZ*). La enzima β -galactosidasa del operón *lac* que regula el metabolismo de la lactosa en *E. coli* es responsable de la ruptura de la lactosa en galactosa y glucosa. También es capaz de usar sustratos análogos a la lactosa como X-Gal u ONPG cuya ruptura da lugar a compuestos de color azul y amarillo respectivamente. La presencia de color azul (Fig. 6A) es un fenotipo fácilmente detectable a simple vista en medio sólido, mientras que la generación de color amarillo se puede cuantificar de manera sencilla en medio líquido (Trun y Trempey, 2004). Las aplicaciones de *lacZ* como gen informador son múltiples en biosensores, ensayos de expresión, regulación de la transcripción, caracterización de rutas metabólicas etc (Carmona *et al.*, 2000, 2005; Mohn *et al.*, 2006).

3.2.2 El gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*). Esta proteína de la medusa *Aequorea Victoria* (Cody *et al.*, 1993) se ha usado ampliamente como gen informador debido a su estabilidad y a la facilidad de medir la fluorescencia en las bacterias sin necesidad de lisar las células ni añadir ningún otro factor (Fig. 6B). Debido a estas características ha sido ampliamente usada en ensayos de localización de proteínas (Phillips, 2001), de expresión de genes (Chalfie *et al.*, 1994) o de formación de biofilms (Møller *et al.*, 1998). También ha sido usada en la creación de biosensores bacterianos para tolueno (Stiner y Halverson, 2002), arsenito y arsenato (Stocker *et al.*, 2003), octano (Jaspers *et al.*, 2001) o fenantreno (Tecon *et al.*, 2006).

3.2.3 Los genes *luxCDABE* de bioluminiscencia (*lux*). La bioluminiscencia producto de los genes *luxCDABE* de *Vibrio fischeri* (Engebrecht, 1983) fue usada por primera vez como gen informador en un ensayo de expresión en 1985 (Engebrecht *et al.*).

Introducción

Desde entonces los genes *luxAB* que codifican la luciferasa heterodimérica y los genes *luxCDE* que se necesitan para la producción de tetradecanal, que es el sustrato de la luciferasa, han sido muy utilizados (Fig. 6C). Muchas de las aplicaciones de este gen tienen que ver con la generación de biosensores contra fenoles (Leedjäv *et al.*, 2006), naftaleno (Burlage *et al.*, 1990), mercurio (Fu *et al.*, 2008) o metales pesados (Riether *et al.*, 2001).

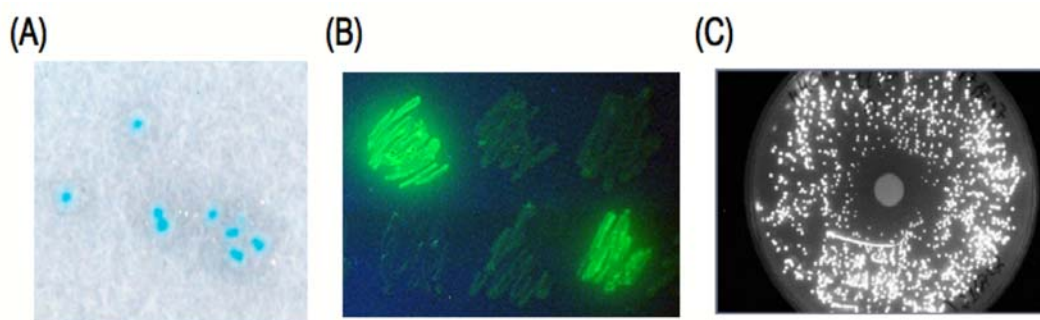


Fig. 6. Los genes informadores *lacZ*, *gfp* y *lux*. Ejemplos de cepas bacterianas crecidas en medio sólido y expresando los genes informadores *lacZ* (A), *gfp* (B) y *lux* (C).

Estos tres genes informadores han sido elegidos para la construcción de las trampas genéticas que se describen en la presente Tesis Doctoral.

3.3 *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* como organismos receptores de las trampas genéticas. *E. coli* es un bacilo Gram-negativo capaz de crecer en presencia y ausencia de oxígeno con una longitud de entre 1-2 μm y 0.5-1 μm de diámetro (Trun y Trempey, 2004). Se trata de uno de los organismos procarióticos más estudiados y caracterizados y ha sido ampliamente usado en aplicaciones biotecnológicas como hospedador de genotecas metagenómicas. De hecho, la gran mayoría de genotecas descritas en la literatura han sido construidas en esta especie bacteriana debido a su versatilidad para usar los distintos tipos de vectores donde se construyen las genotecas.

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos Gram-negativos muy versátiles nutricionalmente, siendo algunas especies capaces de usar hasta 100 fuentes diferentes de carbono y energía. También es característico de este género la capacidad que tienen estas bacterias de mineralizar compuestos tóxicos tanto aromáticos como alifáticos (Ramos *et al.*, 2002). En concreto la especie *Pseudomonas putida* y sus estirpes KT2440 (Bagdasarian *et al.*, 1981) y KT2442 (Franklin *et al.*, 1981) son bacterias de

crecimiento rápido de fácil manejo en el laboratorio y robustas ante la presencia de compuestos tóxicos en el medio.

El elevado número de genotecas metagenómicas construidas en *E. coli* y la robustez de *P. putida* para mineralizar compuestos xenobióticos a través de la expresión de operones catabólicos fueron los motivos por los que se decidió usar estas especies bacterianas para este trabajo.

3.4 Sistemas de inserción de reguladores transcripcionales, promotores y genes informadores en bacterias. El diseño de bacterias Gram–negativas como biosensores de contaminantes ambientales o como trampas genéticas para el tamizado de genotecas metagenómicas, requiere la elección de los componentes genéticos adecuados. Estos componentes, como ya ha sido indicado anteriormente, son los reguladores transcripcionales y los genes informadores. Sin embargo no sólo la elección, sino también la inserción en una forma estable y ortogonal^a de estos elementos en el *chasis* genómico de la bacteria es determinante. La ortogonalidad de la inserción asegura que el nuevo segmento de ADN integrado no afecte a la robustez/viabilidad de la cepa bacteriana mientras que la estabilidad de la inserción garantiza que ésta, se mantenga de generación en generación sin necesidad de una presión selectiva (de las Heras *et al.*, 2008).

Estas dos cualidades de la inserción cromosómica estable se pueden conseguir mediante distintos métodos, siendo el sistema *attB/attP* de las integrasas de fagos y los minitransposonones, dos de los más usados.

3.4.1 Sistema *attB/attP* de las integrasas de fagos. Las integrasas de fagos son proteínas capaces de catalizar la recombinación unidireccional y específica de las secuencias de ADN *attP* (sitio de unión del fago) y *attB* (sitio de unión de la bacteria); (Groth y Calos, 2004). Existen distintos tipos de estas integrasas como la recombinasa Cre del fago P1 (Abremski y Hoess, 1984), la FLP invertasa de levaduras (Andrews *et al.*, 1985), la invertasa Gin del fago Mu (Kahmann *et al.*, 1985) o las integrasas Phi C31 (Kuhstoss y Rao, 1991) o Phi CTX (Schweizer y de Lorenzo, 2004), que han sido

^a A es ortogonal con respecto a B si A no influencia a B.

Introducción

estudiadas y utilizadas ampliamente en distintos sistemas procarióticos y eucarióticos. Una de estas aplicaciones está basada en el sistema de *P. aeruginosa* mini-CTX que consiste en un conjunto de vectores que, entre otras características llevan una integrasa modificada Phi CTX y el sitio de unión de Phi CTX (Hoang *et al.*, 2000). Estos vectores permiten la inserción estable y ortogonal de genes en un sitio definido (secuencia *attB*) del genoma de *P. aeruginosa* (Schweizer *et al.*, 2001). Esta inserción cromosómica hace posible estudiar la regulación en monocopia de los promotores T7 y *lac* (Schweizer, 2001) usando como genes informadores *lacZ* y *lux* (Becher y Schweizer, 2000), y llevar a cabo análisis de formación de biofilms (Wyckoff y Wozniak, 2001). Sin embargo, aunque el sistema de *P. aeruginosa* mini-CTX se restringe únicamente a su uso en esta bacteria, existen también sistemas *attB/attP* de las integrasas de fagos, de amplio espectro de hospedador. Uno de ellos es el de la integrasa Phi C31, que permite llevar a cabo inserciones en genomas de mamíferos con el fin de desarrollar terapias génicas en hígado de ratón (Olivares *et al.*, 2002), retina de rata (Chalberg *et al.*, 2005) o en células humanas (Ortiz-Urda *et al.*, 2002).

3.4.2 Minitransposones mini-Tn5 y mini-Tn7. El otro método más usado para llevar a cabo inserciones cromosómicas es el uso de minitransposones. Estos elementos móviles son fragmentos de ADN capaces de saltar de un segmento de ADN a otro, por medio de una transposasa que cataliza el proceso (Trun y Trempey, 2004). De entre los distintos transposones, los minitransposones Tn5 (de Lorenzo y Timmis, 1994) y Tn7 (Peters, 2001) han sido ampliamente usados para insertar segmentos genómicos en cromosomas bacterianos. El transposón mini-Tn5 se introduce en el cromosoma de la cepa receptora, dando lugar a un amplio repertorio de inserciones. Hay una gran variedad de vectores, como los de la serie pUT mini-Tn5 (de Lorenzo y Timmis, 1994) que permiten clonar segmentos de ADN en el elemento móvil transposón de tal forma que luego éste salte del vector directamente al cromosoma de la cepa receptora. Usando estos vectores se ha conseguido generar cepas bacterianas que actúan como biosensores contra contaminantes como el mercurio (Hansen y Sørensen, 2000b), herbicidas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Hay *et al.*, 2000), tetraciclinas (Hansen y Sørensen, 2000a) o marcadores ecotóxicos como cobre, zinc o 3,5-diclorofenol (Weitz *et al.*, 2001). Por otro lado el minitransposón Tn7 se inserta de una forma específica y en una orientación determinada en el cromosoma de la cepa receptora, que lleve el sitio *attTn7* de inserción de este transposón (Choi, 2005). Esta

característica diferente a la del mini-Tn5, que se inserta al azar, permite comparar como se comportan dos segmentos de ADN diferentes integrados en el mismo contexto cromosómico de una cepa bacteriana. Esta cualidad permite llevar a cabo estudios de comportamiento de genes informadores (Shen *et al.*, 1992; Masson *et al.*, 1993; Koch *et al.*, 2001), análisis de formación de biofilms (Klausen *et al.*, 2003) y también en el desarrollo de biosensores (Højberg *et al.*, 1999).

Para la inserción de los reguladores transcripcionales, promotores y genes informadores en las cepas donde se construyen las trampas genéticas descritas en este trabajo se decidió usar un sistema de dos transposones mini-Tn5 y mini-Tn7.

4. La interacción entre moléculas efectoras y reguladores transcripcionales como elementos clave en la construcción de trampas genéticas.

Como se indicó en el apartado 3.1, existe un amplio conocimiento sobre reguladores transcripcionales que interactúan con distintas moléculas efectoras. La estructura química y reactividad de estas moléculas se conoce en muchos casos, así como la secuencia, estructura modular y en algunos casos estructura cristalina de los reguladores. Sin embargo se sabe poco sobre la interacción que ocurre entre el efector y la proteína responsable de la regulación de los operones catabólicos. Esta interacción puede ser de distinta naturaleza y el estudio de ésta mediante análisis estructurales, bioinformáticos o bioquímicos puede proporcionar una información determinante, para la optimización y generación de variantes de reguladores transcripcionales con nuevas especificidades y aplicaciones biotecnológicas.

4.1 El regulador transcripcional XylR y su interacción con el efector. El regulador transcripcional XylR pertenece a la familia de reguladores transcripcionales tipo NtrC dependientes del factor sigma 54 de la ARN polimerasa (Morett y Segovia, 1993), que están involucrados en la regulación de diversos procesos fisiológicos como respuesta a señales medioambientales (Van Dien y de Lorenzo, 2003). Se trata de una proteína de 566 aa con un peso molecular de 63 kDa que regula la ruta de mineralización de compuestos aromáticos como tolueno, *m*-xileno y *p*-xileno (Assinder y Williams, 1990). Esta ruta está codificada en el plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida* mt-2 y está organizada en [i] la ruta superior (*upper*) encargada de la conversión de

Introducción

tolueno/xilenos en benzoato/alquilbenzoatos por activación del promotor *Pu* y [ii] la ruta *meta* encargada de la conversión de benzoato en intermediarios del ciclo de Krebs por activación del promotor *Pm* (Ramos y Marques, 1997). XylR es capaz de estimular la transcripción del promotor *Pu* (Harayama *et al.*, 1989) cuando adquiere su conformación activa, lo que ocurre cuando interacciona con sus efectores naturales tolueno, *m*-xileno o *p*-xileno. Esta interacción tiene lugar en el dominio N-terminal de la proteína. Como ya se ha indicado anteriormente XylR tiene una estructura modular, que consta de 4 dominios. El dominio A en el extremo N-terminal es el responsable de la unión con los efectores (Devos *et al.*, 2002), el dominio B, tipo *Q linker* (Wootton y Drummond., 1989), está involucrado en la activación de la proteína y sirve de unión entre los dominios A y C. Este último interacciona con el factor sigma 54 de la ARN polimerasa, hidroliza ATP a través de su motivo ATPasa y es responsable de la oligomerización de XylR (Perez-Martin y de Lorenzo, 1996). Finalmente el dominio D en el extremo C-terminal es el responsable de la unión a ADN (Devos *et al.*, 2002).

Existe gran cantidad de información sobre la la estructura modular de XylR y las funciones de sus distintos dominios, gracias a datos genéticos y bioquímicos de esta proteína y de DmpR (ver Resultados 2.1). Entre ellos están la generación de mutantes espontáneos (Pavel *et al.*, 1994), mutantes obtenidos por evolución dirigida (Galvao *et al.*, 2007), el barajeo genético (Skärfstad *et al.*, 2000; Garmendia *et al.*, 2001) o la mutagénesis dirigida (Salto *et al.*, 1998). Pero a pesar de todos estos datos no se tiene una evidencia clara de qué residuos de estas proteínas están implicados en la unión al efector. Esto se debe fundamentalmente a la falta de una estructura tridimensional de XylR, que no se ha podido conseguir todavía debido a la dificultad de purificar esta proteína de forma soluble y estable. Sin embargo existe un modelo bioinformático del dominio A de XylR lo suficientemente consistente para estudiar *in silico* la interacción del efector con la proteína.

4.2 Modelo estructural del extremo N-terminal de XylR. El modelo del dominio A de XylR diseñado por Devos *et al.* (2002) se basa en datos cristalográficos del cristal de la catecol O-metiltransferasa (COMT) de rata llamada 1vid (Vidgren *et al.*, 1994). La construcción de este modelo se basó en [i] la utilización de herramientas bioinformáticas de enhebrado de estructuras (*threading*), [ii] la distribución de los residuos característicos de las familias de secuencias (XylR, DmpR o HbpR entre

otras), tales como determinantes apolares y mutaciones correlacionadas y [iii] las propiedades fisico-químicas de los aminoácidos conservados entre las proteínas de la familia de activadores dependientes de sigma 54 y la de la enzima COMT. El resultado fue un modelo de 207 residuos con un plegamiento típico α/β con ocho α -hélices y siete láminas β . Esta estructura, que concordaba con distintos datos experimentales, permitió predecir los aminoácidos que debido a sus propiedades fisico-químicas y posición en la estructura eran más probables de interactuar con una molécula efectora. Estos residuos son el 37, el 65 y los comprendidos entre 110-186, con especial interés en el 140 y el 172. Según este modelo, la posición 37 es clave ya que está ocupada por una metionina y parece que el átomo de azufre pudiese estar involucrado en el reconocimiento del anillo aromático. Las posiciones 65 (fenilalanina), 140 (glutámico) y 172 (glutámico), de carácter hidrofóbico, parecen estar involucradas en la especificidad de XylR por el sustrato (Delgado, 1994; Shingler y Pavel, 1995; Garmendia *et al.*, 2001).

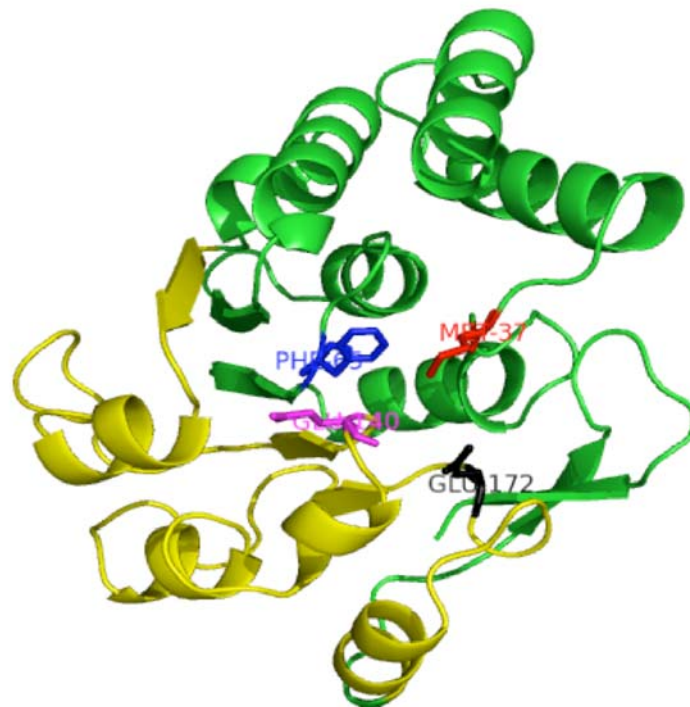


Fig. 7. Modelo del dominio A de XylR (Devos *et al.*, 2002). La estructura del modelo presenta ocho α -hélices y siete láminas β . Además en amarillo se destaca la región comprendida entre los aminoácidos 110-186 y los residuos Met37 (rojo), Phe65 (azul) Glu140 (magenta) y Glu172 (negro) susceptibles de interactuar con el efector de XylR (figura descargada y modificada de Devos *et al.* 2002).

4.3 Caracterización de la unión entre XylR y su efector: Entrecruzamiento químico. Hasta ahora los datos que se tienen de la interacción de un efector con el dominio A de XylR han sido generados *in silico* usando el modelo de Devos *et al.* (2002). Para comprobar la solidez de este modelo se necesitan evidencias experimentales de la interacción de XylR con su efector. A tal efecto, se puede llevar a cabo una estrategia de entrecruzamiento químico entre una molécula efectora funcionalizada y la proteína XylR. Esta técnica se usa generalmente para unir covalentemente dos proteínas entre sí. Para ello se suelen usar reactivos de entrecruzamiento con dos o más grupos funcionales, que se clasifican como homobifuncionales si el grupo reactivo es el mismo, o heterobifuncionales si son diferentes (Mattson *et al.*, 1993). Sin embargo, existe una variante de estos reactivos que se pueden denominar monofuncionales que constan de un solo grupo reactivo y que por lo tanto forman un solo enlace covalente con una proteína. Este tipo de reactivos se suelen usar para identificar qué aminoácidos de una proteína están más expuestos al medio en el que se encuentra dicha proteína o para determinar de qué forma reacciona una molécula con una proteína (Gingras *et al.*, 2007). Esta estrategia parece por lo tanto una buena aproximación para caracterizar de una forma experimental la interacción entre XylR y sus moléculas efectoras tolueno, *m*-xileno y *p*-xileno.

4.3.1 El bromuro de bencilo como efector funcionalizado. Los efectores naturales de XylR, *m*-xileno, tolueno y *p*-xileno son moléculas aromáticas cuyas principales características son su estabilidad y poca reactividad debida a la presencia de un anillo aromático en su estructura. Para elegir una molécula efectora funcionalizada que se pueda usar para ensayos de entrecruzamiento químico con XylR, hay que tener en cuenta dos factores [i] la molécula debe ser análoga estructuralmente a los efectores naturales, es decir que debe tener un solo anillo aromático y [ii] los grupos reactivos presentes en esta molécula deben situarse en las posiciones bencílicas de los sustituyentes alquilos del tolueno o xileno para que se parezca estructuralmente lo máximo posible a los efectores naturales. Teniendo en cuenta estas consideraciones se eligió al bromuro de bencilo como posible candidato a ser usado en ensayos de entrecruzamiento químico.

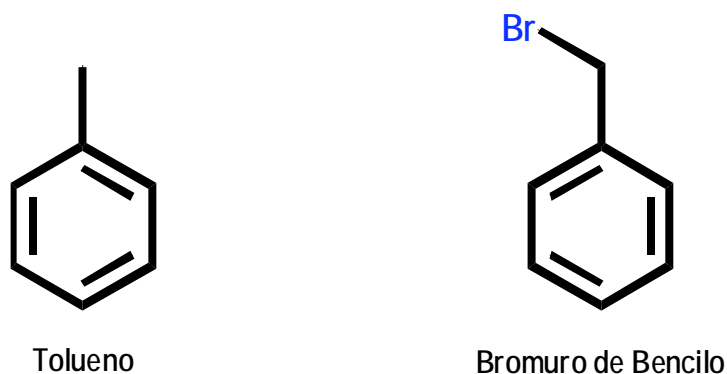


Fig. 8. Estructura de tolueno y bromuro de bencilo.

El bromuro de bencilo es una molécula orgánica que posee un anillo aromático como el existente en el tolueno y que cumple las condiciones anteriormente descritas. Tiene además en su estructura un grupo reactivo en una posición alquímica. Este grupo es un halógeno como el bromo que ocupa la posición de un hidrógeno del grupo metilo del tolueno. Esta posición bencílica sustituida por bromo es especialmente reactiva.

4.3.2 Hipótesis de la reactividad de bromuro de bencilo con los aminoácidos de XylR. Los aminoácidos que conforman la proteína XylR, son susceptibles de reaccionar por los grupos nucleófilos de sus cadenas laterales con el bromuro de bencilo. En esta reacción el carbono bencílico, del bromuro de bencilo, es el más reactivo y puede sufrir reacciones de sustitución nucleofila. Por tanto esta molécula se puede usar como posible reactivo de entrecruzamiento químico. La hipótesis de trabajo que se plantea en esta Tesis es que dada la analogía de esta estructura con la molécula de tolueno, podría reaccionar con la proteína XylR proporcionando información sobre [i] las posiciones de XylR que interaccionan de forma natural con el tolueno y [ii] qué zonas de XylR están expuestas al medio y cuales forman el bolsillo de interacción con los efectores naturales.

Este tipo de reactividad se observará fundamentalmente en aminoácidos con buenos grupos nucleófilos. Estos grupos son los átomos de azufre existentes en metioninas y cisteínas, los átomos de oxígeno presentes en aspárticos y serinas entre otros y los nitrógenos de argininas o lisinas. También hay que incluir como residuos con posible reactividad nucleófila a los triptófanos y las histidinas por la naturaleza de sus anillos heteroaromáticos.

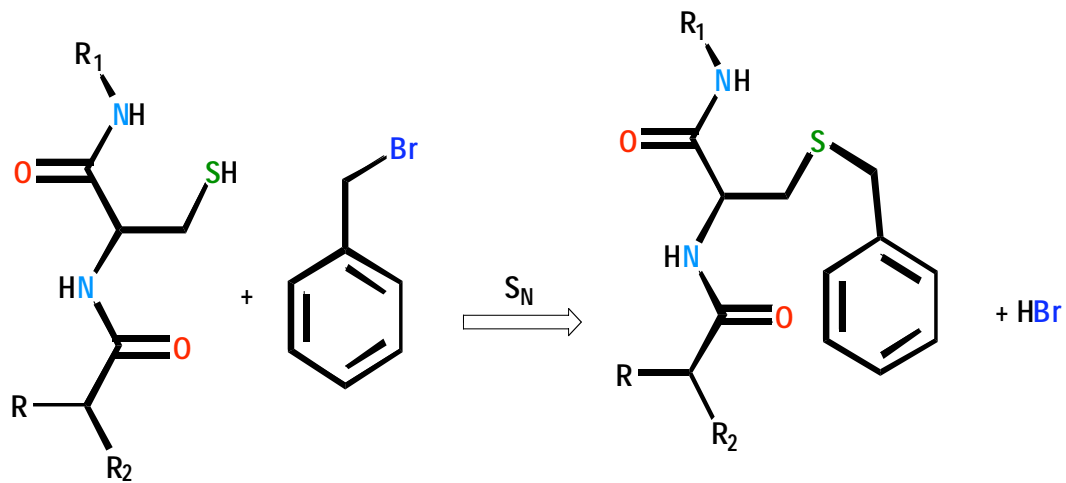


Fig. 9. Hipótesis de la reacción de entrecruzamiento entre un residuo de cisteína de XylR y bromuro de bencilo. Una cisteína de la cadena polipeptídica puede reaccionar por el átomo de azufre nucleófilo con el carbono bencílico del bromuro de bencilo en una reacción de sustitución nucleófila. El resultado de la misma es la formación de un enlace covalente entre el aminoácido y el efector funcionalizado así como la acidificación del medio, por el HBr que se genera. En este ejemplo la incorporación del residuo bencílico aumenta la masa del aminoácido en 90 Da. Esta reacción ha sido descrita principalmente para metioninas (Rogers *et al.*, 1976; Lang *et al.*, 2006).

El planteamiento de este trabajo es que un mejor conocimiento de la interacción efector/regulador junto con la capacidad de generar variantes de proteínas reguladoras permitirá el diseño de nuevos circuitos genéticos. Estos circuitos podrán ser insertados en bacterias de forma ortogonal y estable usando el sistema descrito en este trabajo. De esta forma se podrán construir cepas bacterianas como [i] trampas genéticas para actividades enzimáticas para las cuales todavía no existe un sistema efectivo de selección y [ii] biosensores bacterianos de moléculas predeterminadas.

En otras palabras, el trabajo que se presenta a continuación proporciona un conjunto de ejemplos en los que un proceso metabólico ha sido acoplado a un circuito regulador de tal manera que el uno se convierte en un indicador del otro.

OBJETIVOS

A lo largo de esta Tesis se ha abordado el desarrollo y validación de herramientas moleculares que permitan traducir la ocurrencia de una reacción metabólica en un fenotipo detectable/seleccionable. A tal efecto se ha planteado:

Objetivo general:

Desarrollo de un sistema eficaz de conversión de actividades enzimáticas en salidas (*outputs*) ópticos.

A través de los siguientes objetivos específicos:

1. Construcción de vectores versátiles que permitan la inserción de la maquinaria genética necesaria para la construcción de Trampas Genéticas y biosensores en distintos tipos de cepas receptoras de *E. coli* y *P. putida*.
2. Construcción de tres trampas genéticas para la identificación de actividades tipo:
 - Monooxigenasas de anillo.
 - BIODESULFURIZACIÓN DE DIBENZOTIOFENO.
 - Dehidroclorinación de lindano.
3. Validación del correcto funcionamiento de las Trampas Genéticas.
4. Construcción de un biosensor para la detección de salicilato como intermedio en las rutas de degradación de antraceno y naftaleno.
5. Caracterización *in vivo* e *in vitro* de la interacción del regulador transcripcional XylR, con un ligando funcionalizado.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas y plásmidos. En las Tablas 2 y 3 se detallan las estirpes bacterianas usadas en este trabajo, así como sus características genotípicas y fenotípicas.

Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli*.

<i>E. coli</i>	Genotipo/fenotipo	Referencia
DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lac U169</i> , (ϕ 80 <i>d lac Z</i> Δ <i>M</i> Δ 15), <i>hsdR17 R</i> M^+ , <i>rec A1</i> , <i>end A1</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA</i>	Hanahan, 1983
HB101	<i>rpsL</i> , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>hsdR</i> M^+	Sambrook, 1989
CC118	Δ (<i>ara-leu</i>), <i>araD</i> , Δ <i>lac X 74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (<i>Am</i>), <i>recA1</i>	Manoil, 1985
CC118 <i>Pu-lacZ</i>	Sm^r ; CC118 en cuyo cromosoma se insertó el transposón mini-Tn5 Sm con una fusión transcripcional <i>Pu-lacZ</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1991
BL21(ED3) pLysS	Tc^r ; F^- , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>dcm</i> $^+$, <i>gal</i> λ (DE3), <i>endA</i> , Hte. Con el plásmido pLysS	www.stratagene.com
CC118 λ <i>pir</i>	CC118 lisogenizada con λ <i>pir</i>	Herrero <i>et al.</i> , 1990
MC4100	Sm^r ; <i>araD319</i> , Δ (<i>argF</i> <i>lac</i>) <i>U169</i> , <i>rpsL150</i> , <i>relA1</i> <i>flbB5301</i> , <i>deoC1</i> , <i>ptsF25</i>	Prieto y García, 1997
MC4100[MAD2]	Cm^r ; MC4100 con el cassette MAD2 (<i>XylR</i> $\Delta\Delta$ <i>Pu-lacZ</i>)	Regalo del Dr. Ildefonso Cases

Tabla 3. Cepas de *Pseudomonas putida*.

<i>P. putida</i>	Genotipo/fenotipo	Referencia
KT2440	<i>hsdR1</i> , protótrofa, cepa de referencia	Franklin <i>et al.</i> , 1981
KT2442	Rif^r ; protótrofa derivada de la cepa de referencia KT2440	Herrero <i>et al.</i> , 1990
KT0LUX	Km^r ; KT2440 con el segmento Tn5LUX en el cromosoma	Este trabajo
KT0LacZ	Km^r ; KT2440 con el segmento Tn5LacZ en el cromosoma	Este trabajo
KT2LUX	Km^r ; KT2442 con el segmento Tn5LUX en el cromosoma	Este trabajo
KT2LacZ	Km^r ; KT2442 con el segmento Tn5LacZ en el cromosoma	Este trabajo
KT0MoOxLUX	Km^r , Gm^r ; KT0LUX con el transposón mini-Tn7, con <i>dmpR</i> y <i>Pu-lux</i> , en el cromosoma	Este trabajo
KT0DBTLUX	Km^r , Gm^r ; KT0LUX con el transposón mini-Tn7, con <i>hbpRCBP6</i> y <i>Pc-lux</i> , en el cromosoma	Este trabajo
KT0BxLUX	Km^r , Gm^r ; KT0LUX con el transposón mini-Tn7, con <i>xylR</i> y <i>Pu-lux</i> , en el cromosoma	Este trabajo
KT0Bx5LUX	Km^r , Gm^r ; KT0LUX con el transposón mini-Tn7, con <i>xylR5</i> y <i>Pu-lux</i> , en el cromosoma	Este trabajo

Materiales y Métodos

KT0DntRLUX	Km ^r , Gm ^r ; KT0LUX con el transposón mini-Tn7, con <i>dntR</i> y <i>Pu-lux</i> , en el cromosoma	Este trabajo
KT2MoOxLUX	Km ^r , Gm ^r ; KT2LUX con el transposón mini-Tn7, con <i>dmpR</i> y <i>Pu-lux</i> , en el cromosoma	Este trabajo
KT2DBTLUX	Km ^r , Gm ^r ; KT2LUX con el transposón mini-Tn7, con <i>hbpRCBP6</i> y <i>Pc-lux</i> , en el cromosoma	Este trabajo
KT2Bx5LUX	Km ^r , Gm ^r ; KT2LUX con el transposón mini-Tn7, con <i>xylR5</i> y <i>Pu-lux</i> , en el cromosoma	Este trabajo
KT2DntRLUX	Km ^r , Gm ^r ; KT2LUX con el transposón mini-Tn7, con <i>dntR</i> y <i>Pu-lux</i> , en el cromosoma	Este trabajo
KTMoOxΔR	KT0MoOxLUX, sensible a Km y Gm	Este trabajo
KTDBTΔR	KT0DBTLUX, sensible a Km y Gm	Este trabajo
KTBxΔR	KT0BxLUX, sensible a Km y Gm	Este trabajo
KTBx5ΔR	KT0Bx5LUX, sensible a Km y Gm	Este trabajo
KTDntRAR	KT0DntRLUX, sensible a Km y Gm	Este trabajo
KT2MoOxΔT7R	Km ^r , Gm ^r ; KT2MoOxLUX sin extremo derecho del mini-Tn7	Este trabajo
KT2DBTΔT7R	Km ^r , Gm ^r ; KT2DBTLUX sin extremo derecho del mini-Tn7	Este trabajo
KT2Bx5ΔT7R	Km ^r , Gm ^r ; KT2Bx5LUX sin extremo derecho del mini-Tn7	Este trabajo
KT2DntRΔT7R	Km ^r , Gm ^r ; KT2DntRLUX sin extremo derecho del mini-Tn7	Este trabajo
KTMoOx	KTMoOxΔR sin extremo derecho del mini-Tn7. Trampa genética para monooxigenasas de anillo	Este trabajo
KTDBT	KTDBTΔR sin extremo derecho del mini-Tn7. Trampa genética para biodesulfurización de dibenzotiofeno (DBT)	Este trabajo
KTBx	KTBxΔR sin extremo derecho del mini-Tn7. Biosensor de tolueno y <i>m</i> -xileno	Este trabajo
KTBx5	KTBx5ΔR sin extremo derecho del mini-Tn7. Trampa genética para dehidroclorinación de lindano	Este trabajo
KTDntR	KTDntRAR sin extremo derecho del mini-Tn7. Biosensor de salicilato	Este trabajo

Tabla 4. Plásmidos.

Plásmidos	Características	Referencia
pRK600	Cm ^r ; <i>oriV</i> ColE1, <i>mob</i> RK2, <i>tra</i> K2. Ayudante para movilización en conjugaciones tripartitas	Kessler <i>et al.</i> , 1992
pUT/mini-Tn5 ^{res} L Km	Ap ^r , Km ^r ; <i>oriV</i> R6K, <i>oriT</i> RP4. Plásmido de donación suicida de mini-Tn5 Km con una secuencia <i>res</i>	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pTn5LacZ	Ap ^r , Km ^r ; <i>oriV</i> R6K, <i>oriT</i> RP4. Plásmido de donación suicida de mini-Tn5, con secuencias <i>res</i> , <i>attTn7</i> y FRT y gen informador <i>lacZ</i> derivado de pUT/mini-Tn5 ^{res} L Km	de las Heras <i>et al.</i> , 2008

pTn5Lux	Ap ^r , Km ^r ; <i>oriV</i> R6K, <i>oriT</i> RP4. Plásmido de donación suicida de mini-Tn5, con secuencias <i>res</i> , <i>attTn7</i> y FRT y gen informador <i>lux</i> derivado de pUT/mini-Tn5 <i>resL</i> Km	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pTn5GFP	Ap ^r , Km ^r ; <i>oriV</i> R6K, <i>oriT</i> RP4. Plásmido de donación suicida de mini-Tn5, con secuencias <i>res</i> , <i>attTn7</i> y FRT y gen informador <i>gfp</i> derivado de pUT/mini-Tn5 <i>resL</i> Km	Este trabajo
pUC18/pUC19	Ap ^r ; vectores de clonación de alto número de copia con <i>oriV</i> ColE1	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pCK217	Ap ^r , Km ^r ; vector de donde se obtiene la secuencia <i>res</i>	Kristensen <i>et al.</i> , 1995
pUC18 <i>Not</i>	Ap ^r ; derivado del pUC18 en el que el MCS está flanqueado por sitios <i>NotI</i>	Herrero <i>et al.</i> , 1990
pResR	Ap ^r ; pUC18 <i>Not</i> con un fragmento <i>SphI</i> de 321 pb del plásmido pCK217 con la secuencia <i>res</i>	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pBK-mini-Tn7-Gm	Ap ^r , Gm ^r ; derivado de pUC19 con mini-Tn7-Gm	Koch <i>et al.</i> , 2001
pBK-mini-Tn7-Gm <i>resRI</i>	Ap ^r , Gm ^r ; derivado de pBK-mini-Tn7-Gm con un fragmento <i>Kpn I/NotI</i> de 368 pb del plásmido pResR fuente de la secuencia <i>res</i>	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pPS856	Ap ^r , Gm ^r ; vector de donde se obtiene la secuencia FRT	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pTn7-FRT	Ap ^r , Gm ^r ; derivado de pBK-mini-Tn7-Gm <i>resRI</i> con un fragmento <i>AflIII/MluI</i> de 118 pb amplificado del plásmido pPS856 fuente de la secuencia FRT	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pTn7FRTΔ <i>EcoRI</i>	Ap ^r , Gm ^r ; pTn7-FRT sin la diana <i>EcoRI</i> en la secuencia FRT	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pGP704	Ap ^r ; <i>oriV</i> R6K, <i>mob</i> RP4, con MCS de M13tg131	Miller, 1998
pCAC4	Ap ^r , Gm ^r ; derivado de pGP704 con transposón Tn7, con las secuencias <i>res</i> y FRT como fragmento <i>SacI</i> de 2 Kb de pTn7FRTΔ <i>EcoRI</i>	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pTns1	Ap ^r ; <i>oriV</i> R6K, con genes <i>tnsABCD</i> de la transposasa del transposón Tn7	Choi, 2005
pCAC5	Ap ^r , Gm ^r ; derivado de pCAC4 con un inserto <i>EcoRI</i> de 8.4 Kb del vector pTns1 con los genes <i>tnsABCD</i>	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pPuE	Ap ^r ; derivado del pUC18 <i>Not</i> con el promotor <i>Pu</i> y sin el sitio <i>EcoRI</i> del MCS	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pBXPU	Ap ^r ; derivado del pPuE con <i>xylR</i> y <i>Pu</i>	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pCAC5BxPu	Ap ^r , Gm ^r ; pCAC5 con un inserto <i>NotI</i> de 3.1 Kb con <i>xylR</i> y <i>Pu</i> del vector pBXPU	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pBX5PU	Ap ^r ; derivado del pPuE con <i>xylR5</i> y <i>Pu</i>	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pCAC5Bx5Pu	Ap ^r , Gm ^r ; pCAC5 con un inserto <i>NotI</i> de 3 Kb con <i>xylR5</i> y <i>Pu</i> del vector pBX5PU	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pDntR	Ap ^r ; derivado del pUC18 <i>Not</i> con <i>dntR</i> y <i>P_{DntR}</i>	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pCAC5DntR	Ap ^r , Gm ^r ; pCAC5 con un inserto <i>NotI</i> de 1073 pb con <i>dntR</i> y <i>P_{DntR}</i> del vector pDntR	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pUC-DmpR	Ap ^r ; derivado de pUC18 <i>Not</i> con un inserto <i>EcoRI/KpnI</i> con <i>dmpR</i>	Regalo de la Dra. Silvia Fernández

Materiales y Métodos

pPu	Ap ^r ; derivado de pUC18 <i>Not</i> con el promotor <i>Pu</i>	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pDmpRPu	Ap ^r ; derivado del pPu con un fragmento <i>EcoRI/BamHI</i> de 2 Kb con <i>dmpR</i> del plásmido pUC-DmpR	Este trabajo
pCAC5DmpRPu	Ap ^r , Gm ^r ; pCAC5 con un inserto <i>NotI</i> de 3.1 Kb con <i>dmpR</i> y <i>Pu</i> del vector pDmpRPu	Este trabajo
pH6pR	Ap ^r ; pUC18 <i>Not</i> con inserto <i>EcoRI/SalI</i> del plásmido pHBP270 (J.R. van der Meer) con <i>hbpR</i> y <i>Pc</i>	Este trabajo
pCAC3	Ap ^r , Gm ^r ; derivado de pBK-mini-Tn7-Gm, con <i>hbpR</i> y <i>Pc</i> como inserto <i>NotI</i>	Este trabajo
pCAC5HbpR	Ap ^r , Gm ^r ; pCAC5 con un inserto <i>NotI</i> de 3 Kb con <i>hbpR</i> y <i>Pc</i> del vector pCAC3	Este trabajo
pCAC7	Ap ^r ; pUC18 <i>Not</i> con inserto <i>EcoRI/SalI</i> del plásmido pHBP269AM3 (Beggah, 2008) con <i>hbpRCBP6</i> y <i>Pc</i>	Este trabajo
pCAC5HbpRCBP6	Ap ^r , Gm ^r ; pCAC5 con un inserto <i>NotI</i> de 3 Kb con <i>hbpRCBP6</i> y <i>Pc</i> del vector pCAC7	Este trabajo
pJMSB8	Ap ^r ; <i>oriV</i> R6K, <i>oriT</i> RP4. Vector de expresión de la recombinasa ParA	Kristensen <i>et al.</i> , 1995
pCP20	Ap ^r , Cm ^r ; vector termosensible de expresión de la recombinasa FLP	Cherepanov y Wackernagel, 1995
pBBFLP	Tc ^r ; vector de expresión de la recombinasa FLP	de las Heras <i>et al.</i> , 2008
pBBR1MCS-3	Tc ^r ; vector de amplio espectro de hospedador de la serie pBBR1MCS	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBZ1261	Ap ^r ; vector de expresión de ToMO de <i>P. stutzeri</i> OX1	Bertoni <i>et al.</i> , 1996
pCAC6	Tc ^r ; derivado de pBBR1MCS-3 con un inserto <i>KpnI/XbaI</i> de 6 Kb con la ToMO de pBZ1261	Este trabajo
pVLT31	Tc ^r ; <i>oriV</i> RSF1010, <i>oriT</i> . Vector de amplio espectro de hospedador de la serie pVLT	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993
pESOX3	Tc ^r ; derivado de pVLT31 con un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de 3.8 Kb con los genes <i>dszABC</i>	Gallardo <i>et al.</i> , 1997
pUC18 <i>NotI</i> LinA	Ap ^r ; derivado del pUC18 <i>Not</i> con el gen <i>linA</i> .	Mohn <i>et al.</i> , 2006
pCAC8	Tc ^r ; derivado de pBBR1MCS-3 con un inserto <i>KpnI/PstI</i> de 1.2 Kb con el gen <i>linA</i> de pUC18 <i>NotI</i> LinA.	Este trabajo
pMalC2T	Ap ^r ; derivado del vector comercial pMAL-c2X (Stratagene) en el que el sitio de corte del factor Xa ha sido sustituido por un sitio de corte con trombina. Para expresar proteínas de fusión con MBP	Regalo de la Dra. Belén Calles
pMalC2T-XylR	Ap ^r ; derivado del vector pMalC2T con un inserto <i>EcoRI/XhoI</i> con la proteína XylR. Para expresar la proteína de fusión MBP-XylR	Este trabajo
pET3H	Ap ^r ; derivado del vector comercial pET3C (Stratagene)	Shingler y Pavel, 1995
pcon1238	Ap ^r ; derivado del vector pET3H con <i>xylR-His</i>	Regalo de la Dra. Victoria Shingler
pLysS	Cm ^r ; expresa el gen de la lisozima de T7	Stratagene

2. Medios y condiciones de cultivo. Para el cultivo de las distintas estirpes de *E. coli* y *P. putida* se usó Luria–Bertani (Sambrook *et al.*, 1989) como medio rico en nutrientes mientras que como medio mínimo se utilizó una mezcla de sales M9 (Miller, 1972), 2 mM de MgSO₄, 2 ‰ de tiamina y 0.2 ‰ de citrato sódico. El crecimiento de las células en medio sólido se hizo rutinariamente en placas Petri con un medio rico en nutrientes compuesto de 1.5 ‰ de agar/LB. También se usaron placas de medio mínimo M9 con agar (1.6 ‰), MgSO₄ (2 mM), tiamina (2 ‰) y citrato sódico (0.2 ‰). A menos que se indique lo contrario las estirpes de *E. coli* se crecieron a 37 °C y las de *P. putida* a 30 °C. En aquellos casos en los que fue necesario el mantenimiento de plásmidos y/o características de la estirpe tanto los medios líquidos como sólidos fueron suplementados con antibióticos a las siguientes concentraciones: Ampicilina (Ap) 100 µg/ml, Piperacilina (Pip) 40 µg/ml, Kanamicina (Km) 75 µg/ml, Cloramfenicol (Cm) 30 µg/ml, Tetracilina (Tc) 10 µg/ml, Gentamicina (Gm) 10 µg/ml y Ácido Nalidíxico (Nx) 10 µg/ml. En algunos casos también se tuvo que añadir en medio sólido 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) 40 µg/ml, sacarosa (Sac) al 8% e isopropil-β-D-galactopiranosido (IPTG) a distintas concentraciones indicadas en cada caso.

2.1 Condiciones de inducción con efector en medio líquido. En aquellos ensayos en los que fue necesario la exposición del cultivo bacteriano a ciertos efectores químicos su concentración fue: fenol 3 mM, 2-hidroxibifenilo (2-HBP) 5-40 µM, dibenzotiofeno (DBT) 0.2 mM, 1,2,4-triclororobenceno (1,2,4-TCB) 2 mM, lindano (γ-HCH) 2 mg/ml y ácido salicílico 10 mM. En el caso de inducción con compuestos volátiles como benceno, *m*-xileno (Xil) o bromuro de bencilo (Br[^]Ph) los cultivos fueron saturados con vapores del inductor. A tal efecto se añadieron 50 µl de una mezcla de benceno (2:5), Xil (1:2) o Br[^]Ph (1:2) con dibutilftalato en el centro de un matraz diseñado para albergar compuestos volátiles no solubles. Las disoluciones de partida de los compuestos con los que se trabajó fueron: fenol 500 mM en agua, 2-HBP 1 M en DMSO, DBT 20 mM en isopropanol, 1,2,4-TCB 0,5 M en DMSO, lindano 0,5 g/ml en DMSO y ácido salicílico 0.5 M en agua.

2.2 Condiciones de inducción con efector en medio sólido. Para los ensayos en placa Petri en los que las distintas estirpes deben de crecer en presencia de efectores, la forma

Materiales y Métodos

de exponer las bacterias a estos fue como sigue. En los casos de fenol, 2-HBP, 1,2,4-TCB y salicílico, un disco de papel Whatman impregnado con 50-100 μl de las disoluciones de partida descritas previamente se colocó en el centro de la placa Petri. Para el benceno, 2 puntas amarillas (Daslab) selladas por la parte más estrecha se llenaron con 35 μl del efector en dibutilftalato (2:5) y se pegaron con cinta adhesiva a la tapa de la placa. Con *m*-xileno se procedió igual que con benceno pero usando sólo una punta con 50 μl de *m*-xileno (1:2) en dibutilftalato. En el caso de DBT, éste se dispuso en la placa de dos formas. En ciertos experimentos se agregó directamente a la mezcla de medio mínimo citrato-agar a una concentración de 0.1 mM y se impregnó con un disco de papel con 100 μl de DBT (20 mM). Para el lindano, éste se agregó directamente a la mezcla de medio mínimo citrato-agar a una concentración final de 0.1 mg/ml. En todos los casos las placas se sellaron con Parafilm. Todos los reactivos químicos usado fueron de la máxima pureza posible y de las marcas comerciales Sigma-Aldrich, Fluka, Merck o Difco.

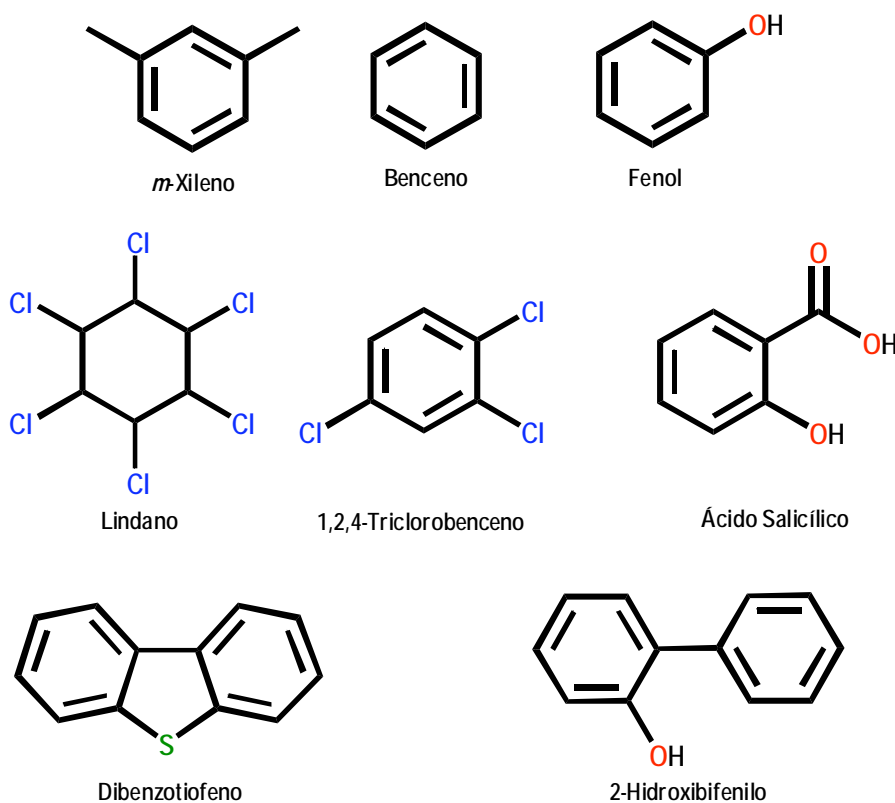


Fig. 10. Estructura química de los distintos reactivos usados en los ensayos de inducción.

3. Manipulación de ácidos nucleicos.

3.1 Técnicas generales. La extracción de ADN plasmídico de las distintas estirpes, la digestión con enzimas de restricción, ligación y electroforesis en geles de agarosa en medio Tris-acetato EDTA (TAE) y otras técnicas de manipulación de ADN recombinante se llevaron a cabo según los protocolos descritos en Sambrook *et al.*, (1989). Para la extracción de vectores de clonaje también se hizo uso de *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System* de Promega. La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se llevó a cabo usando *Nucleo Spin Extract II* de Macherey-Nagel. Las enzimas de restricción usadas fueron adquiridas en la casa comercial *New England Biolabs* mientras que la fosfatasa alcalina y la polimerasa T4 usadas en las reacciones de defosforilación y de ligación respectivamente, fueron adquiridas de la marca Roche.

3.2 Secuenciación de ADN. La secuenciación de las distintas construcciones referidas en este trabajo se llevó a cabo por la empresa SECUGEN con sede en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), con oligonucleótidos del servicio de secuenciación o diseñados a medida para los distintos casos.

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En las reacciones de amplificación de ADN por PCR con oligos diseñados, usando como molde ADN plasmídico, la mezcla de reacción que se usó contenía: 10 ng de plásmido, 0.2 mM de dNTPs, 0.1 μ M de oligonucleótidos y 1.25 mM de MgCl₂. Las ADN polimerasas que se usaron fueron la *Taq* y *Pfu* de Promega o *Vent* de Roche. En muchos casos se usó como molde de la reacción, el ADN de colonias enteras de bacterias introducidas directamente en la mezcla de reacción, que en este caso contenía 0.1 μ M de oligonucleótidos, agua y PCR *Master Mix* de Promega a 1X. El programa de PCR usado de forma rutinaria tenía las siguientes condiciones: un ciclo de 4 min a 95 °C y 30 ciclos cada uno de 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C y 1 min a 72 °C. Concluidos estos 30 ciclos, la reacción se mantuvo a 72 °C durante 10 min para la extensión final de los moldes.

En todos los casos el termociclador usado fue BioRad I Cycler y el programa a utilizar fue modificado dependiendo de la T_m de los oligonucleótidos y del tamaño de ADN que se quería amplificar. El rendimiento de la reacción se comprobó en gel de agarosa.

Materiales y Métodos

En aquellos casos que fue necesario los fragmentos amplificados se purificaron de los componentes de la mezcla de reacción usando el kit PCR *Clean up Nucleo Spin Extract II* de Macherey-Nagel.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en este trabajo tanto en reacciones de secuenciación como de PCR fueron sintetizados por las empresas Invitrogen o Sigma-Aldrich. Su nombre y secuencia se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en este trabajo para reacciones de PCR y secuenciación de plásmidos.

Nombre	Secuencia (5'-3')
ResR1F	ACATGCATGCTCCGGGGGAACAGACGTT
PS8561F	GCGGCTTAAGTTGAAGTTCCTATTCCGAAGTT
PS8562R	GCCACGCGTGATATCTAGAATTCCATTGAGTA
Tn7Ecodel1F	CTTACTCAATGGTTTTCTAGATATCACGCGTGGATCCCCG
Tn7Ecodel2R	CGGGGATCCACGCGTGATATCTAGAAAACCATTGAGTAAG
Tn71F	ATGAGAGCTCCGCCCAAACATAAACAGGAA
Tn72R	ATGAGAGCTCGGACCAGCCGCGTAACC
LUX3R ¹	CCCCAAGCGACAATAACAT
GFPt3R ¹	GGGTAAGTTTTCCGTATGTTG
Trp2R	TCCGCCCGGGTAAAGAAAGTTAAAATGCCGCC
Pu1F ²	ACGCGTCGACCCGGGAAAGCGCGATGA
Pc1F ²	TGGCAAGTGCATTTTCGGCAG
DntR1F ²	CGGAATTCTTATGCTTCAGAGAAAAGCTC
PhbpC1F	GCGACCGCGGAACCCC

¹LUX3R, GFPt3R y Trp2R hibridan respectivamente hacia arriba de los genes *lux*, *gfp* y *lacZ*.

²Pu1F, Pc1F y DntR1F hibridan hacia abajo de los promotores *Pu*, *Pc* y *P_{DntR}*.

4. Construcción del plásmido pCAC5 y derivados. El vector pCAC5 es un elemento clave en la construcción de las trampas genéticas ya que permite la inserción específica de los reguladores transcripcionales y los promotores en el sitio *attTn7* del cromosoma de las cepas receptoras. La construcción de este vector comenzó con la amplificación de la secuencia *res*, que reconoce la recombinasa ParA (Eberl, 1994; Kristensen *et al.*, 1995), como un fragmento *SphI* de 321 pb del plásmido pCK217, usando la pareja de oligonucleótidos ResR1F y ResR2R. Este fragmento *SphI* fue clonado en el vector pUC18*Not* dando lugar al plásmido pResR. A continuación un fragmento *KpnI/NotI* de 368 pb del vector pResR fue clonado en el plásmido pBKmini-Tn7-Gm dando lugar al plásmido pBK-mini-Tn7-Gm *resR1*. A la vez se generó un fragmento *AflIII/MluI* de 118

pb con la secuencia FRT, cuya recombinación cataliza la flipasa de levaduras FLP (Martinez-Morales *et al.*, 1999), como un fragmento de PCR del plásmido pPS856 usando los cebadores PS8561F y PS8562R. Este fragmento se clonó en el sitio correspondiente del vector pBK-miniTn7-Gm *resRI*, con lo que se obtuvo el vector pTn7-FRT. La diana *EcoRI* de este plásmido, situada en la secuencia FRT, se eliminó por mutagénesis dirigida haciendo uso del kit *Quick Change XL Site Directed Mutagenesis* de Stratagene con los oligos diseñados a tal efecto Tn7Ecode11F y Tn7Ecode12R. El plásmido resultante pTn7-FRT Δ *EcoRI* se usó para amplificar un fragmento *SacI* de 2 Kb que contenía el transposón Tn7 con las secuencias *res* y FRT y el gen de resistencia a Gm, usando los oligonucleótidos Tn71F y Tn72R. Este fragmento *SacI* se clonó en el vector pGP704 dando lugar al plásmido pCAC4. Finalmente, los genes (*tnsABCD*) de la transposasa del Tn7 se clonaron como un inserto *EcoRI* de 8.4 Kb del plásmido pTns1 en el vector pCAC4, dando lugar al vector pCAC5 (de las Heras *et al.*, 2008).

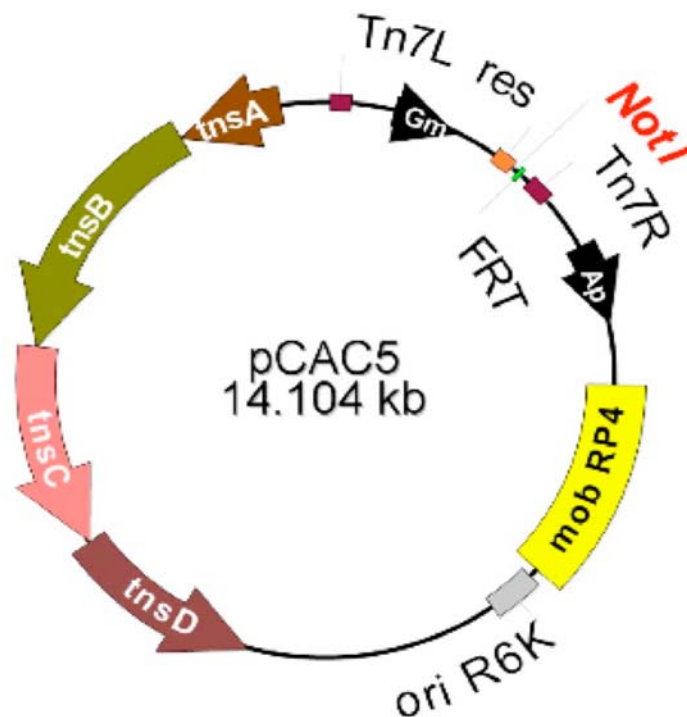


Fig. 11. Mapa del vector suicida pCAC5. Este vector suicida tiene un origen de replicación R6K y el transposón mini-Tn7 con las secuencias *res*, FRT y un sitio de restricción *NotI* donde clonar reguladores transcripcionales y promotores (figura modificada de las Heras *et al.*, 2008).

Materiales y Métodos

El plásmido pCAC5 se usó de molde para la construcción de los vectores que se utilizaron en el trabajo para insertar los reguladores. Éstos fueron clonados siempre como fragmentos *NotI* en el vector y su correcta orientación fue comprobada por PCR. Las parejas de oligonucleótidos fueron Pu1F/FRT2RA para los vectores pCAC5BxPu, pCAC5Bx5Pu y pCAC5DmpRPu; PhbpC1F/Tn72R y Pc1F/Tn72R para pCAC5HbpR y pCAC5HbpRCBP6 respectivamente y DntR3F/FRT2RA para pCAC5DntR.

Tabla 6. Vectores derivados de pCAC5 con los reguladores transcripcionales y los promotores.

Vector pCAC5	Regulador y Promotor
pCAC5BxPu	<i>xylR-Pu</i>
pCAC5Bx5Pu	<i>xylR5-Pu</i>
pCAC5DmpRPu	<i>dmpR-Pu</i>
pCAC5HbpR	<i>hbpR-Pc</i>
pCAC5HbpRCBP6	<i>hbpRCBP6-Pc</i>
pCAC5DntR	<i>dntR-P_{DntR}</i>

5. Manipulaciones genéticas.

5.1 Técnicas genéticas en *E. coli*. La transformación de plásmidos en *E. coli* se hizo usando células competentes preparadas por el método de CaCl₂ descrito en Sambrook *et al.* (1989). La movilización de plásmidos se llevó a cabo por conjugación tripartita según se describe en de Lorenzo y Timmis (1994) usando como cepa ayudante *E. coli* HB101 (pRK600) y eligiendo el medio de selección adecuado con el marcador antibiótico de la cepa receptora y del plásmido movilizado.

5.2 Técnicas genéticas en *P. putida*. Para introducir plásmidos en las estirpes de *P. putida* se electroporaron células, que fueron preparadas según el siguiente procedimiento. Un cultivo crecido toda la noche en medio LB de las células que se quieren hacer electrocompetentes se centrifugó a temperatura ambiente a 3800 rpm durante 12 min. Se tiró el sobrenadante y el sedimento se lavó con 10 ml de una solución de sacarosa 300 mM. A continuación se centrifugó 10 min a 3800 rpm a temperatura ambiente. Se tiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de sacarosa 300 mM y se repartió en dos tubos Eppendorf. El contenido se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente y se resuspendió el sedimento en 1 ml de sacarosa 300 mM. Se volvió a centrifugar a 8000 rpm, 2 min; el centrifugado se

resuspendió en 400 μ l de sacarosa 300 mM y el contenido de los dos tubos se juntó en uno. Finalmente se centrifugó a 8000 rpm, 2 min, el sedimento se resuspendió en 360 μ l de sacarosa 300 mM y se dispensó en alícuotas de 120 μ l. Preferiblemente se electroporaron las células el mismo día que fueron preparadas (Choi *et al.*, 2006). Para la movilización de plásmidos se hizo por conjugación tripartita de acuerdo con lo descrito en de Lorenzo y Timmis (1994) usando como cepa ayudante *E. coli* HB101 (pRK600) y eligiendo para la selección de los exconjugantes un medio mínimo con fuente de carbono citrato y el marcador antibiótico del plásmido movilizado.

6. Construcción de cepas informadoras de *P. putida*. Los segmentos Tn5LUX y Tn5LacZ fueron insertados en el cromosoma de las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2442. A tal efecto, los plásmidos pTn5Lux y pTn5LacZ fueron movilizados a estas cepas por conjugación tripartita. Los exconjugantes se plaquearon en placas de MM citrato Km. Una vez seleccionados y reestriados se comprobó que todos eran resistentes a Km y además sensibles a Pip y así asegurar que el segmento mini-Tn5 hubiese saltado al cromosoma de la cepa receptora. Finalmente y para comprobar que las inserciones fueron efectivas, se hizo una PCR de colonia sobre los distintos exconjugantes usando las parejas de oligos. ResR1F/LUX3R en el caso del segmento Tn5LUX y ResR1F/Trp2R en el caso de Tn5LacZ. Las cepas así generadas se designaron como *P. putida* KT0LUX, *P. putida* KT0LacZ, *P. putida* KT2LUX y *P. putida* KT2LacZ.

Siguiendo con la construcción de las trampas genéticas, se insertaron en las cepas informadoras los distintos reguladores transcripcionales y promotores usando los derivados del vector pCAC5.

7. Inserción de reguladores transcripcionales y promotores en cepas informadoras de *P. putida*. Los genes de los factores transcripcionales DmpR, XylR y XylR5 junto con *Pu*, el regulador HbpRCBP6 y *Pc* y la proteína reguladora DntR con el promotor P_{DntR} fueron insertados en el cromosoma de las cepas *P. putida* KT0LUX y *P. putida* KT2LUX. A tal efecto los vectores pCAC5DmpRPu, pCAC5BxPu, pCAC5Bx5Pu, pCAC5HbpRCBP6 y pCAC5DntR fueron movilizados a estas cepas por conjugación tripartita. Los exconjugantes fueron seleccionados en placas de MM citrato Km Gm, reestriados y su resistencia a Gm y sensibilidad a Pip fue comprobada para confirmar la inserción del transposón Tn7. Finalmente se comprobó por PCR la correcta orientación

de la inserción de este segmento en el sitio *attTn7*. Las parejas de oligonucleótidos usadas fueron Pu1F/Lux3R en los casos que se insertaron los reguladores XylR5 y DmpR, Pc/Lux3R para el regulador HbpRCBP6 y DntR1F/Lux3R para DntR. Las cepas así construidas se designaron *P. putida* KT0MoOxLUX, *P. putida* KT0DBTLUX, *P. putida* KT0BxLUX, *P. putida* KT0Bx5LUX, *P. putida* KT0DntRLUX, *P. putida* KT2MoOxLUX, *P. putida* KT2DBTLUX, *P. putida* KT2Bx5LUX y *P. putida* KT2DntRLUX.

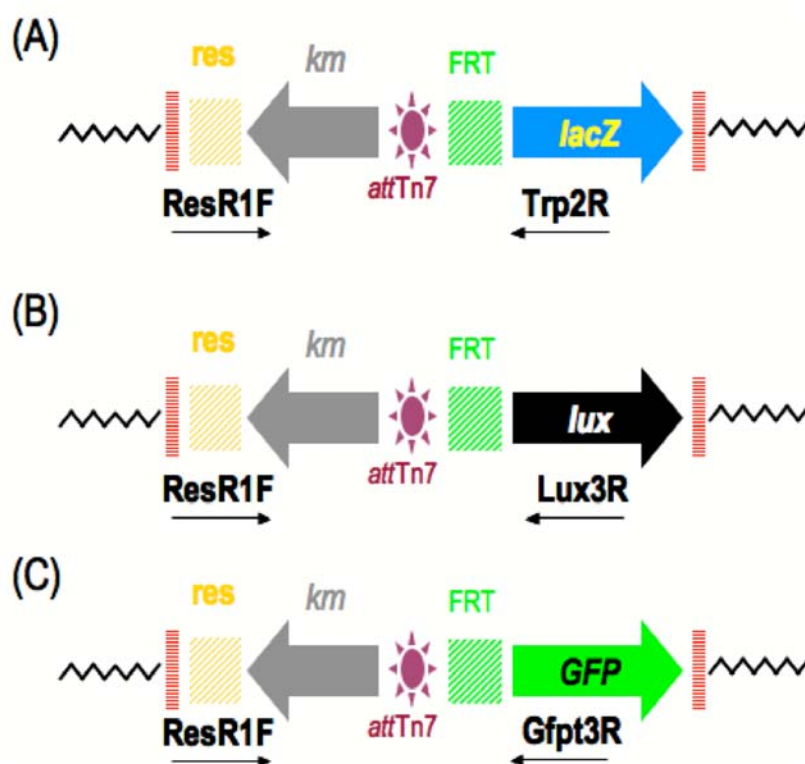


Fig. 12. Esquema de la inserción cromosómica de los segmentos Tn5LacZ, Tn5LUX y Tn5GFP. Estructuras de los segmentos mini-Tn5 con las secuencias *res*, FRT, *attTn7*, gen de resistencia a Km y los genes informadores *lacZ* (A), *lux* (B) y *gfp* (C). También se indica la localización relativa de los oligos ResR1F, Trp2R, Lux3R y Gfpt3R (figura modificada de las Heras *et al.*, 2008).

8. Eliminación de los genes de resistencia a antibióticos en las cepas derivadas de *P. putida* KT2440. Con el fin de eliminar los genes de resistencia a Km y Gm que se usaron en la construcción de las trampas genéticas se movilizó el plásmido pJMSB8 (que codifica para la recombinasa ParA) en las cepas *P. putida* KT0MoOxLUX, *P.*

putida KT0DBTLUX, *P. putida* KT0BxLUX, *P. putida* KT0Bx5LUX y *P. putida* KT0DntRLUX. Esta movilización se hizo por conjugación tripartita, seleccionándose los exconjugantes en MM citrato. Éstos fueron aislados y reestriados en placas de MM citrato, MM citrato Km y MM citrato Gm para comprobar que la pérdida de los genes de resistencia a Km y Gm había sido efectiva. Las cepas así generadas se denominaron *P. putida* KTMoOx- Δ R, *P. putida* KTDBT- Δ R, *P. putida* KTBx- Δ R, *P. putida* KTBx5- Δ R y *P. putida* KTDntR- Δ Gm.

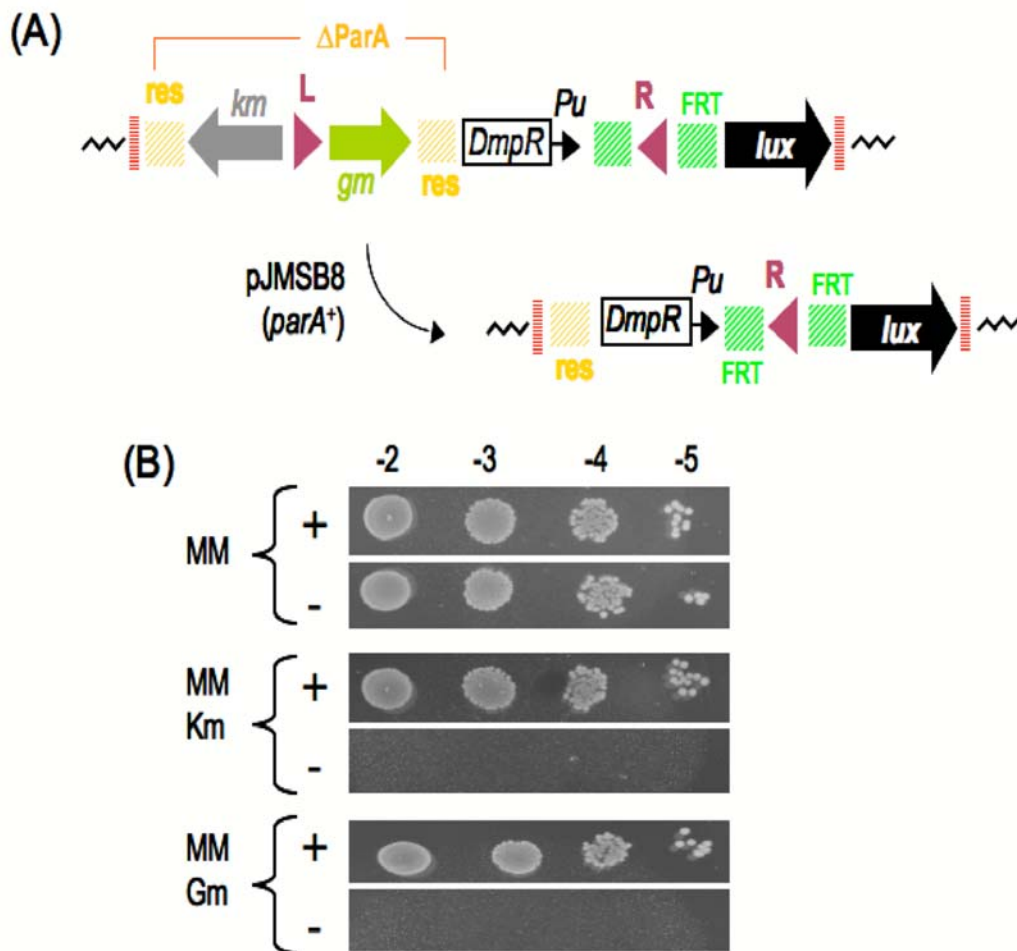


Fig. 13. Eliminación de las resistencias a Km y Gm en la cepa *P. putida* KTMoOxLUX. (A) Esquema de la eliminación de los genes de resistencia a Km y Gm mediada por la proteína ParA expresada del plásmido pJMSB8 que cataliza la recombinación entre las secuencias *res*. (B) Diluciones seriadas de la cepa *P. putida* KTMoOx- Δ R en MM citrato, MM citrato Km y MM citrato Gm antes (primera fila) y después (segunda fila) de la recombinación (figura modificada de las Heras *et al.*, 2008).

Para que las trampas genéticas sean funcionales se necesita activar las fusiones transcripcionales entre los promotores y los distintos genes informadores. Para ello es necesario eliminar el extremo derecho del transposón Tn7. La estrategia usada en las cepas de *P. putida* para eliminar este extremo se basa en la expresión de la FLP flipasa, que cataliza la recombinación entre secuencias FRT.

9. Eliminación del extremo derecho del transposón Tn7 en las cepas *P. putida* KTMoOx- Δ R, *P. putida* KTDBT- Δ R, *P. putida* KTBx- Δ R, *P. putida* KTBx5- Δ R, *P. putida* KTDntR- Δ Gm, *P. putida* KT2MoOxLUX, *P. putida* KT2DBTLUX, *P. putida* KT2Bx5LUX y *P. putida* KT2DntRLUX. Para la eliminación del extremo derecho del transposón Tn7 de las construcciones insertadas en las cepas de *P. putida* se usó la FLP flipasa que lleva el vector pBBFLP. Este vector fue movilizado en las distintas cepas por conjugación tripartita. Los exconjugantes se plaquearon en placas de MM citrato Tc en presencia de *m*-xileno, fenol, 1,2,4-TCB, 2-HBP y salicílico para las cepas con XylR, DmpR, XylR5, HbpRCBP6 y DntR respectivamente. Se registró la bioluminiscencia de las distintas cepas y se eligieron las colonias luminiscentes como candidatas a haber perdido el Tn7R. Posteriormente para inducir la pérdida del plásmido pBBFLP los exconjugantes derivados de *P. putida* KT2442 se reestriaron en placas de MM citrato Km Gm Sac y los derivados de *P. putida* KT2440 en MM citrato Sac. La comprobación por PCR de la pérdida del extremo derecho del transposón Tn7 se hizo con las parejas de cebadores Pu1F/Lux3R, Pc/Lux3R y DntR1F/Lux3R. Las cepas resultantes se denominaron *P. putida* KTMoOx, *P. putida* KTDBT, *P. putida* KTBx, *P. putida* KTBx5, *P. putida* KTDntR, *P. putida* KT2MoOx Δ T7R, *P. putida* KT2DBT Δ T7R, *P. putida* KT2Bx5 Δ T7R y *P. putida* KT2DntR Δ T7R.

10. Ensayos de bioluminiscencia de las cepas *P. putida* para comprobar su capacidad biosensora.

10.1 Ensayos en medio líquido. El registro de bioluminiscencia producida por las cepas en presencia de efectores se realizó de la siguiente forma. Cultivos crecidos toda la noche a 30 °C en MM citrato se llevaron a OD₆₀₀ de 0.15 en MM citrato, se crecieron con agitación a 30 °C y cuando llegaron a aproximadamente entre 0.7-0.8 de OD₆₀₀ se indujeron con el efector correspondiente. Fenol en el caso de *P. putida* KTMoOx, 2-

HBP para *P. putida* KTDBT, *m*-xileno para *P. putida* KTBX, 1,2,4-TCB para *P. putida* KTBx5 y salicílico para *P. putida* KTDntR. A continuación se midió la bioluminiscencia a 1, 2, 3, 4 horas y después de toda la noche tras la inducción, usando un espectrofotómetro Victor 2 II 1420 *Multilabel Counter* de Perkin Elmer.

10.2 Ensayos en medio sólido. Para estos ensayos se reestriaron colonias asiladas o se plaquearon 100 μ l de una dilución $1/10^8$ - $1/10^9$ de un cultivo a $OD_{600}=1$ de las cepas *P. putida* KTMoOx, *P. putida* KTDBT, *P. putida* KTBx, *P. putida* KTBx5 y *P. putida* KTDntR en placas de MM citrato. Se añadió el efector correspondiente y al día siguiente se registró la bioluminiscencia producida por las colonias usando el instrumento *VersaDoc Imaging System Model 4000* (Bio-Rad) y su software *Quantity One 4.5.1*.

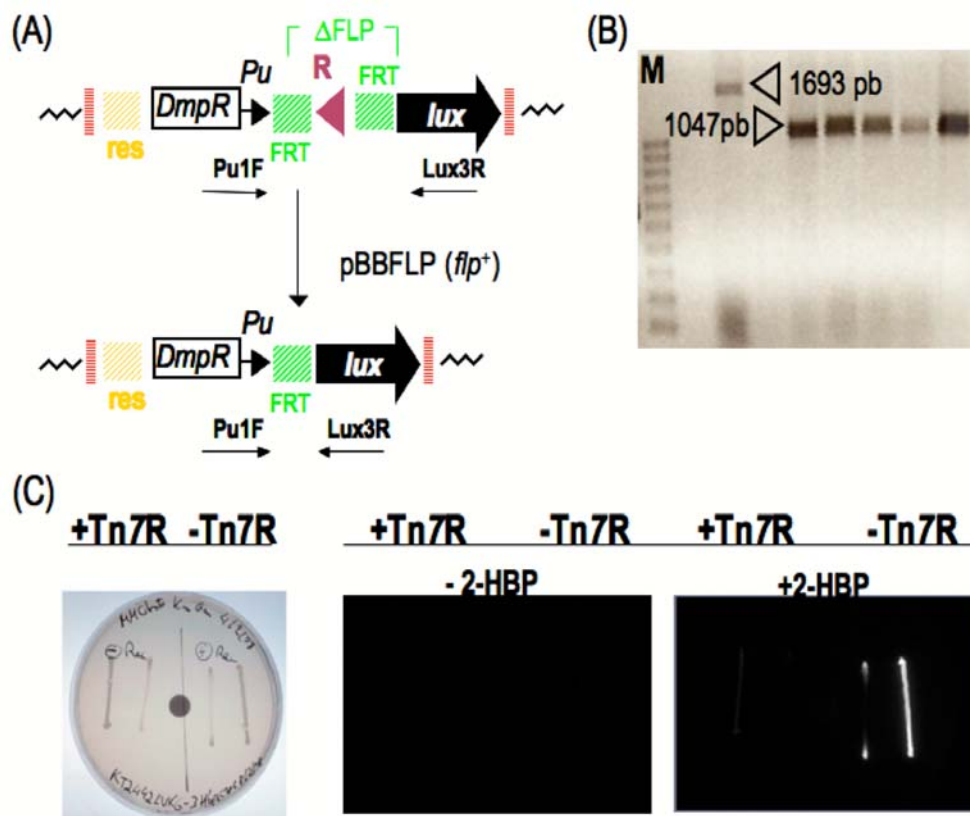


Fig. 14. Eliminación del extremo derecho del transposón Tn7 en cepas con fusión transcripcional *Pu-lux*. (A) Esquema de la eliminación de Tn7R por recombinación de las secuencias FRT mediada por la flipasa FLP del plásmido pBBFLP. (B) Productos de PCR con los oligonucleótidos Pu1F y Lux3R antes (banda de 1693 pb) y después (bandas 1047 pb) de la recombinación. M: Marcador de 100 pb. (C) Bioluminiscencia de la cepa *P. putida* KTDBT en presencia y ausencia de 2-HBP antes y después de la eliminación del Tn7R (figura modificada de las Heras *et al.*, 2008).

11. Ensayos de las cepas de *P. putida* para comprobar su capacidad como trampas genéticas.

11.1 Movilización de plásmidos como controles positivos y negativos de las trampas genéticas. Se prepararon células competentes de las cepas *P. putida* KTMoOx, *P. putida* KTDBT y *P. putida* KTBx5 y se transformaron con los siguientes plásmidos. pBBR1MCS-3 y pCAC6 para la trampa de monooxigenasas de anillo, pVLT31 y pESOX3 para la de biodesulfurización de DBT y pBBR1MCS-3 y pCAC8 para la de dehidroclorinación de lindano.

11.2 Registro de la Bioluminiscencia Específica en medio líquido. Un cultivo crecido durante la noche a 30 °C de las cepas anteriormente transformadas, fue diluido a una OD₆₀₀ de 0.15 en MM citrato Tc para las cepas *P. putida* KTMoOx (pBBR1MCS-3), *P. putida* KTMoOx (pCAC6), *P. putida* KTBx5 (pBBR1MCS3) y *P. putida* KTBx5 (pCAC8) y MM citrato Tc (5 µg/ml) e IPTG (0.5 mM) para las cepas *P. putida* KTDBT (pVLT31) y *P. putida* KTDBT (pESOX3). Cuando estos cultivos alcanzaron una OD₆₀₀ de 0.5-0.6 se les añadió el efector correspondiente y a las 4h y tras toda la noche desde la inducción, se registró la bioluminiscencia usando el espectrofotómetro Victor 2. Para este ensayo los efectores usados fueron. Benceno para las cepas *P. putida* KTMoOx (pBBR1MCS-3) y *P. putida* KTMoOx(pCAC6), DBT para *P. putida* KTDBT (pVLT31) y *P. putida* KTDBT (pESOX3) y γ-HCH para *P. putida* KTBx5 (pBBR1MCS3) y *P. putida* KTBx5 (pCAC8).

11.3 Registro de la bioluminiscencia en medio sólido. En este ensayo se reestriaron colonias aisladas o plaquearon 100 µl de una dilución 1/10⁸-1/10⁹ de un cultivo a OD₆₀₀=1 de las cepas descritas en el apartado anterior, en placas de MM citrato Tc para *P. putida* KTMoOx y *P. putida* KTBx5 y MM citrato Tc (5 µg/ml) e IPTG (0.5 mM) en el caso de *P. putida* KTDBT. Finalmente se añadió el inductor correspondiente y al día siguiente se registró la bioluminiscencia de las colonias crecidas con el VersaDoc. El tiempo de exposición para el registro de la bioluminiscencia varió desde 1s hasta 360s.

12. Cálculo de la eficacia de las trampas genéticas. La sensibilidad de las trampas genéticas descritas en este trabajo permite distinguir un posible clon positivo de entre

aproximadamente 100 negativos en una mera inspección visual. Sin embargo existen programas informáticos de tratamientos de imágenes que pueden aumentar considerablemente esta sensibilidad. La comprobación de este dato se llevó a cabo plaqueando las cepas *P. putida* KTMOx (pCAC6) y *P. putida* KTMOx (pBBR1MCS-3) en una misma placa en presencia de benceno. La forma de proceder fue partir de cultivos crecidos en MM citrato Tc de las cepas a $OD_{600}=0.7$ y mezclar en distintas proporciones una dilución $1/10^9$ de *P. putida* KTMOx (pCAC6) con otra de una dilución $1/10^8$ de *P. putida* KTMOx (pBBR1MCS-3). A continuación se plaqueó la mezcla en placas de MM citrato Tc con atmósfera saturante de benceno. Una vez crecidas las colonias se registró la luminiscencia y se observó que aquellas colonias que eran capaces de transformar benceno en fenol generaban más luz que las otras. Hay que indicar que todas las colonias de la placa brillaron en mayor o menor medida ya que por actividad de la ToMO el benceno es transformado en fenol de forma local y éste al difundir induce que las cepas *P. putida* KTMOx (pBBR1MCS-3) cercanas también emitan bioluminiscencia.

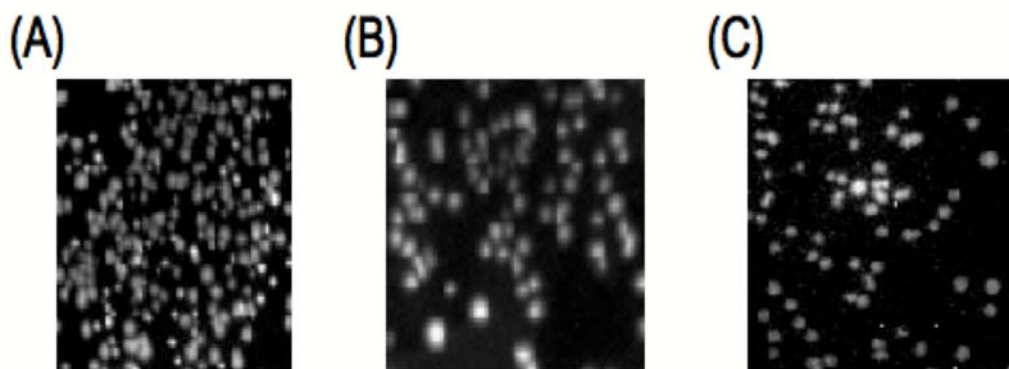


Fig. 15. Identificación de clones positivos usando la trampa genética para monooxigenasas de anillo. (A), (B) y (C) Mezclas de diluciones $1/10^9$ de *P. putida* KTMOx (pCAC6) y $1/10^8$ de *P. putida* KTMOx (pBBR1MCS-3) plaqueadas en presencia de benceno. Las colonias que más brillan corresponden a clones positivos.

13. Medición y cálculo de la Bioluminiscencia Específica. La luz emitida por todas las cepas se midió en placas de 96 pocillos (NUNC), añadiendo en cada pocillo 200 μ l de cultivo y haciendo la medida en un espectrofotómetro Victor 2 II 1420 *Multilabel Counter* de Perkin Elmer. Para el cálculo de la Bioluminiscencia Específica, la luminiscencia registrada se normalizó por la densidad óptica (OD_{600}) del cultivo en cada

medida y se expresó en unidades arbitrarias. Todos los datos corresponden a triplicados técnicos y biológicos.

14. Ensayos de actividad β -galactosidasa en la cepa *E. coli* CC118 *Pu-lacZ*. Para medir esta actividad enzimática en la cepa *E. coli* CC118 *Pu-lacZ*, un cultivo de la cepa crecido en LB durante la noche, se diluyó hasta OD₆₀₀ de 0.05 y se dejó crecer hasta OD₆₀₀ de 1. En este punto se expusieron las células a vapores saturantes de *m*-xileno y/o bromuro de bencilo, en distintas condiciones y proporciones y se incubaron las células durante 4h. Posteriormente los niveles de la β -galactosidasa en células permeabilizadas con cloroformo y dodecilsulfato sódico (SDS) se determinaron mediante el método simplificado de Miller (1972). Las condiciones de exposición de las células a los efectores que se detallan en las figuras se refieren a continuación. Cuando se indica Xil 100 % o Br[^]Ph 100 % se indujo con 50 μ l de Xil o Br[^]Ph respectivamente. En los casos que se indica Xil/Br[^]Ph 50% se usaron 50 μ l de una mezcla 1:1 de Xil y Br[^]Ph. Para los ensayos indicados como 1°Br[^]Ph/2°Xil y 1°Xil/2°Br[^]Ph se expusieron las células a 25 μ l de uno u otro efector durante 2 h para después añadir otros 25 μ l del efector correspondiente, completando las 4 horas de exposición total. Los datos corresponden a triplicados biológicos. En todos los casos se comprobó que la exposición a los efectores no afectó a la viabilidad de las células.

15. Ensayos de registro de Bioluminiscencia Específica en la cepa *P. putida* KTBx en presencia y ausencia de *m*-xileno y bromuro de bencilo en función del tiempo. Estos ensayos se realizaron creciendo la cepa *P. putida* KTBx en LB toda la noche, diluyendo el cultivo a OD₆₀₀ de 0.05, dejando crecer el cultivo hasta OD₆₀₀ de 1 y añadiendo los efectores en distintas proporciones. Las proporciones que se refieren en las gráficas mostradas en el apartado de Resultados se añaden de tal forma en el ensayo que el volumen final de efector o mezcla de efectores sea 50 μ l. Una vez añadido el efector se mide la bioluminiscencia a distintos tiempos y posteriormente se calcula la Bioluminiscencia Específica.

16. Cálculo de la velocidad de producción de Bioluminiscencia Específica de la cepa *P. putida* KTBx. En este ensayo se monitorizó a lo largo del tiempo la bioluminiscencia emitida por la cepa *P. putida* KTBx en distintas condiciones de

exposición al efector. En primer lugar se registró usando distintas presiones de vapor^b de *m*-xileno como se muestra en la Fig. 30A. A continuación se midió la bioluminiscencia usando una presión de vapor constante de Br[^]Ph junto a distintas de *m*-xileno como se ve en la Fig. 30B. Para el cálculo de la velocidad de producción de bioluminiscencia se calcularon las pendientes de las rectas de cada curva en la zona lineal. En el intervalo de tiempo 30'-60' sin Br[^]Ph (Fig. 30A) y para el intervalo 10'-30' con Br[^]Ph (Fig. 30B). De esta forma se obtuvieron las velocidades de producción de bioluminiscencia de *P. putida* KTBx para distintas presiones de vapor de *m*-xileno y se pudo representar sus inversos (Fig. 31).

17. Purificación de la proteína XylR-His. Para la purificación de esta proteína se acumularon 20 g (peso húmedo) de sedimento bacteriano de la cepa *E. coli* BL21(ED3) pLysS con el plásmido pcon1238, que expresaba la proteína XylR con una *cola de histidinas* en el extremo C-terminal. A tal efecto células competentes de esta cepa se transformaron con el plásmido pcon1238, se plaquearon en 28 placas petri de LB-Agar Ap y se crecieron a 30 °C. Al día siguiente se recogieron las células crecidas en las placas en un volumen de 40 ml de LB que se repartió en 2 matraces con 480 ml de LB atemperado a 30 °C cada uno. Las células se dejaron crecer a 30 °C hasta una OD₆₀₀ de 3.0, momento en el cuál se diluyeron a una OD₆₀₀ de 0.15-0.2 en un volumen de 12.2 l de LB. A continuación se crecieron a 19 °C hasta una OD₆₀₀ de 0.7-0.8, se indujeron los cultivos con 0.4 mM de IPTG y se dejaron crecer a 19 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 2. Llegados a ese punto se centrifugaron los cultivos y el sedimento (40 g) se congeló a -80 °C. Al día siguiente se descongelaron 20 g de células en hielo y se lisaron por sonicación. Seguidamente se separó por centrifugación la fracción insoluble de la soluble. Esta última se filtró por un filtro de 0.22 µm y se cargó en una columna con resina TALON *Superflow Resin Slurry* de Clontech. Posteriores lavados y eluidos de la resina con distintas concentraciones de imidazol permitieron purificar la proteína XylR-His en cantidad y pureza suficiente [8.47 µM/ 0.546 mg/ml]. Los distintos pasos de la purificación se comprobaron rutinariamente en geles de poliacrilamida.

^b Las presiones de vapor calculadas son valores relativos que dependen de la proporción en la mezcla de *m*-xileno o bromuro de bencilo y dibutilftalato. Aunque si que tienen un valor absoluto en términos operativos para los análisis que se muestran en Resultados.

18. Reacción de la proteína XylR-His con bromuro de bencilo. Para favorecer la reacción de la proteína con bromuro de bencilo se mezcló XylR-His pura a una concentración de 6.96 μ M y Br[^]Ph a 74 mM, en un tubo Eppendorf ajustando el volumen de la reacción a 20 μ l. El pH de la mezcla de reacción fue de 7.5 y para favorecer la reacción se mantuvo el tubo con agitación toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente el contenido del tubo se cargó en un gel de acrilamida y se cortó la banda correspondiente a XylR-His para su análisis por espectrometría de masas.

Tabla 7. Aminoácidos en XylR susceptibles de reaccionar con bromuro de bencilo e incremento de masa (Da) aportada por la modificación tras la reacción.

Aminoácido Susceptible de Reaccionar	Incremento de Masa (Da)
C	+90
W	+90
M	+90;+91
S	+90
T	+90
Y	+90
R	+90
H	+90
D	+91
E	+91
K	+90;+180;+271

Como se explicó en la Introducción estos aminoácidos presentan grupos nucleófilos, cuya reactividad viene conferida por átomos de azufre, oxígeno o nitrógeno o por la presencia de anillos tipo indol e imidazol en su estructura.

19. Identificación y secuencia de los péptidos marcados. La identificación y secuenciación de los péptidos marcados con bromuro de bencilo se hizo por análisis de espectrometría de masas. Estos análisis fueron realizados en el Servicio de Espectrometría de Masas de la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología. Para estos análisis la muestra fue digerida rutinariamente con tripsina y los péptidos separados por cromatografía líquida para su posterior análisis en [i] un espectrómetro ABi 4800 MALDI TOF/TOF (*Applied Biosystems*, Framingham, MA, USA) y [ii] un espectrómetro *Bruker HCT Ultra ion-trap mass spectrometer* (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Los espectros fueron analizados usando como

parámetros de búsqueda la carbamidometilación de cisteínas, la oxidación de metioninas y los incrementos de masas $\Delta 90$, $\Delta 91$, $\Delta 180$ y $\Delta 271$ Da productos de la bencilación.

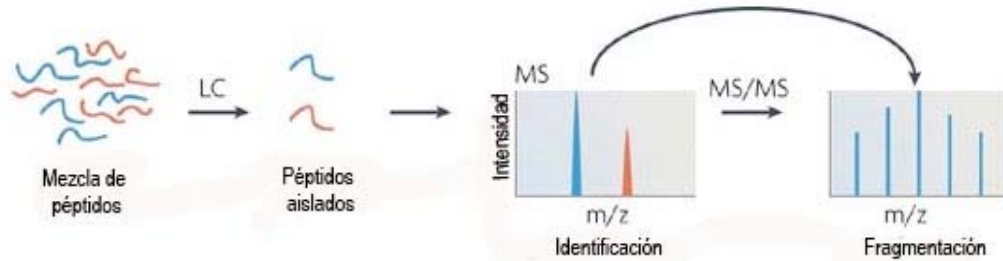


Fig. 16. Esquema del análisis por espectrometría de masas de los aminoácidos modificados por la reacción con bromuro de bencilo. La mezcla de péptidos de la proteína XylR-His una vez ha sido incubada con bromuro de bencilo presenta tanto péptidos modificados como sin modificar. Por cromatografía líquida y por un primer análisis de espectrometría de masas se pueden identificar los pares de péptidos sin marcar (azul) y marcados (rojo). En un segundo análisis los péptidos marcados son fragmentados y secuenciados determinando qué residuo específico ha incorporado la modificación.

RESULTADOS

1. Diseño y construcción de un sistema de dos transposones Tn5/Tn7 para la implantación de trampas genéticas en bacterias Gram-negativas.

Las características específicas de los transposones mini-Tn5 y mini-Tn7, así como las distintas aplicaciones que tienen en el campo de los biosensores, fueron la clave de la elección de estas herramientas para la construcción de las trampas genéticas. El sistema diseñado incorpora elementos de los plásmidos con orígenes de replicación R6K (Kolter, 1981) y de transferencia RP4 (Jacob y Grinter, 1975) así como componentes del sistema de recombinación del plásmido RK4 (Kristensen *et al.*, 1995) y de la flipasa FLP de levaduras (Martinez-Morales *et al.*, 1999). Todos estos elementos hicieron posible el diseño de un sistema modular para la implantación de circuitos genéticos en bacterias Gram-negativas. Este método implica la inserción secuencial de [i] los genes informadores y [ii] los reguladores transcripcionales y los promotores elegidos para cada trampa. Además requiere [iii] la eliminación de los marcadores de selección y [iv] la activación de la fusión transcripcional entre el promotor y el gen informador.

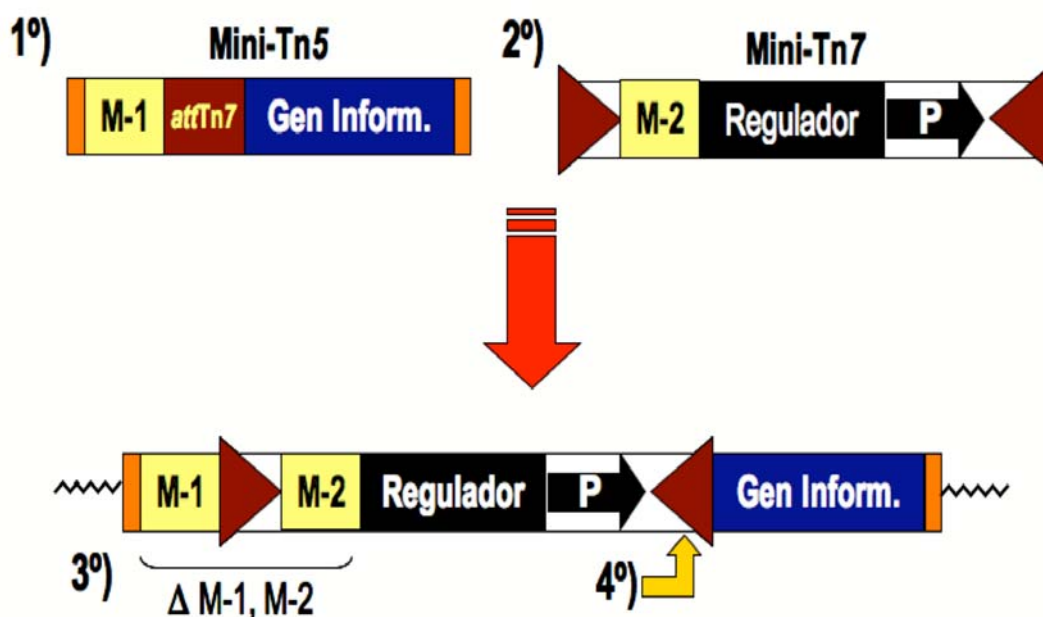


Fig. 17. Esquema del sistema de dos transposones Tn5/Tn7 para la implantación de trampas genéticas en bacterias Gram-negativas. 1º) Mini-Tn5 inserta los genes informadores en el cromosoma de la cepa receptora. 2º) Mini-Tn7 inserta los reguladores y los promotores en el sitio *attTn7* del mini-Tn5. 3º) Eliminación de los marcadores antibióticos. 4º) Activación de la fusión promotor-gen informador. M-1 y M-2: Genes de resistencia a antibióticos, P: Promotor y *attTn7* : Sitio de inserción del transposón Tn7.

1.1 Construcción de los vectores pTn5LacZ, pTn5LUX y pTn5GFP para la inserción de genes informadores mediante el transposón mini-Tn5. En el primer paso del proceso, se inserta en el cromosoma de la cepa receptora los genes informadores de la trampa genética mediante un transposón mini-Tn5. A tal efecto se construyeron un conjunto de vectores que incluyen: [i] una secuencia de recombinación *res*, [ii] el gen de resistencia a kanamicina, [iii] un sitio optimizado *attTn7* de inserción del transposón Tn7, [iv] una secuencia FRT y [v] un gen informador (*lacZ*, *lux* o *gfp*) sin promotor. Todas estas secuencias están incluidas dentro del transposón Tn5 y se denominaron Tn5LacZ, Tn5LUX y Tn5GFP (Fig. 12). Los vectores donadores de estos segmentos son derivados del vector pUT/mini-Tn5*res*L Km (de las Heras *et al.*, 2008) y se designaron como pTn5LacZ, pTn5Lux y pTn5GFP. Estos vectores suicidas con origen de transferencia RP4 y de replicación R6K sólo pueden proliferar en aquellas cepas que producen la proteína de replicación π (Kolter *et al.*, 1978).

1.2 Construcción del vector pCAC5 para la inserción de reguladores transcripcionales y promotores mediante el transposón mini-Tn7. El segundo paso en la implementación de una trampa genética en el *chasis* genómico de una bacteria Gram-negativa es la inserción de reguladores transcripcionales y promotores en el sitio *attTn7*. Para ello, se requiere el uso de un transposón Tn7 que lleve clonado el factor transcripcional y el promotor elegido para cada trampa genética. Con el fin de tener un vector único donde clonar estas proteínas reguladoras y sus promotores en el mini-Tn7 se construyó el vector pCAC5 (Fig. 11). Este plásmido contiene los genes *tnsABCD*, que codifican para la transposasa del transposón mini-Tn7, así como un origen de transferencia RP4 y de replicación R6K. También lleva un transposón mini-Tn7 que incluye : [i] un gen de resistencia a gentamicina, [ii] una secuencia *res*, [iii] un único sitio de restricción *NotI* para clonar los reguladores y los promotores y [iv] una secuencia FRT (Martinez-Morales *et al.*, 1999).

1.3 Eliminación de los marcadores de presión selectiva. En el diseño que se ha establecido para la construcción de trampas genéticas se han usados marcadores de genes de resistencia a antibióticos. El segmento Tn5, que se usa para la inserción de genes informadores, lleva un gen de resistencia a kanamicina mientras que el mini-Tn7, que incluye los reguladores transcripcionales utiliza uno de resistencia a gentamicina. Estos marcadores son útiles a la hora de seleccionar las inserciones en las cepas

bacterianas que se quieren usar como receptores de las trampas genéticas. Sin embargo la permanencia de estos marcadores en el cromosoma impide someter a tamizado a genotecas metagenómicas construidas en vectores con resistencia a kanamicina o a gentamicina. Tampoco es posible la liberación de estas cepas al ambiente para ser usadas como biosensores de los productos de las reacciones que se quieren detectar. Para evitar estas limitaciones, se decidió que los marcadores de presión selectiva quedasen flanqueados entre dos secuencias *res*, después de las inserciones de los transposones. Estas secuencias como ya se indicó, son las dianas específicas de la recombinasa codificada en el gen *parA* (Eberl, 1994; Kristensen *et al.*, 1995). De esta forma, la recombinasa ParA cataliza la recombinación de las secuencias *res* y permite la pérdida de los genes de resistencias a kanamicina y gentamicina (Fig. 18D).

1.4 Activación de la fusión transcripcional promotor/gen informador. Como se puede observar en el esquema general (Fig. 18) de la construcción de la trampa, el extremo derecho del transposón mini-Tn7 (Tn7R) queda flanqueado por las secuencias FRT, entre el promotor y el gen informador. Se sabe que el extremo derecho del mini-Tn7 actúa como un terminador fuerte de la transcripción (de las Heras *et al.*, 2008), evitando que la fusión transcripcional entre el promotor y el gen informador sea funcional. Para conseguir que esta fusión transcripcional pueda ser activa es necesario eliminar el Tn7R. La eliminación de este fragmento se consigue por recombinación de las secuencias FRT, que es catalizada por la flipasa FLP de levadura (Fig. 18D; Hoang *et al.*, 1998).

Este sistema basado en las inserciones secuenciales de los transposones mini-Tn5 y mini-Tn7, cuyo diseño se muestra en el esquema de la Fig. 18 ha demostrado ser versátil, eficaz y de fácil manejo. Así lo reflejan los distintos datos de validación del sistema que se muestran en los siguientes apartados de este capítulo. Estos resultados se refieren a aplicaciones en cepas de *P. putida* ya que se eligió esta bacteria como receptora de las trampas genéticas, debido a su robustez y versatilidad nutricional para usar distintas fuentes de carbono. Sin embargo, este método también ha resultado valido para la inserción de circuitos genéticos en cepas de *Escherichia coli* como se muestra en el Anexo I, lo que confirma su utilidad en bacterias Gram-negativas.

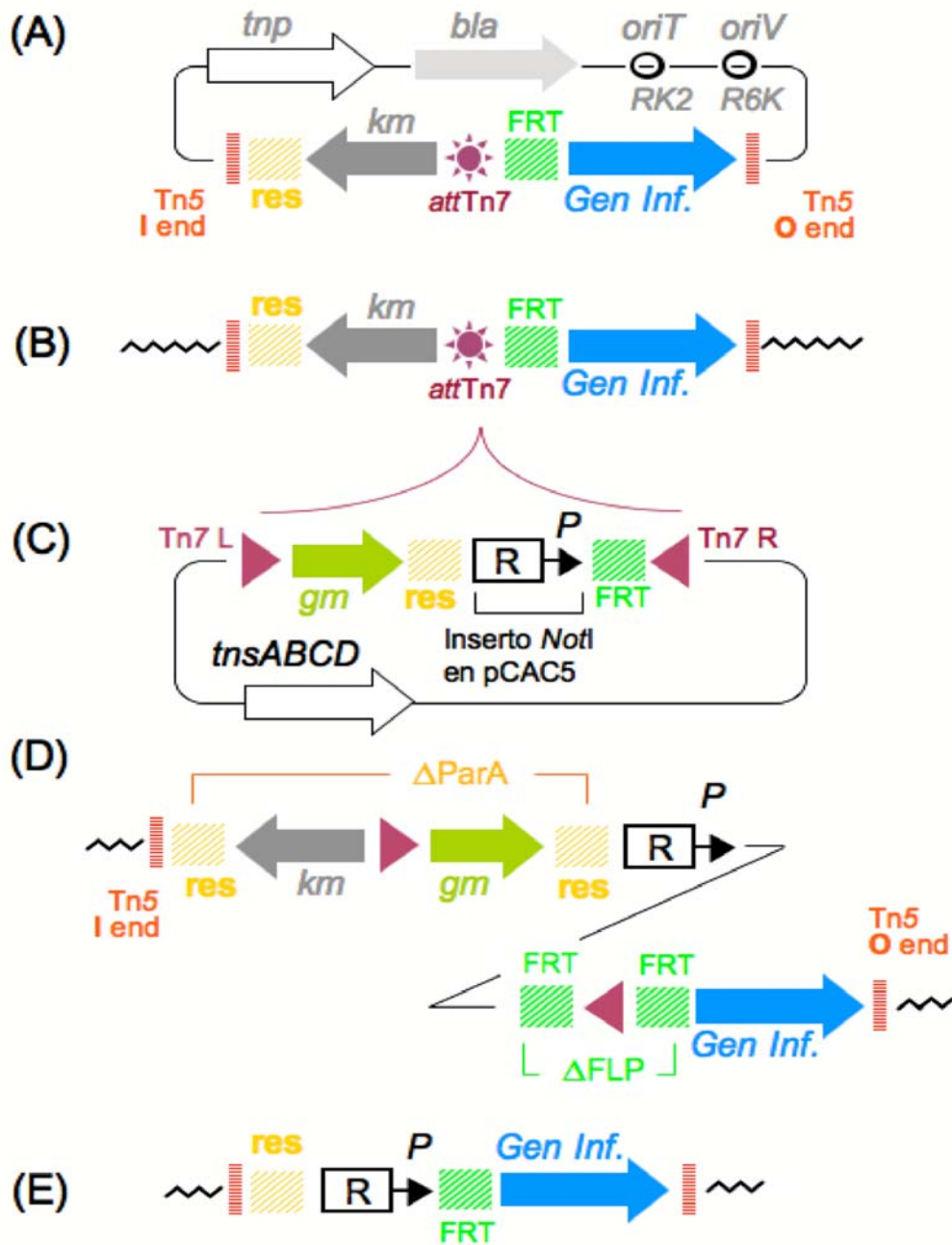


Fig. 18. Diseño de las herramientas genéticas para la implantación de trampas genéticas. (A) Mapa de los vectores pTn5LacZ, pTn5Lux y pTn5GFP (no a escala) con las secuencias *res*, *FRT*, *attTn7* y el gen informador sin promotor (*lacZ*, *lux* o *gfp* respectivamente). (B) Inserción de mini-Tn5 con gen informador en el cromosoma de la cepa receptora. (C) Mapa del vector suicida pCAC5 con regulador transcripcional y promotor como inserto *NotI*. (D) Esquema de la inserción cromosómica de mini-Tn5 y mini-Tn7 con el regulador transcripcional, el promotor y el gen informador. Los genes de resistencia a antibióticos Km y Gm quedan flanqueados por las secuencias de recombinación *res* mientras que el Tn7R queda localizado entre las secuencias de recombinación *FRT*. (E) Inserción cromosómica de la maquinaria genética que compone la trampa genética, sin marcadores antibióticos ni el extremo derecho del transposón Tn7. R: Regulador transcripcional y P: Promotor (figura modificada de las Heras *et al.*, 2008).

2. Trampa genética para la identificación de monooxigenasas de anillo.

Las enzimas monooxigenasas de algunas bacterias, son proteínas capaces de oxidar un amplio rango de compuestos hidrocarbonados como alcanos, alquenos o compuestos aromáticos (Merkx *et al.*, 2001; Leahy *et al.*, 2003). Existen cuatro familias de este tipo de monooxigenasas: [i] monooxigenasas de metano, [ii] monooxigenasas de tolueno, [iii] hidroxilasas de fenol y [iv] monooxigenasas de α β alquenos. Se sabe que las bacterias que tienen alguna de estas proteínas son capaces de usar hidrocarburos muy específicos como su principal fuente de carbono y energía (Sazinsky *et al.*, 2004). Esta especificidad de sustrato hace que las bacterias con estas enzimas sean capaces de bioremediar sustancias tóxicas como el tricloroetileno o vertidos de petróleo (Chauhan *et al.*, 1998; Sullivan *et al.*, 1998). Estas características especiales hace que se las considere determinantes en la biodegradación de contaminantes ambientales xenobióticos. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas monooxigenasas tiene cierto interés en el campo de la bioremediación. En general, dada la gran variedad de contaminantes ambientales con estructura aromática (tolueno, xilenos, benceno, fenol, catecoles, cresoles, naftaleno, estireno etc.) nos interesó buscar algún tipo de monooxigenasas de anillo aromático. Esta actividad suele formar parte de los primeros pasos de las rutas de biodegradación de este tipo de compuestos. En particular pareció interesante buscar alguna oxigenasa capaz de mono-hidroxilar un anillo aromático tan contaminante, persistente y poco reactivo como el benceno. Con esta premisa se comenzó a construir una trampa genética que fuese capaz de poner de manifiesto la transformación de benceno en fenol, mediada por un segmento de ADN de cualquier origen. Una vez establecido que la trampa que se quería construir debía de ser sensible sólo a presencia de fenol y no a la de benceno se procedió a su construcción. Para ello en primer lugar se buscó un regulador transcripcional que se activase sólo con la presencia de fenol en el medio y no con la presencia de benceno. El regulador transcripcional elegido fue DmpR de *Pseudomonas* sp. CF600.

2.1 El regulador transcripcional DmpR. El operón *dmp* del plásmido pVI150 de *Pseudomonas* sp. CF600 codifica para las enzimas que confieren a esta cepa la capacidad de usar fenol, cresol o 3,4-dimetilfenol como únicas fuentes de carbono y energía (Shingler *et al.*, 1989). La transcripción de este operón está positivamente

Resultados

regulada por el regulador transcripcional DmpR, que activa la expresión de los genes involucrados en el catabolismo de fenol y metilfenoles sólo cuando estos sustratos están en el medio (Shingler *et al.*, 1993). El regulador DmpR es un miembro de la familia NtrC y al igual que XylR presenta una organización modular característica de los factores transcripcionales dependientes del factor sigma 54 (North, 1993) que se activan por contacto directo con el efector. Esta activación desencadena la activación del promotor *Po* que regula la ruta *dmp* del plásmido pVI150 de *Pseudomonas* sp. CF600 en el caso de DmpR y del promotor *Pu* que regula la ruta superior (*upper*) del plásmido pWW0 de *Pseudomona putida* mt2, en el caso de XylR. Se ha demostrado que aunque las secuencias de los promotores *Po* y *Pu* son diferentes, la similitud de la ARN polimerasa de ambas cepas y de los motivos de unión a ADN de ambos reguladores es tan alta que se puede dar una regulación cruzada entre los dos reguladores y ambos promotores (Fernandez *et al.*, 1994). Esta característica de DmpR y del promotor *Pu*, los convirtieron en candidatos para ser usados en la construcción de la trampa genética para la búsqueda de monooxigenasas de anillo.

2.2 Construcción de la trampa genética para monooxigenasas de anillo en la cepa *P. putida* KT2440. En primer lugar se insertó el gen informador *lux* en el cromosoma de la cepa de *P. putida* KT2440, usando el plásmido pTn5Lux como vector del segmento Tn5LUX. Esta primera transposición generó un conjunto de inserciones diferentes en el cromosoma de la cepa receptora. Se eligió una inserción determinada para continuar con la construcción de la trampa y la cepa resultante se denominó *P. putida* KT0LUX. En segundo lugar se implantó el regulador transcripcional DmpR y el promotor *Pu* en el sitio de inserción *att*Tn7, por medio del plásmido pCAC5DmpR. A continuación se eliminaron los genes de resistencia a los antibióticos kanamicina y gentamicina y se eliminó el extremo derecho del transposón mini-Tn7. La cepa resultante se denominó *P. putida* KTMoOx.

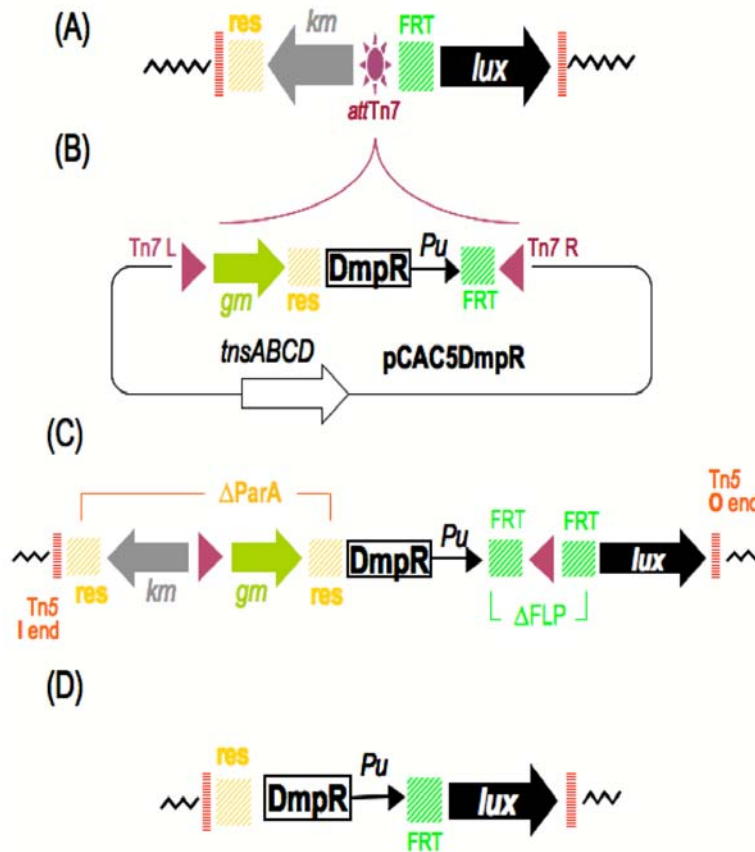


Fig. 19. Construcción de la cepa *P. putida* KTMOx. (A) Inserción cromosómica del segmento Tn5LUX. (B) Mapa (no a escala) del plásmido pCAC5DmpR. (C) Implantación del regulador DmpR y el promotor *Pu* aguas arriba del gen *lux* en el sitio *attTn7*. (D) Maquinaria genética de la trampa para monooxigenasas de anillo en la cepa *P. putida* KTMOx, tras la eliminación de los genes de Km^r y Gm^r y del Tn7R (figura modificada de las Heras *et al.*, 2008).

2.3 Validación de la cepa *P. putida* KTMOx como biosensor de fenol. El procedimiento descrito en el apartado anterior dio lugar a una cepa, con toda la maquinaria genética necesaria para actuar como trampa genética para monooxigenasas de benceno. Para validar esta construcción se comprobó en primer lugar si *P. putida* KTMOx era capaz de hacer saltar la trampa con presencia de fenol en el medio. A tal efecto se hicieron varios experimentos de registro de Bioluminiscencia Específica de la cepa *P. putida* KTMOx, cuando ésta se crecía en presencia y ausencia de fenol, tanto en medio líquido como en placa Petri.

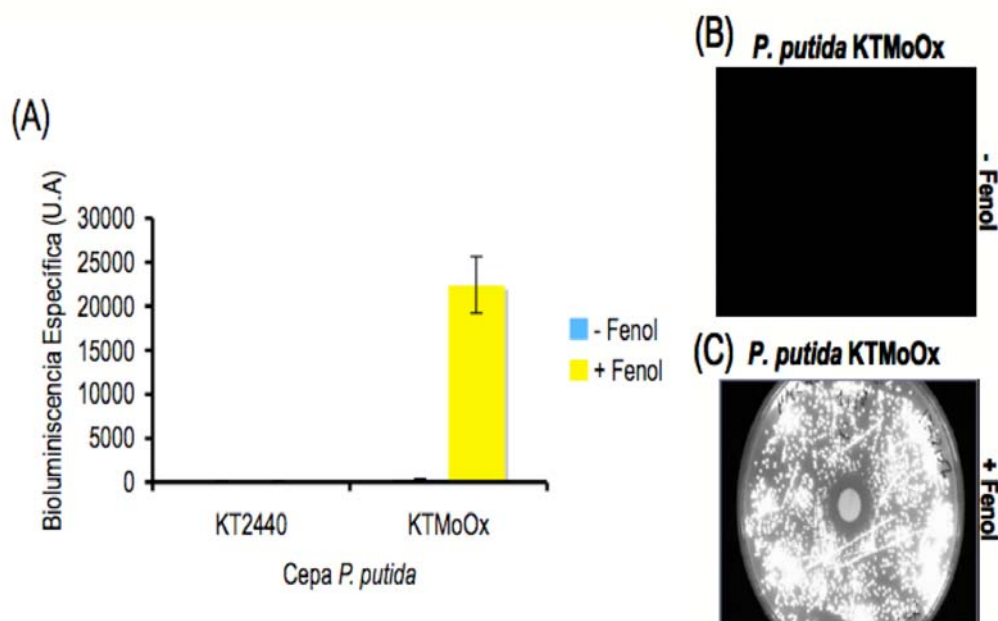


Fig. 20. Validación de la cepa *P. putida* KTMOx como biosensor de fenol. (A) Bioluminiscencia Específica de las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* KTMOx en medio líquido en presencia y ausencia de fenol. Bioluminiscencia emitida por la cepa *P. putida* KTMOx en ausencia (B) y presencia (C) de fenol en medio sólido. En este último caso el fenol se dispone en el centro de la placa impregnado en un disco de papel.

Estos datos confirmaron que la cepa *P. putida* KTMOx puede ser usada como biosensor de fenol.

2.4 Validación de la cepa *P. putida* KTMOx como trampa genética para monooxigenasas de anillo. Una vez que la cepa *P. putida* KTMOx se validó como biosensor de fenol, se procedió a comprobar si la trampa genética podía ser funcional al expresar una monooxigenasa de anillo, que transformara benceno en fenol. Para ello se usó como control la Tolueno/*o*-xileno monooxigenasa (ToMO) de *Pseudomonas stutzeri* OX1 (Bertoni *et al.*, 1996). Esta enzima es una monooxigenasa de 4 subunidades que oxida arenos, alquenos y haloalcanos (Sazinsky *et al.*, 2004). Se trata de una proteína caracterizada como monooxigenasa de tolueno y *o*-xileno aunque también oxida otros compuestos aromáticos como benceno, etilbenceno, estireno y naftaleno. El producto de oxidación al que da lugar la ToMO al usar benceno como sustrato es fenol, lo que nos permitió usarla como control positivo del correcto funcionamiento de la trampa genética. A tal efecto se ensayó si la cepa *P. putida* KTMOx (pCAC6) que expresa la ToMO, era capaz de transformar benceno en fenol y

emitir bioluminiscencia. La idea era comprobar si la trampa era capaz de traducir una transformación química en un fenotipo artificial como es la generación de bioluminiscencia. Estos ensayos se realizaron tanto en medio líquido como en placa .

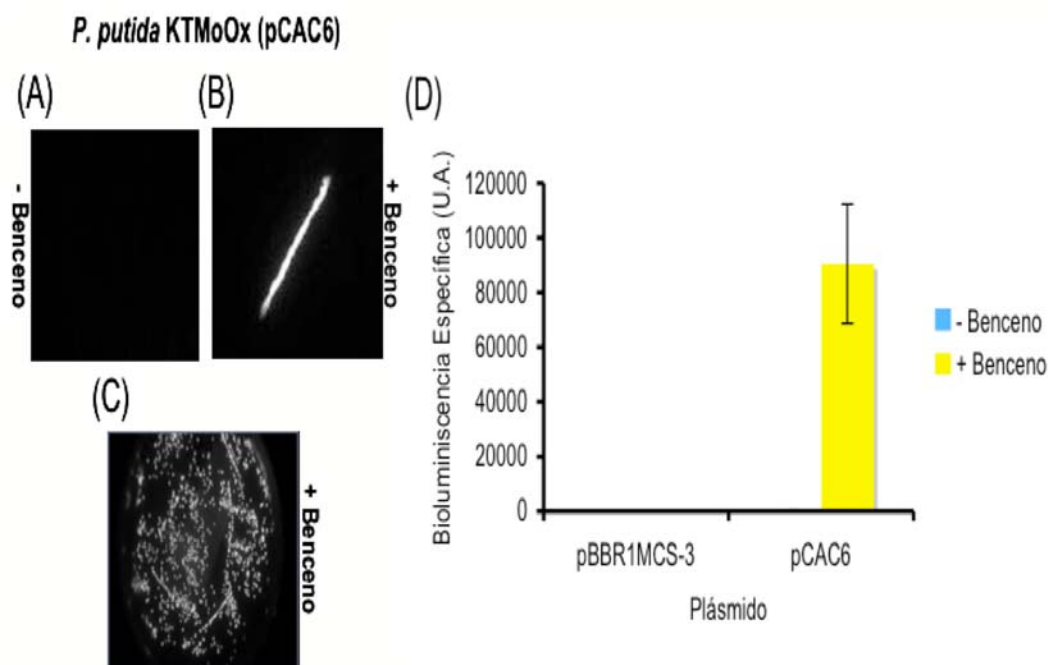


Fig. 21. Validación de la cepa *P. putida* KTMoOx como trampa genética para monooxigenasas de anillo. Bioluminiscencia en placa de la cepa *P. putida* KTMoOx (pCAC6) en ausencia (A) y presencia (B) y (C) de benceno. (D) Bioluminiscencia Específica de las cepas *P. putida* KTMoOx (pBBR1MCS-3) y *P. putida* KTMoOx (pCAC6) en medio líquido en presencia y ausencia de benceno. Sólo la cepa que expresa la ToMO es capaz de emitir bioluminiscencia.

Estos resultados validaron a la cepa *P. putida* KTMoOx como trampa genética para la identificación de actividades monooxigenasas de anillo en genotecas metagenómicas. Además también se decidió usar la cepa *P. putida* KTOLUX, anteriormente descrita, para construir el resto de trampas genéticas.

3. Trampa genética para la identificación de actividades de biodesulfurización de dibenzotiofeno.

El dibenzotiofeno (DBT), es una molécula orgánica que consta de dos anillos aromáticos fusionados por un anillo tiofeno que forma parte de los crudos de petróleo. El DBT tiene un alto contenido en azufre que es proporcionado por distintos tipos de

Resultados

moléculas sulfuradas. Estas moléculas se pueden agrupar en distintos grupos: [i] tioles alifáticos y aromáticos y sus productos de oxidación (disulfuros); [ii] tioéteres alifáticos, aromáticos y mezclas de ambos y [iii] heterociclos derivados del tiofeno (Oldfield *et al.*, 1998). De todas estas moléculas es el dibenzotiofeno y sus derivados alquilados los que representan el mayor contenido de azufre en la destilación del gasoil (Gray *et al.*, 2003). La emisión al aire de productos derivados de la destilación del crudo de petróleo y concretamente los óxidos de azufre, son los responsables en gran medida de un problema ambiental como la lluvia ácida. Por tanto no es de extrañar que se hayan generado muchos esfuerzos para eliminar el azufre contenido en el crudo de petróleo antes de su fraccionamiento (McFarland, 1999; Monticello, 2000). Uno de los hitos en la búsqueda de un mecanismo de eliminación de azufre, de moléculas heterocíclicas como el DBT, fue el descubrimiento de que la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 era capaz de desulfurizar el dibenzotiofeno transformándolo en 2-hidroxibifenilo (2-HBP; Oldfield *et al.*, 1998). En este proceso el azufre eliminado del DBT era asimilado por la bacteria y el contenido en carbono, que es lo que determina la capacidad calorífica del sustrato, permanecía intacto (Gray *et al.*, 2003). La capacidad de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, para biodesulfurizar dibenzotiofeno fue lo que motivó la creación de una trampa genética para la búsqueda de nuevas actividades relacionadas con la desulfurización de DBT. Para la construcción de esta trampa se buscó un regulador transcripcional cuya molécula efectora fuera 2-HBP. El factor transcripcional elegido fue una variante del regulador HbpR de *Pseudomonas azelaica* HBP1, denominado HbpRCBP6.

3.1 Los reguladores transcripcionales HbpR y HbpRCBP6. La degradación de 2-hidroxibifenilo y 2,2'-dihidroxibifenilo en *Pseudomonas azelaica* HBP1 está regulada por el gen *hbpR*. Este gen codifica para un regulador transcripcional de la familia NtrC llamado HbpR que tiene una alta homología con los reguladores transcripcionales XylR y DmpR de esta familia. Se ha descrito que HbpR en presencia de uno de sus efectores como 2-HBP, activa la transcripción desde el promotor *Pc* que está hacia arriba de los genes de degradación de 2-HBP, denominados *hbpC* (Jaspers *et al.*, 2000). Recientemente el grupo del Profesor Van der Meer ha generado la variante HbpRCBP6 del factor transcripcional HbpR, mediante la introducción de mutaciones en el dominio de unión a 2-HBP. Este dominio al igual que en los reguladores XylR y DmpR se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína HbpR. Las mutaciones I101V y D128N dieron lugar a la variante HbpRCBP6 (Beggah, 2008). Éste fue aislado de una

librería de mutantes por presentar una afinidad por el efector 2-HBP, 20 veces más alta que el regulador silvestre HbpR. Estas propiedades convirtieron al regulador HbpRCBP6 en candidato idóneo para ser usado en la construcción de una trampa genética para la búsqueda de actividades de biodesulfurización de dibenzotiofeno.

3.2 Construcción de la trampa genética para actividades de biodesulfurización de dibenzotiofeno en la cepa *P. putida* KT0LUX. Para la construcción de esta trampa se construyeron los vectores pCAC5HbpR y pCAC5HbpRCBP6 con los reguladores transcripcionales silvestre HbpR y mutante HbpRCBP6 y el promotor *Pc* respectivamente. Dada la mayor sensibilidad de HbpRCBP6 por 2-HBP respecto de HbpR se decidió insertar este regulador transcripcional mutante y no el silvestre y su promotor *Pc*, en el sitio de inserción *attTn7* de la cepa *P. putida* KT0LUX. Esta inserción se hizo a través del plásmido pCAC5HbpRCBP6 y continuando con el proceso de construcción de la trampa se eliminaron los genes de resistencia a kanamicina y gentamicina y se eliminó el Tn7R. La cepa resultante se denominó *P. putida* KTDBT.

3.3 Validación de la cepa *P. putida* KTDBT como biosensor de 2-hidroxibifenilo. La comprobación de que la cepa *P. putida* KTDBT podía actuar como biosensor de 2-HBP se hizo registrando la bioluminiscencia de esta cepa en presencia y ausencia de efector tanto en medio líquido como en sólido.

3.4 Validación de la cepa *P. putida* KTDBT como trampa genética para la identificación de actividades de biodesulfurización de dibenzotiofeno. Con el fin de confirmar que la cepa *P. putida* KTDBT podía ser usada como trampa genética se comprobó si ésta era capaz de emitir luminiscencia al expresar una actividad que transformase DBT en 2-HBP. A tal efecto se decidió usar como control los genes *dszC*, *dszA* y *dszB* de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Estos genes forman parte de la ruta de desulfurización de DBT: [i] *DszC* es una DBT monooxigenasa, [ii] *DszA* es una DBT-sulfona monooxigenasa y [iii] *DszB* es una 2-(2-hidroxifenil) bencenosulfonato desulfonasa. Estas proteínas catalizan la transformación de DBT a 2-HBP en *Pseudomonas* (Gallardo *et al.*, 1997) y fueron elegidas para servir de control positivo de la cepa *P. putida* KTDBT (pESOX3) como trampa genética.

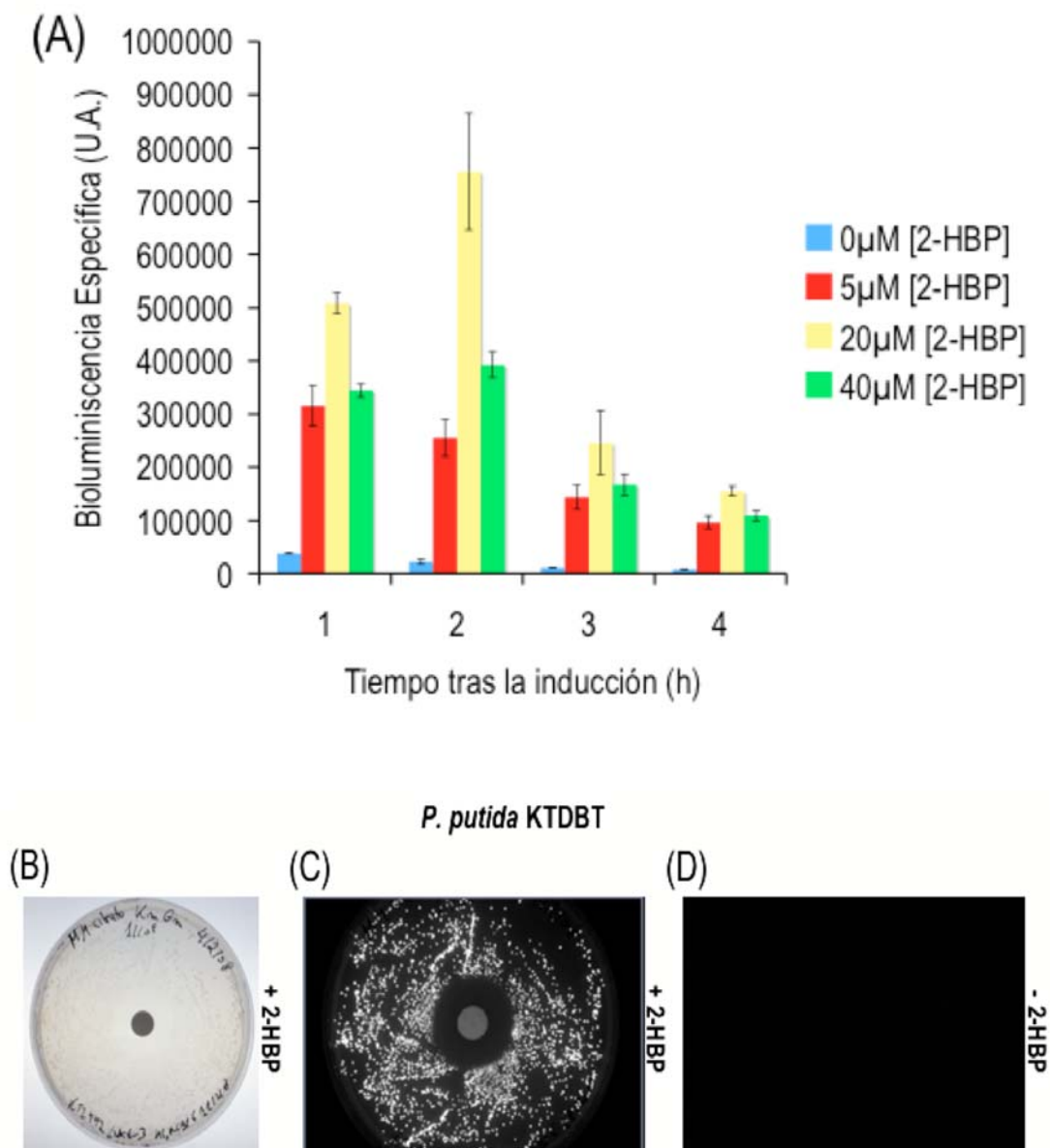


Fig. 22. Validación de la cepa *P. putida* KTDBT como biosensor de 2-HBP. (A) Bioluminiscencia Específica de la cepa *P. putida* KTDBT, frente a distintas concentraciones de 2-HBP en medio líquido. (B) Aspecto de la placa con *P. putida* KTDBT y 2-HBP antes de registrar la bioluminiscencia. (C) y (D) Bioluminiscencia de la cepa *P. putida* KTDBT en medio sólido en presencia y ausencia de 2-HBP respectivamente. El 2-HBP se dispone impregnado en un papel en el centro de la placa (B) y (C).

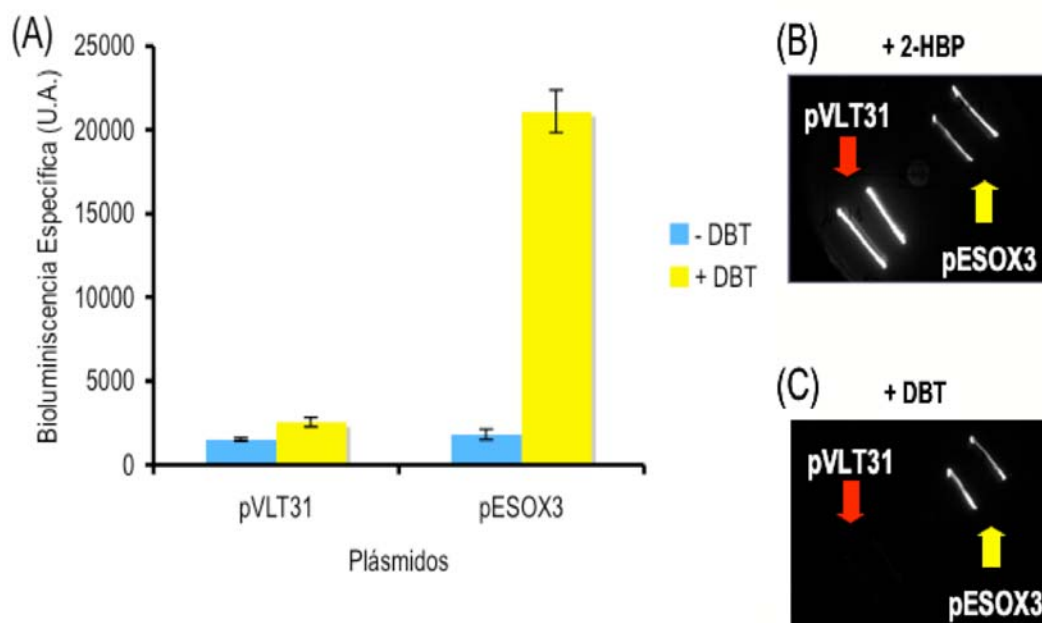


Fig. 23. Validación de la cepa *P. putida* KTDBT como trampa genética para la identificación de actividades de biodesulfurización de DBT. (A) Bioluminiscencia Específica en medio líquido de las cepas *P. putida* KTDBT (pVLT31) y *P. putida* KTDBT (pESOX3) en ausencia y presencia de DBT. Bioluminiscencia de estas mismas cepas en medio sólido en presencia de 2-HBP (B) y DBT (C).

4. Trampa genética para la identificación de actividades de dehidroclorinación de lindano.

El lindano (1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano, HCH) es un compuesto cíclico alifático organoclorado que ha sido usado ampliamente como insecticida en agricultura y en el tratamiento contra piojos y sarna. El lindano tiene varios isómeros de entre los cuales destaca el gamma (γ -HCH), por ser el más usado como componente en insecticidas utilizados en plantaciones. Sin embargo debido a su persistencia en el ambiente así como por sus efectos tóxicos en el sistema nervioso, hígado y riñones su uso ha sido prohibido. Por este motivo la descontaminación de suelos con lindano se ha convertido en un objetivo más en el campo de la bioremediación.

Existe en la naturaleza una bacteria capaz de comenzar la biodegradación de lindano conocida como *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (Nagata *et al.*, 1999). Esta degradación comienza con un primer paso catalizado por LinA (Imai *et al.*, 1991), que quita dos átomos de cloro de la molécula de lindano mientras que un tercero, se elimina de forma espontánea en forma de ácido clorhídrico. El producto de esta transformación

Resultados

es la molécula cloroaromática 1,2,4-triclorobenceno (1,2,4-TCB) y un descenso en el pH del medio como consecuencia de la generación de ácido (Phillips *et al.*, 2001). Esta información ha servido para construir una trampa genética capaz de responder a la presencia de 1,2,4-TCB en el medio, como resultado de la dehidroclorinación de lindano. La construcción de esta trampa se basa en el trabajo realizado por Mohn *et al.* (2006) en *E. coli*, en la que reacciones de dehidroclorinación de lindano se traducían en actividades β -galactosidasas usando una estrategia similar a la que se describe en esta Tesis Doctoral.

4.1 El regulador transcripcional XylR5. Para construir esta trampa genética se tuvo que elegir una proteína reguladora, capaz de interaccionar con el producto de la reacción que se quiere detectar (1,2,4-TCB) y no con el sustrato de dicha reacción (γ -HCH). En una búsqueda bibliográfica no se pudo encontrar ningún factor transcripcional que de forma natural respondiese a 1,2,4-TCB. Sin embargo si se encontró una variante artificialmente producida de XylR del sistema TOL de *Pseudomonas putida* mt-2 que respondía a esta molécula. Esta variante denominada XylR5 se identificó de una librería de mutantes construida mediante la técnica de barajeo de ADN, barajando las secuencias de los dominios A de XylR, DmpR y TbuT (Garmendia *et al.*, 2001). La selección de XylR5 se hizo buscando aquellas variantes capaces de responder a la presencia de 1,2,4-TCB que activaban el promotor *Pu*.

4.2 Construcción de una trampa genética para la identificación de actividades de dehidroclorinación de lindano en la cepa de *P. putida* KT0LUX. En la construcción de esta trampa se partió de la cepa previamente descrita *P. putida* KT0LUX, en la cuál se insertó en el sitio *attTn7* el regulador XylR5 con el promotor *Pu* usando el vector pCAC5Bx5Pu. Posteriormente y siguiendo la misma línea que en la construcción de las otras dos trampas, se eliminaron las resistencias de kanamicina y gentamicina y el extremo derecho del transposón. La cepa así construida se denominó *P. putida* KTBx5.

4.3 Validación de la cepa *P. putida* KTBx5 como biosensor de 1,2,4-TCB. Esta validación se hizo registrando la bioluminiscencia de la cepa *P. putida* KTBx5, en presencia y ausencia de 1,2,4-TCB. Los resultados de estos experimentos confirmaron que la trampa genética sólo se activaba en presencia del efector.

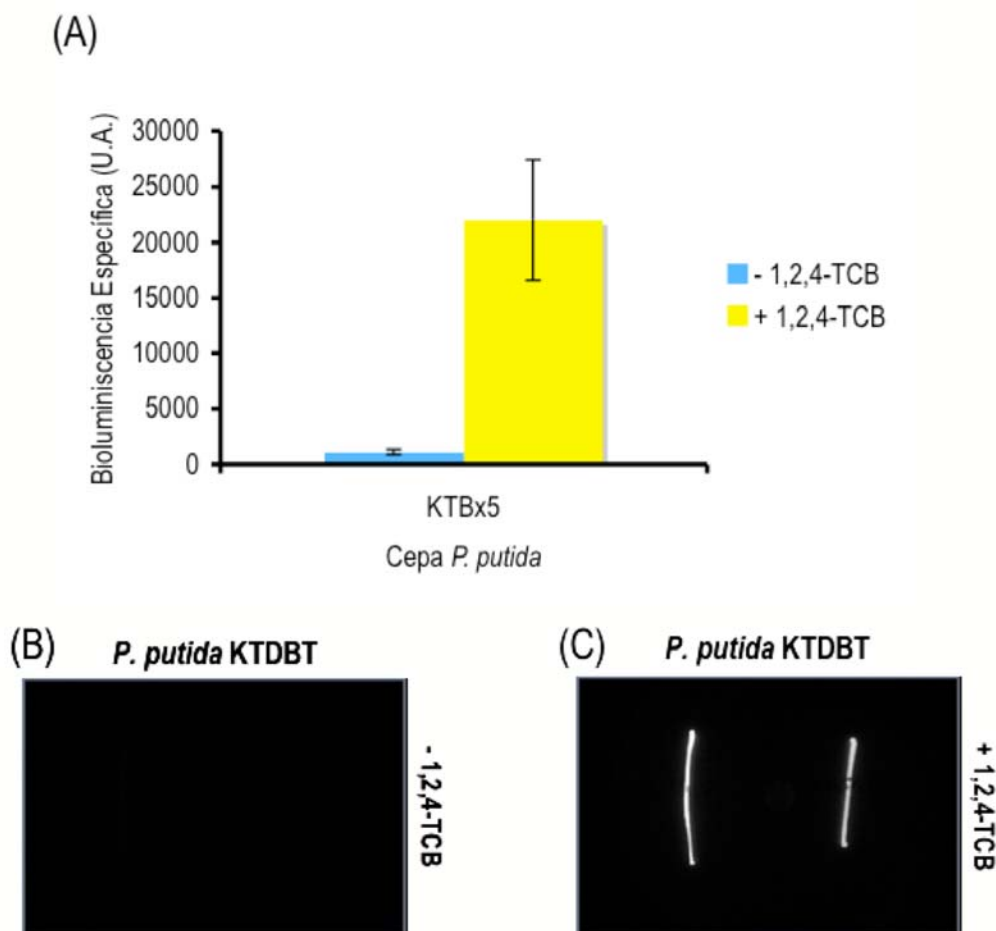


Fig. 24. Validación de la cepa *P. putida* KTBx5 como biosensor de 1,2,4-TCB. (A) Bioluminiscencia Específica en medio líquido de la cepa *P. putida* KTBx5 en presencia y ausencia de 1,2,4-TCB. (B) y (C) bioluminiscencia de esta cepa en medio sólido con y sin efector.

4.4 Validación de la cepa *P. putida* KTBx5 como trampa genética para la identificación de actividades de dehidroclorinación de γ -HCH. Para confirmar que esta cepa podía servir de trampa genética, se usó el gen *linA* como control positivo del correcto funcionamiento de la trampa. A tal efecto se registró la bioluminiscencia de *P. putida* (pCAC8) y se comprobó que en presencia de lindano la cepa era capaz de transformarlo en 1,2,4-TCB y emitir luminiscencia.

Estos resultados confirmaron que la cepa *P. putida* KTBx5 puede ser usada como trampa genética para identificar actividades de dehidroclorinación de lindano en genotecas metagenómicas.

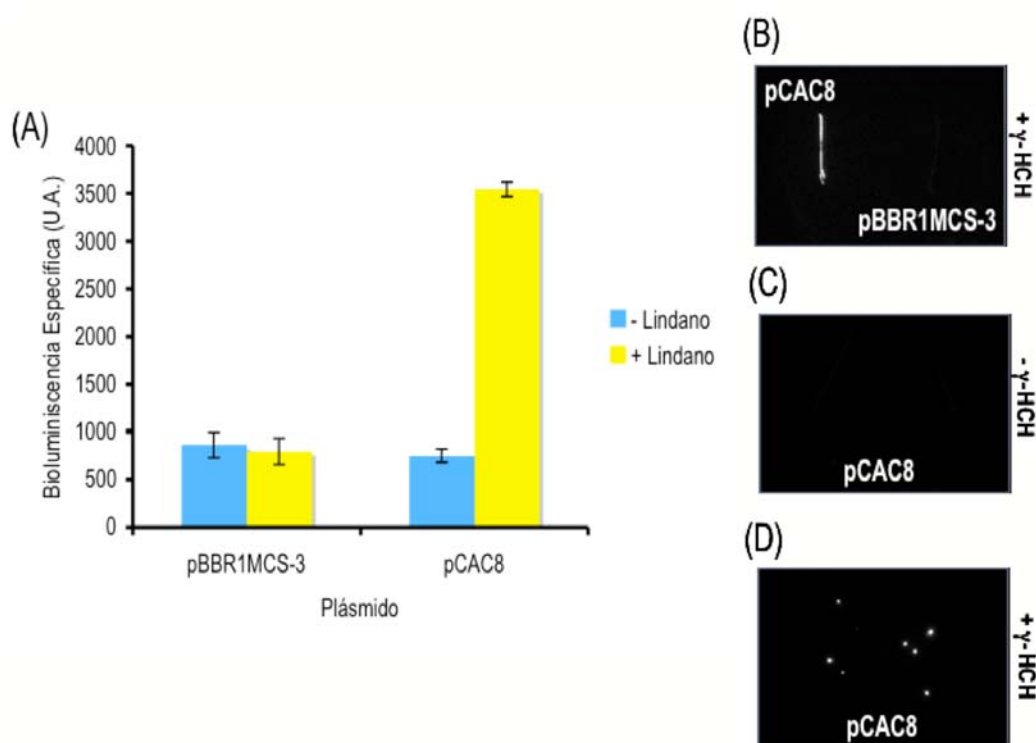


Fig. 25. Validación de la cepa *P. putida* KTBx5 como trampa genética para la identificación de actividades de dehidroclorinación de γ -HCH. (A) Bioluminiscencia Específica de las cepas *P. putida* KTBx5 (pBBR1MCS-3) y *P. putida* KTBx5 (pCAC8) en ausencia y presencia de lindano. (B), (C) y (D) Registro de la bioluminiscencia de estas cepas en medio sólido. La cepa *P. putida* KTBx5 (pCAC8) emite luz tanto como colonias reestriadas (B) como individuales (D).

5. Biosensores para la detección de salicilato como intermedio en las rutas de degradación de antraceno y naftaleno.

Como se ha descrito con anterioridad existen distintos tipos de especies bacterianas capaces de biodegradar compuestos xenobióticos hasta su mineralización. Estas rutas de biodegradación, pueden llegar a ser muy complejas y comprenden distintas etapas que implican un gran número de enzimas (www.genome.jp/kegg/pathway.html). En los ejemplos anteriores se ha descrito la construcción de cepas bacterianas para la identificación de proteínas implicadas en las primeras etapas de las rutas de biotransformación de benceno, DBT o lindano. Sin embargo, en el caso que nos ocupa, el objetivo fue conseguir un biosensor de salicilato, que es un intermedio en la ruta de degradación de antraceno y naftaleno, de forma que se pueda usar como indicador de

posibles actividades implicadas en la biotransformación de estos compuestos. El naftaleno y el antraceno son hidrocarburos poliaromáticos policíclicos, constituidos por dos y tres anillos bencénicos respectivamente. Son compuestos ampliamente distribuidos en el ambiente y debido a su baja solubilidad en agua son persistentes y recalitrantes. Su aparición en el ambiente se debe fundamentalmente a actividades humanas relacionadas con la industria del petróleo y productos derivados como gasolinas, alquitrán o asfalto y a la combustión incompleta de materiales orgánicos como basura o carbón. No obstante existe una amplia variedad de microorganismos capaces de oxidar antraceno y naftaleno para su biodegradación que incluyen bacterias como *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp. o *Rhodococcus* sp. y hongos como *Glicocladium* sp. o *Ramaria* sp. (Cerniglia, 1992). La ruta de degradación de antraceno y naftaleno ha sido ampliamente estudiada y se conocen con exactitud cada una de los intermedios catabólicos y etapas que llevan a la completa mineralización de estos compuestos (www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00626.html).

5.1 El regulador transcripcional DntR. Con el objetivo de construir un biosensor capaz de detectar salicilato se usó el regulador transcripcional DntR y su promotor P_{DntR} . Éstos fueron identificados en la ruta de degradación de 2,4-dinitrotolueno de *Burkholderia* sp. DNT (Johnson *et al.*, 2002). DntR pertenece a la familia de reguladores tipo LysR implicados en la regulación de genes de rutas metabólicas (Maddocks y Oyston, 2008). Estos reguladores suelen constar de entre 300 a 350 aminoácidos y su dominio N-terminal es el responsable de la unión a ADN mientras que en el dominio central es donde tiene lugar la interacción con el efector. En el caso de DntR el efector es salicilato de tal forma que cuando DntR interacciona con esta molécula el regulador activa la transcripción desde el promotor P_{DntR} .

5.2 Construcción de un biosensor de salicilato en la cepa de *P. putida* KT0LUX. Para la construcción de este biosensor se insertó en el sitio *attTn7* de la cepa *P. putida* KT0LUX, el regulador transcripcional DntR y su promotor P_{DntR} usando el vector pCAC5DntR. A continuación se eliminaron las resistencias a kanamicina y gentamicina así como el extremo Tn7R, para hacer funcional la fusión transcripcional entre P_{DntR} y el gen informador *lux*. La cepa así generada se designó como *P. putida* KTDntR.

Resultados

5.3 Validación de la cepa *P. putida* KTDntR como biosensor de salicilato. La

validación de *P. putida* KTDntR como biosensor de salicilato se hizo registrando la bioluminiscencia emitida por la cepa en ausencia y presencia de salicilato. Los ensayos se hicieron tanto en medio sólido como líquido.

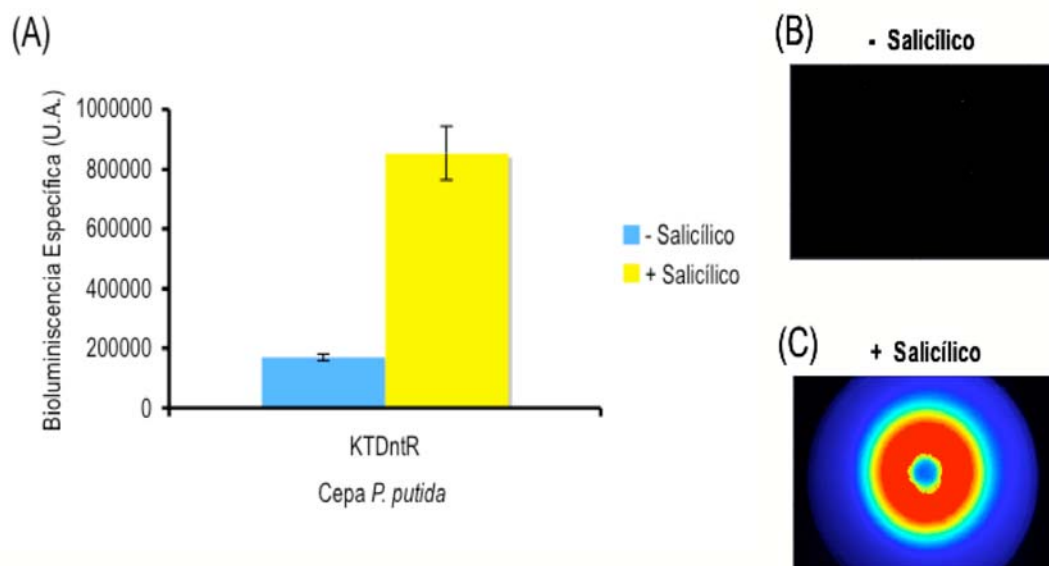


Fig. 26. Validación de la cepa *P. putida* KTDntR como biosensor de ácido salicílico. Bioluminiscencia Específica de la cepa *P. putida* KTDntR en presencia y ausencia de ácido salicílico en medio líquido (A) y medio sólido (B) y (C); (figura modificada de las Heras et al., 2008). La bioluminiscencia de la cepa en (C) ha sido procesada digitalmente asignando el color rojo al máximo de luminiscencia y el azul al mínimo. En este ejemplo el inductor se pone en el centro de la placa con un disco de papel.

Estos resultados sugieren el uso de la cepa *P. putida* KTDntR como receptora de una genoteca metagenómica para la búsqueda de actividades relacionadas con la degradación de naftaleno y antraceno o cualquier otra actividad enzimática que como producto de la misma genere salicilato.

6. Entrecruzamiento químico de la proteína XylR y bromuro de bencilo.

6.1 Evidencias *in vivo* de la interacción entre bromuro de bencilo y la proteína

XylR. La molécula de bromuro de bencilo, como se indicó en la introducción, fue elegida como molécula funcionalizada análoga a los efectores naturales de XylR para llevar a cabo ensayos de entrecruzamiento químico. Con la elección de esta molécula se intentaba comprobar si la proteína XylR interactuaba de alguna forma con análogos

funcionalizados de sus efectores nativos. Como se describe a continuación, a tal efecto se usaron distintas construcciones que expresaban XylR y se comprobó la actividad de esta proteína en presencia de *m*-xileno y bromuro de bencilo sobre distintas fusiones *Pu-lacZ* y *Pu-lux*.

6.1.1 Ensayos de actividad β -galactosidasa con XylR. La comprobación de que existe una interacción entre XylR y Br^{Ph} se hizo ensayando la actividad β -galactosidasa de la cepa de *E. coli* CC118 *Pu-lacZ* cuando expresaba XylR. Ésta se expresó en su forma nativa desde el plásmido pCON916. En primer lugar se comprobó que en las condiciones de ensayo la proteína XylR silvestre era activa en presencia de *m*-xileno (Fig. 27A). A continuación se ensayó la actividad β -galactosidasa en presencia y ausencia de Br^{Ph} y se observó que no se registraba ninguna actividad (Fig. 27B). Las hipótesis que se barajaron para explicar este fenómeno fueron que el bromuro de bencilo: [i] inactivaba la β -galactosidasa o [ii] interaccionaba con la proteína XylR de tal forma que ésta no era capaz de activar la fusión *Pu-lacZ*. Para comprobar la primera hipótesis se volvieron a hacer ensayos β -gales usando también la cepa de *E. coli* MC4100 [MAD2], con la proteína XylR Δ A y una fusión transcripcional *Pu-lacZ* en el cromosoma. La proteína XylR Δ A al carecer del dominio A es siempre activa en presencia y ausencia de inductor, por lo tanto el registro de actividad β -galactosidasa en esta cepa en presencia de bromuro de bencilo indicaría que esta enzima no se inhibe por Br^{Ph}. La confirmación de este resultado parecía indicar que el bromuro de bencilo no afectaba a la actividad de la β -galactosidasa y que por lo tanto probablemente interaccionase con XylR (Fig. 27B).

Estos resultados ponen de manifiesto que la proteína XylR silvestre se activa por interacción con *m*-xileno y pierde su actividad por interacción con bromuro de bencilo. Con el objetivo de obtener más información respecto al tipo de interacción se quiso ensayar si la interacción entre XylR y el bromuro de bencilo podía tener lugar en el dominio A de XylR, como se podía inferir de los resultados de la actividad β -galactosidasa de la cepa *E. coli* MC4100 [MAD2]. Para ello se hicieron ensayos β -gales en la cepa de *E. coli* CC118 *Pu-lacZ* con XylR silvestre en distintas condiciones de exposición a *m*-xileno y bromuro de bencilo, con el fin de comprobar si existía cierta competición de ambas moléculas por el mismo sitio de interacción de XylR (Fig. 28).

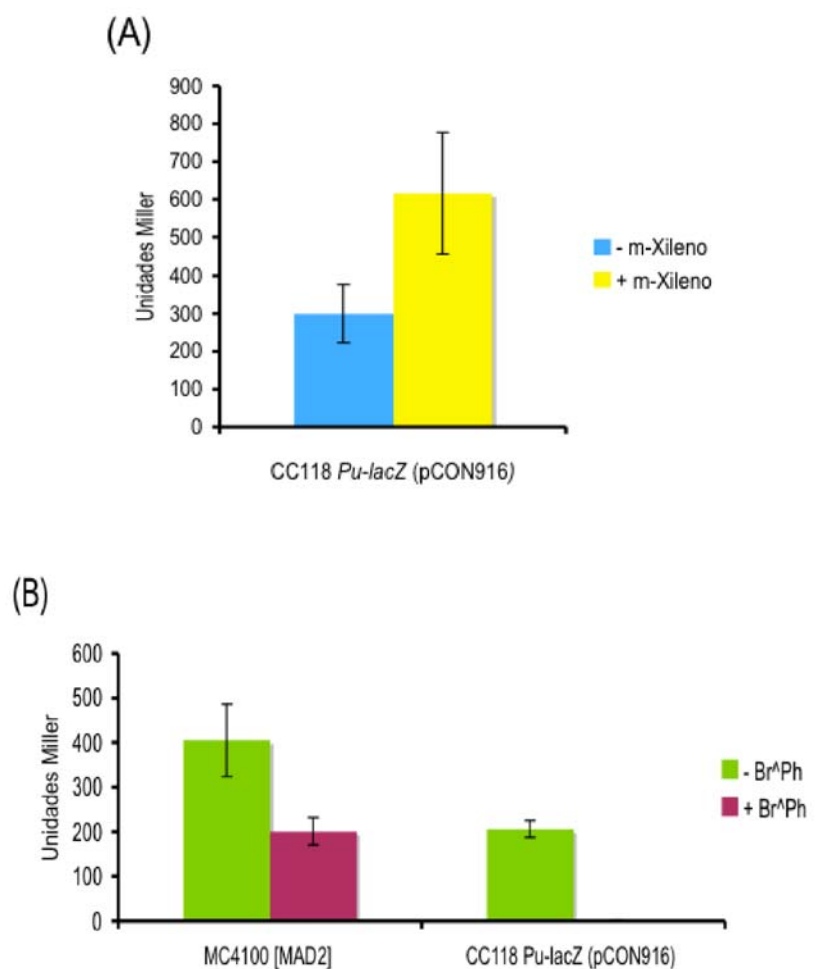


Fig. 27. Evidencias *in vivo* de la interacción de XylR con *m*-xileno y bromuro de bencilo. (A) Actividad β -galactosidasa de *E. coli* CC118 *Pu-lacZ* (pCON916) con XylR silvestre frente a *m*-xileno. (B) Actividad β -galactosidasa de las cepas de *E. coli* MC4100 [MAD2] con XylR Δ A y *E. coli* CC118 *Pu-lacZ* (pCON916) frente a bromuro de bencilo.

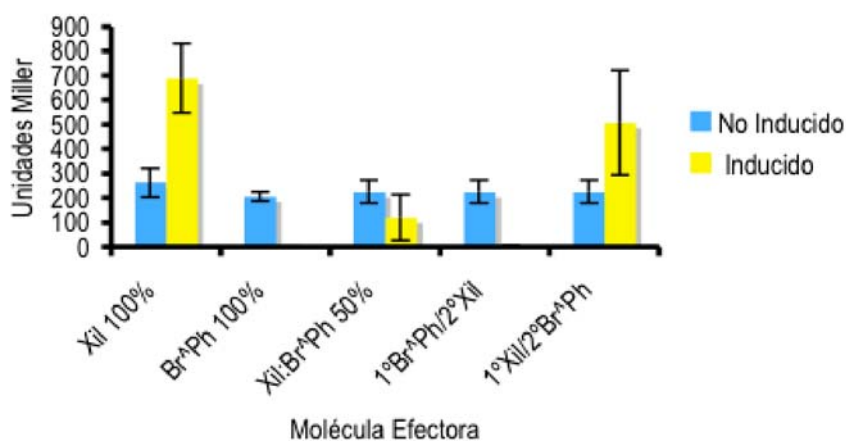


Fig. 28. Actividad β -galactosidasa de las cepas *E. coli* CC118 *Pu-lacZ* (pCON916) en distintas condiciones de exposición a *m*-xileno y Br[^]Ph. Ver condiciones en el apartado 14 de Materiales y Métodos.

Los resultados demostraron que parece existir una competición entre ambas moléculas por el sitio de unión de XylR. Cuando la proteína se expone a *m*-xileno es capaz de activar la transcripción desde *Pu*, sin embargo en presencia de Br[^]Ph es incapaz. Son interesantes los casos en los que la proteína se expone primero a Br[^]Ph y después a *m*-xileno y viceversa. En éstos cuando la proteína se expone primero al supuesto inhibidor se inactiva y su actividad no se recupera mientras que al exponerse primero al inductor se activa y su actividad no se pierde. Es importante recalcar que la adición de estos compuestos en los ensayos no afectó al crecimiento de las células. Con el fin de demostrar que efectivamente existe una interacción entre la proteína y Br[^]Ph se procedió a hacer ensayos de entrecruzamiento químico *in vitro*. Por este motivo se decidió usar para este tipo de estudios la proteína XylR-His, tal y como se describe en los párrafos siguientes.

6.1.2 Ensayos de actividad β -galactosidasa con la proteína XylR-His. A efectos de poder tener una evidencia *in vitro* de la interacción de XylR con el bromuro de bencilo se decidió usar una construcción de la proteína XylR con una *cola de histidinas* (XylR-His) en el extremo C-terminal. La idea fue tener una versión de XylR purificada para hacer distintos tipos de análisis estructurales con los efectores (microcalorimetría, dicroísmo circular, ultracentrifugación o entrecruzamiento químico). Sin embargo antes de llevar a cabo ningún ensayo *in vitro* se realizaron ensayos *in vivo* para comprobar que la proteína XylR-His era funcional y se comportaba igual que XylR silvestre frente a *m*-xileno y Br[^]Ph. Estos experimentos, similares a los descritos en el apartado anterior consistieron en [i] ensayar la actividad β -galactosidasa de la cepa *E.coli* CC118 *Pu-lacZ* expresando XylR silvestre (pCON916) y XylR-His (pcon1238) en presencia de *m*-xileno y [ii] ensayar esta misma actividad en distintas condiciones de exposición a *m*-xileno y bromuro de bencilo (Fig. 29).

A la vista de los resultados podemos concluir que la proteína XylR-His interacciona con *m*-xileno y bromuro de bencilo de la misma forma que XylR silvestre. Si bien la actividad absoluta de la proteína XylR-His fue siempre menor que la de la silvestre quizá porque la *cola de histidinas* afecta a la unión con el ADN. Estos resultados fundamentaron la purificación de la construcción XylR-His y así confirmar los datos *in vivo* mediante ensayos *in vitro*.

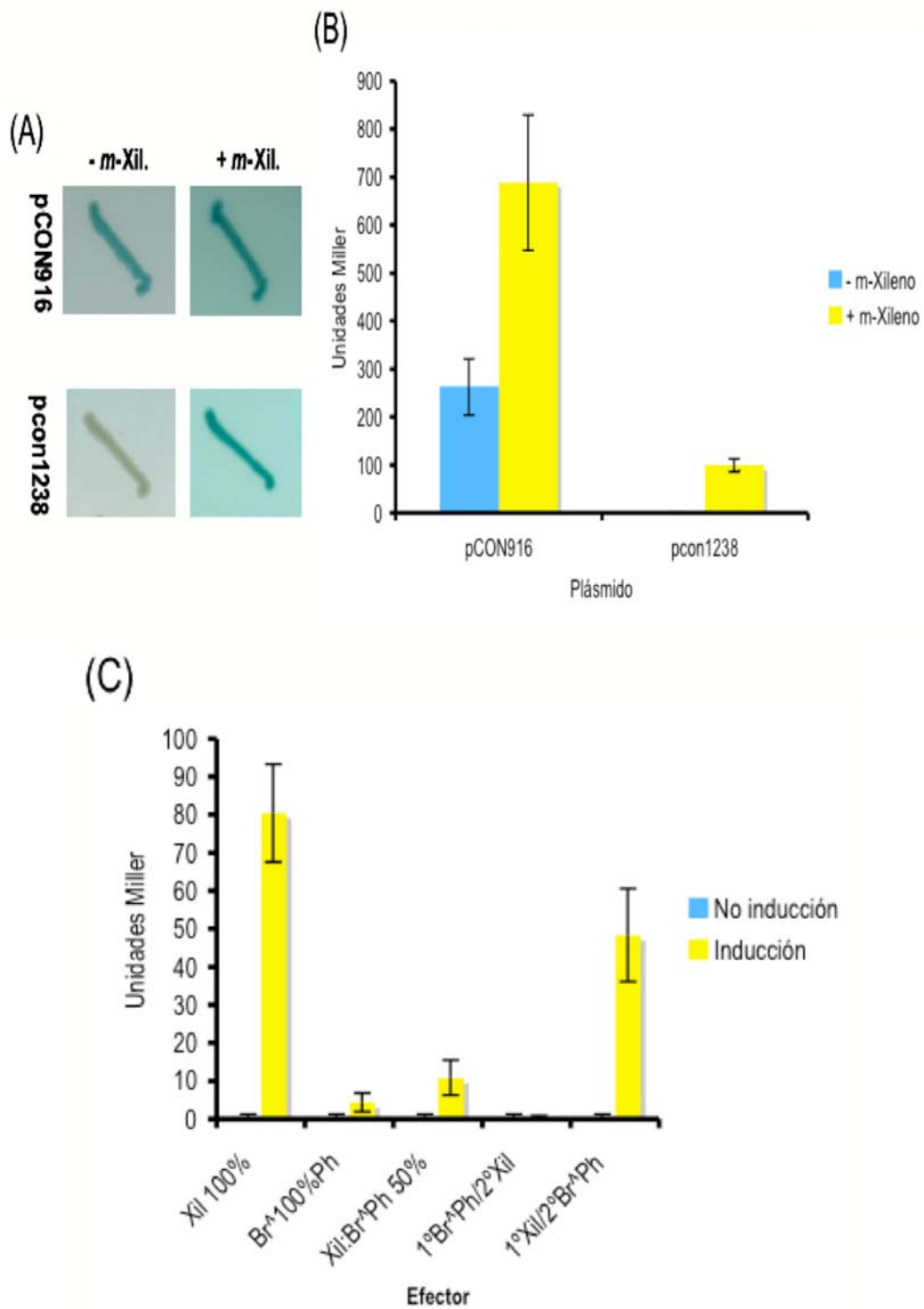


Fig. 29. Evidencias *in vivo* de la interacción de XylR y XylR-His con *m*-xileno y bromuro de bencilo. Actividad β-galactosidasa en la cepa *E.coli* CC118 *Pu-lacZ* frente a *m*-xileno (A) en placa y (B) en cultivo. (C) Actividad β-gal. de la cepa *E. coli* CC118 *Pu-lacZ* (pcon1238) en distintas condiciones de exposición a *m*-xileno y Br⁺Ph. Ver apartado 14 de Materiales y Métodos.

6.1.3 Ensayos de registro de Bioluminiscencia Específica en la cepa *P. putida* KTBx en presencia y ausencia de *m*-xileno y bromuro de bencilo. Los resultados de los apartados 6.1.1 y 6.1.2 demostraron que mientras el *m*-xileno interacciona con XylR activándola parece que el bromuro de bencilo la inactiva. En términos operativos se puede asumir que el *m*-xileno es un sustrato de XylR mientras que el bromuro de bencilo es un inhibidor. Con el fin de comprobar la relación de inhibición sustrato/inhibidor entre *m*-xileno y Br^{Ph} se llevaron a cabo ensayos de registro de bioluminiscencia de la cepa *P. putida* KTBx en función del tiempo en presencia de estos efectores. La idea era comprobar como afectaba la interacción de los efectores con XylR a la actividad de la fusión *Pu-lux*.

En un primer lugar se comprobó que el *m*-xileno activaba la proteína XylR registrando la Bioluminiscencia Específica de la cepa *P. putida* KTBx a distintas presiones de vapor de *m*-xileno en el tiempo (Fig. 30A). Por otro lado se comprobó que a una presión constante de Br^{Ph}, la producción de bioluminiscencia era menor que sin este compuesto (Fig. 30B).

A la luz de estos resultados se consideró interesante calcular las velocidades de producción de bioluminiscencia de la cepa *P. putida* KTBx a distintas presiones de vapor de *m*-xileno en ausencia y presencia constante de bromuro de bencilo. Con el fin de determinar, por medio de ecuaciones de cinética de reacción, si la relación de inhibición entre *m*-xileno y bromuro de bencilo era competitiva o acompetitiva. Esto es, si ambos compuestos interaccionan con XylR en el mismo sitio o no. A tal efecto se hizo la representación gráfica del inverso de las velocidades de producción de bioluminiscencia frente al inverso de la presión de vapor de *m*-xileno, usando los datos obtenidos de la Fig. 30. El resultado fue una gráfica que se ajustaba al tipo de una cinética para el caso de un sustrato y un inhibidor que compiten por el mismo sitio de unión a la proteína.

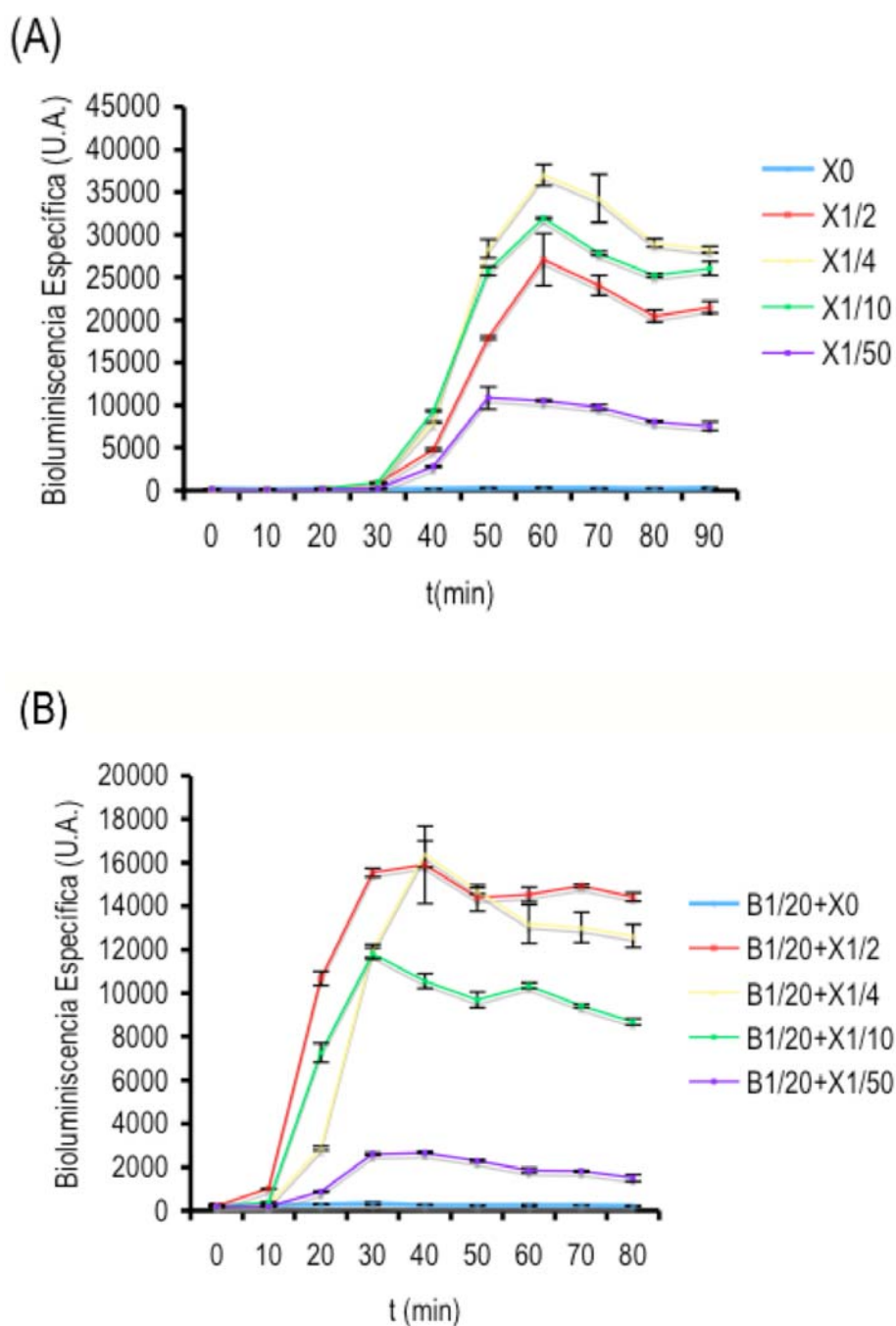


Fig. 30. Registro de la producción de Bioluminiscencia Específica de la cepa *P. putida* KTBx en función del tiempo. (A) A distintas presiones de vapor de *m*-xileno. (B) A distintas presiones de vapor de *m*-xileno, con Br^{Ph} constante. En estas gráficas X= *m*-xileno y B= Br^{Ph}. La fracción que aparece al lado de cada letra indica la proporción de cada reactivo en un volumen final de 50 µl en dibutilftalato, que se usa en el experimento.

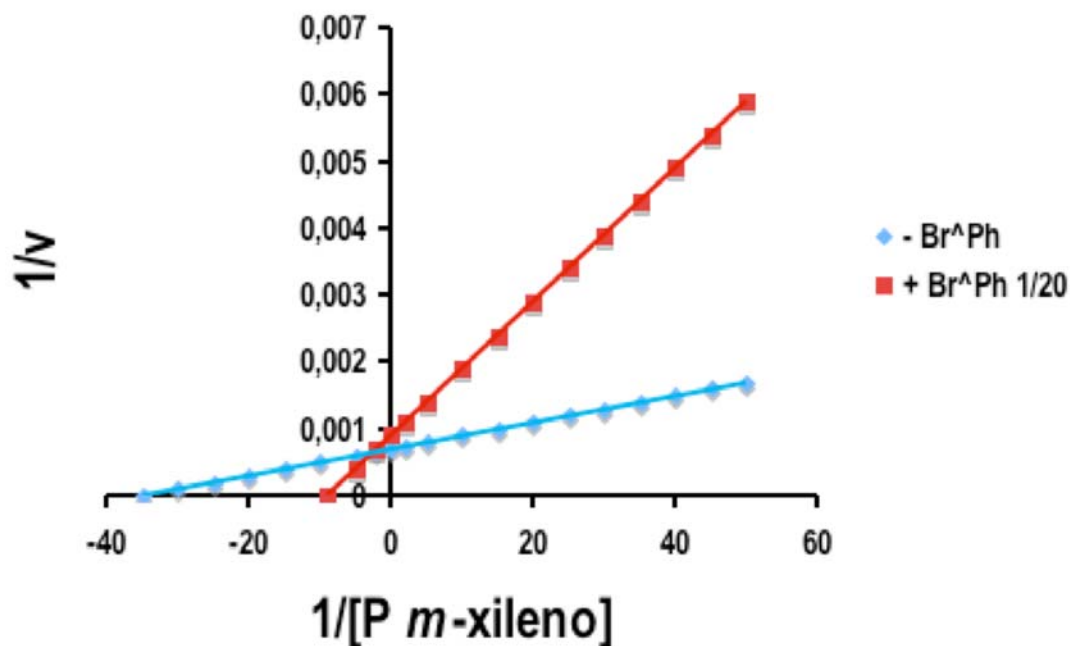


Fig. 31 . Determinación de la relación de competitividad o incompetividad entre *m*-xileno y bromuro de bencilo. Gráfica de dobles inversos para la velocidad de producción de bioluminiscencia en la cepa *P. putida* KTBx con y sin bromuro de bencilo. El cálculo de la velocidad de producción de bioluminiscencia en función del tiempo se detalla en el apartado 16 de Materiales y Métodos.

Los resultados de estos ensayos de cinética de la activación de la transcripción del promotor *Pu* en distintas presiones de vapor de sustrato e inhibidor sugieren que la inhibición de XylR por Br^{Ph} es competitiva respecto a *m*-xileno, es decir ambas moléculas compiten por el mismo sitio de unión a XylR. Debe de notarse que los términos sustrato, inhibidor, velocidad de reacción e inhibición competitiva son aquí usados de forma operativa pues no se trata de un caso riguroso de cinética enzimática. Esto se debe a que estrictamente XylR no es una enzima, el *m*-xileno no es un sustrato ni el bromuro de bencilo un inhibidor. Además el registro de la bioluminiscencia en función del tiempo no se ajusta a la definición rigurosa de velocidad de una reacción. Sin embargo asumiendo estas limitaciones, los distintos datos indican que *m*-xileno y bromuro de bencilo compiten por la misma zona de XylR.

6.2 Evidencia *in vitro* de la interacción de la proteína XylR-His con bromuro de bencilo. Con el fin de contrastar todas las evidencias *in vivo* de la interacción entre bromuro de bencilo y XylR se procedió a la purificación de la proteína XylR-His y a la incubación de la misma con Br^{Ph}, para confirmar si *in vitro* también se observaba esta

Resultados

interacción. La idea que se planteó es que esta interacción permitiese conocer mejor qué aminoácido de la proteína estaban en la superficie y cuales formaban parte de un bolsillo interior. Dada la reactividad del Br^{Ph} y las condiciones del ensayo que favorecen la reacción se pensó que esta molécula contactaría con residuos con grupos de naturaleza nucleófila. La hipótesis de trabajo fue que las posiciones ocupadas por estos aminoácidos formaban parte del bolsillo de unión a compuestos aromáticos o se localizaban expuestos al medio.

6.2.1 Resultados del análisis de espectrometría de masas de la proteína XylR-His antes y después de la reacción con bromuro de bencilo. El análisis *in vitro* de esta interacción se hizo por espectrometría de masas. Este estudio consistió en comparar las masas de los péptidos de los espectros antes y después de la incubación con bromuro de bencilo y comprobar si algunos péptidos habían incorporado la masa correspondiente a uno o varios grupos bencilo. La hipótesis que se barajó fue la de que ciertos residuos reaccionarían con el bromuro de bencilo de distintas formas dando lugar a distintos incrementos de las masas de los péptidos según hubiera sido esta reacción.

De este análisis se concluyó que en ningún caso la reacción entre el bromuro de bencilo y los péptidos reaccionantes era cuantitativa, es decir siempre se observaba en los espectros de masas poblaciones de los péptidos marcados y sin marcar. También se observó que en ningún caso un péptido incorporaba más de un grupo bencilo por reacción. Los espectros de masas de la proteína se obtuvieron usando dos métodos de ionización diferentes (Maldi-Tof y Trampa Iónica) y una vez identificados los péptidos marcados se procedió a su fragmentación y secuenciación para determinar qué aminoácido habían reaccionado.

Los resultados indicaron que los aminoácidos modificados por su reacción con bromuro de bencilo eran un total de 16 distribuidos en 15 péptidos diferentes. Estos aminoácidos se distribuyen a lo largo de toda la proteína concentrándose prioritariamente en los dominios A y B.

Tabla 8. Secuencia y longitud de los péptidos cuya masa ha sido modificada por reacción de alguno de los residuos con bromuro de bencilo.

Número	Inicio-Fin	Secuencia ¹
1	9-22	MQHED M QDLSSQIR
2	30-36	I WLGEQR
3	51-60	EIISLIG V ER
4	68-81	LGYQSGL M DAELAR
5	110-118	LLTMDI A R
6	168-176	IIFQETS C R
7	205-212	S DPIVDER
8	213-223	Y ELQTQVANLR
9	228-243	Q YDGQYYGIGHSPAYK
10	371-384	LITATNENLEE A VK
11	396-407	LNVFPV H IPPLR
12	439-453	AMEACLHY Q WPGNIR
13	496-506	LEEESGDS W FR
14	507-524	QIIDQGV S LEDLEAGL M R
15	530-539	C GQNISQAAR

¹En rojo se marca el aminoácido que ha reaccionado.

Tabla 9. Posición en la proteína XylR-His de los aminoácidos que han reaccionado con bromuro de bencilo.

Aminoácido	Posición ¹	Dominio
M	14	A
W	31	A
R	60	A
M	75	A
R	81	A
R	118	A
C	175	A
S	205	A
Y	213	B
D	230	B
K	384	C
H	402	C
W	448	C
W	504	C-D
M	523	D
C	530	D

¹La proteína XylR consta de 4 dominios con distintas longitudes: A (1-211); B (212-234); C (235-472) y D (519-566). Entre paréntesis se indica la longitud en aa de cada dominio.

Resultados

Estos datos demuestran que se ha dado una interacción de carácter covalente entre el bromuro de bencilo y la proteína XylR-His en las condiciones de reacción usadas. Esta interacción se reparte a lo largo de toda la proteína, dándose en mayor grado en el dominio A de XylR responsable de la interacción de XylR con los efectores naturales. El siguiente paso fue comprobar si la interacción de Br[^]Ph con XylR incluía posiciones predichas para la interacción de XylR con tolueno o *m*-xileno.

6.2.2 Mapeo de los aminoácidos marcados en el modelo del dominio A de XylR.

Usando como referencia el modelo A de XylR descrito por Devos *et al.* (2002), se mapearon los residuos modificados para comprobar su posición relativa con los aminoácidos que teóricamente interaccionan con el efector. Como ya se indicó en la Introducción estos residuos ocupan las posiciones 37, 65 y 110-186 siendo de especial interés dentro de este intervalo el 140 y el 172. El mapeo de los aminoácidos marcados se distribuye de la siguiente forma: [i] los residuos R118 y C175 caen en el intervalo de los aa 110-186 descritos como parte interaccionante de la proteína con el efector; [ii] los residuos R81 y W31 y R60 quedan en la superficie de la proteína; [iii] los residuos M14 y S205 quedan parcialmente expuestos y [iv] el aa M75 no está expuesto a la superficie.

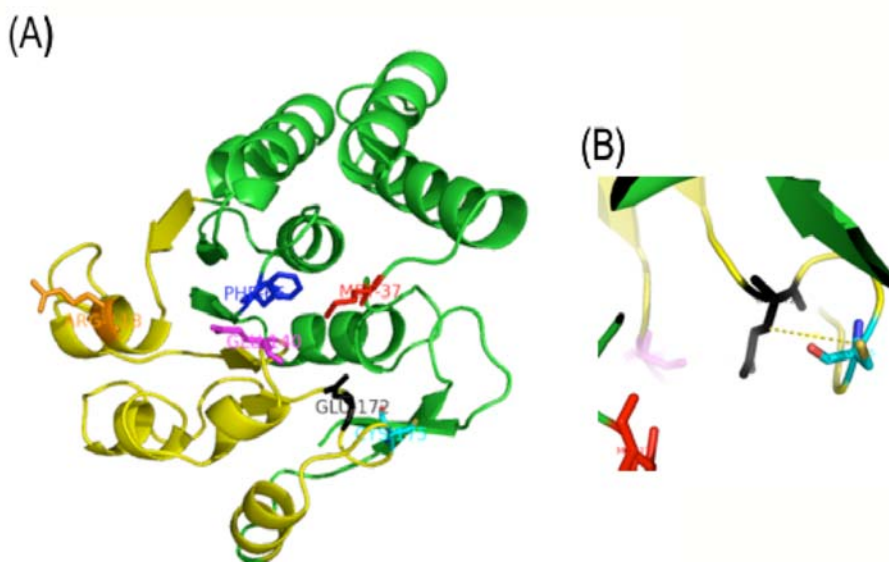


Fig. 32. Mapeo de los residuos R118 y C175 en el modelo del dominio A de XylR. (A) La estructura muestra en amarillo la región comprendida entre los aminoácidos 110-186 y los residuos M37 (rojo), F65 (azul), E140 (magenta) y E172 (negro) susceptibles de interaccionar con el efector de XylR. Junto con los aa R118 (naranja) y C175 (azul claro) que han reaccionado con Br[^]Ph. (B) Distancia (5.94Å) entre el azufre reactivo del residuo C175 y la cadena hidrofóbica del aa E172 candidata a interaccionar con los efectores, figura modificada de Devos *et al.* (2002). Sólo se mapean aquellos residuos modificados que aparecen en el modelo.

El residuo modificado C175 está cercano al E172 (Fig. 32B) propuesto como un residuo implicado en la unión del efector (Delgado, 1994). Este dato podría confirmar que E172 está involucrado en la especificidad de sustrato de XylR, ya que ésta parece acomodar el anillo bencénico del Br[^]Ph en esa posición como lo haría con un efector natural. De tal forma que al quedar estabilizado el anillo aromático (ya sea tolueno o Br[^]Ph) por la cadena hidrofóbica de E172, el carbono bencílico del Br[^]Ph puede reaccionar covalentemente, por proximidad, con el azufre de la cisteína 175. Lo mismo ocurre con la posición 118 descrita por Sarand *et al.* (2001) como susceptible de participar en la interacción de la proteína con el efector. Esta posición ocupada por una arginina está implicada en el reconocimiento de la molécula efectora y por lo tanto parece lógico que reaccione directamente con el bromuro de bencilo.

El resto de aminoácidos marcados se distribuyen en el modelo en posiciones más o menos expuestas a la superficie (Fig. 33). Para confirmar la relativa exposición de los residuos marcados en el modelo del dominio A se hizo una predicción de la accesibilidad de una molécula de disolvente en el modelo. A tal efecto se usó el servidor DPX (<http://hydra.icgeb.trieste.it/dpx>. Colaboración con Dr. Javier Tamames) que calcula la accesibilidad de una esfera, que simula una molécula de disolvente, en la estructura modelada. Este programa además permite calcular la distancia de un determinado residuo a una molécula de disolvente pudiéndose obtener por lo tanto datos sobre el grado de exposición de los residuos marcados en el modelo.

Tabla 10. Datos sobre la exposición al medio de los residuos modificados con bromuro de bencilo en el modelo del dominio A de XylR.

Residuo modificado	Color en las figuras	Distancia al medio (Å)	Exposición al medio
M14	Marrón	0.54	Media
W31	Dorado	0.37	Alta
R60	Salmón	0.96	Media
M75	Gris	1.12	Baja
R81	Violeta	0	Alta
R118	Naranja	0.24	Alta
C175	Azul claro	0.22	Alta
S205	Púrpura	0.87	Media

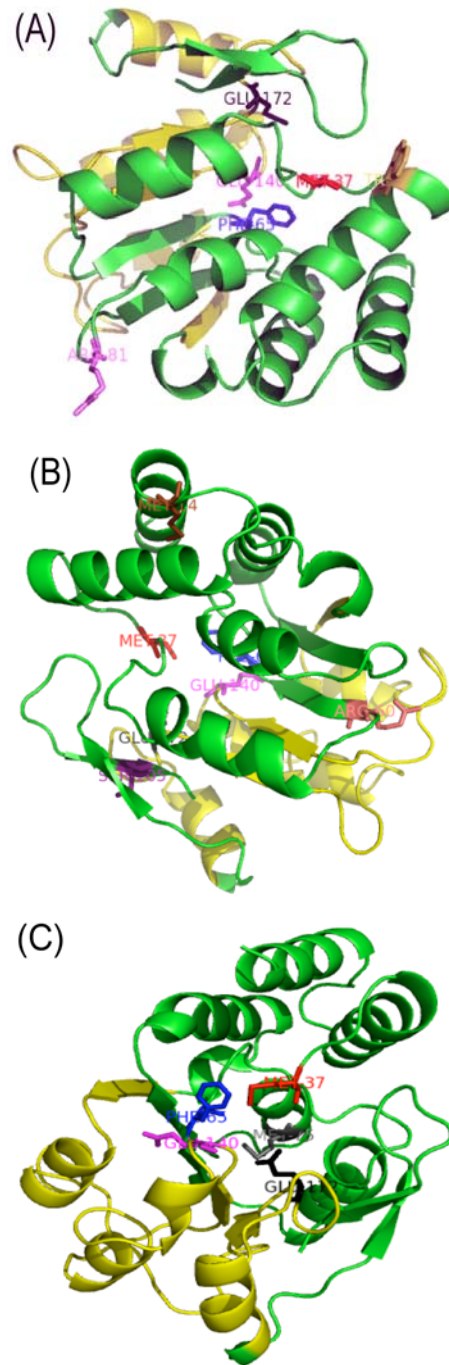


Fig. 33. Mapeo de los distintos residuos modificados en el modelo del dominio A de XylR. Las distintas vistas muestran en amarillo los aminoácidos 110-186, M37 (rojo), F65 (azul) E140 (magenta) y E172 (negro) susceptibles de interactuar con el efector de XylR. Además se mapean los residuos: (A) W31 (dorado) y R81 (violeta) expuestos en la superficie. (B) M14 (marrón), R60 (salmón) y S205 (púrpura) parcialmente expuestos y (C) M75 (gris) que queda alejado de la superficie.

El mapeo de los distintos residuos en el modelo pone de manifiesto que la predicción informática de exposición al medio de los aminoácidos concuerda con su posición en el modelo. En la Fig. 33 se puede observar que los residuos W31 y R81 quedan muy expuestos en la superficie de la proteína, mientras que los residuos M14, R60 y S205 ocupan zonas relativamente accesibles a las moléculas de disolvente. Sin embargo la posición M75 queda protegida en la estructura que propone el modelo.

Tal y como se analiza en la discusión este conjunto de datos sostiene el modelo de Devos *et al.*, (2002) y amplía algunos aspectos relativos a la interacción entre el dominio A de XylR y los efectores. Así mismo los resultados descritos en este capítulo ponen de manifiesto que se ha desarrollado un conjunto de técnicas y herramientas que hacen posible la identificación de reacciones químicas mediante fenotipos artificiales en bacterias.

DISCUSIÓN

1. Trampas genéticas.

Se considera que la era genómica comenzó en el año 1977 cuando se secuenció el genoma del virus Φ X174 que infecta a *E. coli* (Sanger *et al.*, 1977). Desde entonces y gracias fundamentalmente al desarrollo de técnicas de secuenciación y de métodos de extracción de ADN de muestras de muy distintas naturaleza, la metagenómica se ha convertido en un campo muy prometedor para la búsqueda de nuevos genes y enzimas. Esta búsqueda basada en análisis por secuencia o por función ha permitido tener un mayor conocimiento de la fracción no cultivable de microorganismos y de virus de la Biosfera. Sin embargo todavía existe una gran cantidad de información que obtener del metagenoma microbiano dado que se considera que éste contiene el mayor repertorio de actividades enzimáticas del planeta. Por lo tanto, aún se hace necesario la creación de nuevas estrategias que permitan explorar los paisajes genéticos, en busca de biocatalizadores funcionales (Galvao *et al.*, 2005). En este contexto las trampas genéticas que se describen en este trabajo, se pueden considerar herramientas potentes en la búsqueda de genes que intervengan en biotransformaciones o en la biodegradación de contaminantes ambientales.

1.1 Las genotecas metagenómicas y los hospedadores bacterianos. Con el fin de llevar a cabo la búsqueda de nuevas actividades enzimáticas y genes de interés se deben construir las colecciones adecuadas. En primer lugar se deben construir genotecas a partir de ADN ambiental de muestras donde es probable que se encuentren las actividades que se buscan. Generalmente la presencia de ciertos contaminantes ambientales en un ecosistema provoca la selección positiva de aquellos microorganismos, que individualmente o formando parte de una comunidad microbiana, son capaces de mineralizar dichos compuestos tóxicos. Por ejemplo, para la búsqueda de actividades tipo monooxigenasas de anillo se deberían usar muestras con una historia por contaminación de disolventes orgánicos. En el caso de búsquedas de actividades tipo biodesulfurización de dibenzotiofeno, se partirá de ambientes contaminados con crudos de petróleo y para buscar dehidroclorinasas de lindano se usarán suelos contaminados con el mismo.

En segundo lugar, la elección del vector donde construir la genoteca es determinante a la hora de buscar los genes y enzimas de interés. Si se desea encontrar operones

Discusión

catabólicos, rutas de degradación enteras o genes implicados en una única biotransformación hay que construir la genoteca con distintos tamaños de inserto. La longitud del segmento de ADN metagenómico determina el éxito en la búsqueda de unas u otras actividades enzimáticas. Por ejemplo hemos estimado que en un ADN de aproximadamente 10 Kb se podría encontrar un gen que codificase un paso de una ruta de biodegradación mientras que para la búsqueda de un operón entero se necesitaría un segmento de ADN ambiental mayor de aproximadamente 40 Kb.

Por otro lado la elección del hospedador donde se construye la genoteca es crucial para poder identificar nuevos biocatalizadores. La gran mayoría de las colecciones descritas en la literatura usan *E. coli* como hospedador. Esto se debe a que existe un gran número de vectores donde construir genotecas que repliquen en *E. coli* y a que hay un amplio conocimiento de las técnicas que se necesitan para trabajar con esta bacteria. Sin embargo, ésta no es lo suficientemente robusta para ser sometida a análisis por función que requieren el uso de contaminantes tóxicos y por lo tanto actividades de biodegradación de estos compuestos no se pueden buscar en este hospedador. Por este motivo, es necesario el desarrollo de vectores que permitan construir y analizar genotecas en hospedadores distintos. Uno de estos puede ser *P. putida* ya que dada su versatilidad nutricional puede crecer en un gran número diferente de fuentes de carbono, incluido en algunos casos contaminantes ambientales. Para poder construir metagenotecas que repliquen en *P. putida* se deben usar vectores de amplio rango de hospedador, con un origen de replicación compatible con varios tipos de bacterias que incluyan *P. putida*.

Alternativamente existe la posibilidad de llevar a cabo la construcción y análisis de genotecas independientemente del hospedador. Esto es posible usando un sistema de compartimentalización *in vitro* de transcripción y traducción de segmentos individuales de ADN. Este abordaje implica la creación de compartimentos que alberguen un único segmento de ADN en micro gotas construidas a partir de emulsiones de agua/aceite. La transcripción y traducción del ADN en estas micro-gotas puede ser analizado usando sustratos cromo/fluorogénicos permitiendo así el descubrimiento de nuevas enzimas (Sepp *et al.*, 2002; Griffiths y Tawfik, 2003; Peisajovich y Tawfik, 2007). Este sistema evita tener que usar la maquinaria de expresión de una bacteria y por lo tanto evita la

pérdida en el análisis de aquellos genes que por uno u otro motivo no se hayan expresado.

1.2 El sistema de dos transposones: Eficacia y ortogonalidad. El sistema utilizado en este trabajo para construir biosensores o trampas genéticas ha sido un sistema basado en los transposones Tn5 y Tn7, que ha resultado ser eficaz en *E. coli* y *P. putida*. Se basa en dos inserciones cromosómicas sucesivas que permiten en un primer paso introducir genes informadores en el cromosoma de cepas bacteriana. A continuación se pueden insertar de forma versátil los reguladores transcripcionales y los promotores adecuados para cada trampa genética que se quiera construir. Estas dos inserciones consecutivas si bien insertan en el cromosoma de la cepa receptora toda la maquinaria genética potencialmente necesaria para que ésta sea funcional, no son activas. Tras las dos inserciones la cepa bacteriana no puede ser usada ni como biosensor ni como trampa ya que se necesita eliminar [i] los marcadores de presión selectiva para una posible liberación de la cepa al ambiente o para poder usar un rango de vectores más amplio donde construir la metagenoteca a analizar y [ii] el extremo derecho del transposón Tn7 para que la fusión transcripcional promotor-gen informador sea funcional. La eliminación de estos segmentos se hace posible por eventos de recombinación.

Este sistema de dos transposones ha demostrado que las sucesivas inserciones de segmentos de ADN en el cromosoma de las cepas receptoras (*E. coli* y *P. putida*) se hace de forma estable y ortogonal ya que no afectan a la viabilidad ni a la robustez de las cepas.

1.3 El sistema de dos transposones: Dos inserciones frente a una transposición. Un aspecto clave en el diseño de este sistema es que permite establecer una plataforma genética sobre la que construir distintos circuitos genéticos en un sitio determinado y fijo del cromosoma bacteriano. Esto es posible gracias a la inserción en el cromosoma de un sitio óptimo *attTn7* de *E. coli* por arriba de los genes informadores. Esta característica del sistema tiene varias ventajas sobre otro posible diseño que incluyese en una sola transposición todo el circuito genético. Estas ventajas son: [i] la existencia de un sitio óptimo de inserción del transposón Tn7 permite que la introducción de éste se haga de una forma muy eficaz y exacta en el mismo sitio del genoma bacteriano. Además no todos los cromosomas bacterianos presentan sitios *attTn7*, por lo tanto la

implementación de éste es fundamental para posteriores inserciones. [ii] una vez insertado el mini-Tn5 al azar en el cromosoma bacteriano se puede elegir la inserción que mejor funciona como biosensor y usar esta misma para la construcción de otros circuitos genéticos. Esta característica aporta al sistema modularidad, ya que permite intercambiar sobre una misma plataforma genética distintos módulos reguladores, con reguladores transcripcionales y promotores. Este hecho hace que se pueda construir sobre la misma cepa distintos biosensores y trampas genéticas insertando las proteínas reguladoras y los promotores elegidos para cada caso por medio del vector pCAC5.

1.4 Los reguladores transcripcionales, los promotores y los genes informadores.

Estos módulos son los responsables de que las trampas genéticas pongan de manifiesto que una determinada reacción química ha tenido lugar. Este fenómeno ocurre cuando un segmento de ADN metagenómico codifica una enzima que cataliza esta transformación cuyo producto pone en funcionamiento la trampa. De esta forma, una reacción química acaba convirtiéndose en un fenotipo bacteriano. Como ya se ha descrito anteriormente para la construcción de las trampas genéticas descritas en este trabajo se han usado reguladores transcripcionales (DmpR, HbpRCBP6 y XylR5) descritos en la literatura (ver Resultados 2.1, 3.1 y 4.1). Sin embargo para la construcción de futuras trampas genéticas, se hará necesario el uso de nuevos reguladores que respondan a los productos de las reacciones que se quieren identificar en una genoteca metagenómica. La elección de éstos se deberá llevar a cabo en el amplio repertorio de reguladores transcripcionales que de forma natural existen en la naturaleza (Díaz, 2000; van der Meer *et al.*, 2004) o se podrán desarrollar *a la carta* para que respondan a la molécula efectora deseada (Galvao y de Lorenzo, 2006). Por otro lado el uso de genes informadores no se debe restringir a fenotipos visuales como los usados en este trabajo. También se pueden emplear fenotipos distintos de la emisión de luz. Uno de ellos podría ser el uso del gen METasa que produce metanotiol con un olor desagradable (patente de Nicklin, 2007) o la producción de olor a plátano. (<http://openwetware.org/wiki/IGEM:MIT/2006/Blurb>).

1.5 Las tres trampas genéticas y un biosensor. A lo largo del presente trabajo se han construido y validado tres trampas genéticas y un biosensor en *P. putida* KT2440. Estas trampas se han elegido para llevar a cabo análisis por función de determinadas funciones enzimáticas. Estas actividades son: [i] monooxigenasas de anillo, capaces de

catalizar la hidroxilación de benceno convirtiéndolo en fenol (Fig. 21). Esta reacción químicamente no es nada favorable y por lo tanto la búsqueda de enzimas que la catalicen puede resultar de interés industrial. [ii] Biodesulfurización de dibenzotiofeno, que como se indicó en el apartado de Resultados permite la eliminación de azufre del DBT sin que se pierda capacidad calorífica (Fig. 23). La pérdida de azufre de DBT presente en los crudos de petróleo puede ayudar a disminuir la incidencia de la lluvia ácida. [iii] Dehidroclorinación de lindano, actividad que inicia la ruta de biodegradación de lindano, permitiendo su mineralización y eliminación de ecosistemas contaminados (Fig. 25). En comparación con otros análisis por función como por ejemplo crecimiento condicional o uso de sustratos/productos cromogénicos, las trampas genéticas permiten identificar reacciones enzimáticas diferentes. Estas transformaciones están relacionadas con biodegradación de contaminantes ambientales xenobióticos, para las que otros tipos de análisis por función no existen.

El biosensor construido con el sistema de dos transposones en *P. putida* KT2440, responde a la presencia de salicilato y puede usarse para la búsqueda de actividades relacionadas con la biodegradación de naftaleno y antraceno, si bien estas aplicaciones no se contemplan dentro de esta Tesis Doctoral.

Todas estas construcciones han sido validadas con los correspondientes controles y se ha demostrado su eficacia para traducir determinadas transformaciones químicas en fenotipos bacterianos. Esta característica las hace especialmente interesantes para aplicaciones en campos como la biorremediación, la detección de contaminantes ambientales y la metagenómica.

1.6 Perspectivas futuras. A la luz de los resultados descritos en este trabajo, se puede concluir que se ha desarrollado un sistema eficaz para la construcción de cepas bacterianas como trampas genéticas. Por lo tanto parece evidente que el próximo paso a dar es someter a tamizado al mayor número posible de colecciones en busca de actividades tipo monooxigenasas de anillo, biodesulfurización de DBT y dehidroclorinasas de lindano. A tal efecto existe una necesidad de construir genotecas metagenómicas en vectores capaces de replicar en *P. putida* de distintos tipos de muestras, donde es probable encontrar este tipo de actividades. Este trabajo proyecta en colaboración con otros grupos la construcción de estas metagenotecas. A lo largo de

Discusión

todo este trabajo se ha participado en dos proyectos que han permitido la obtención de muestras de gran interés para la construcción de metagenotecas (Fig 34).

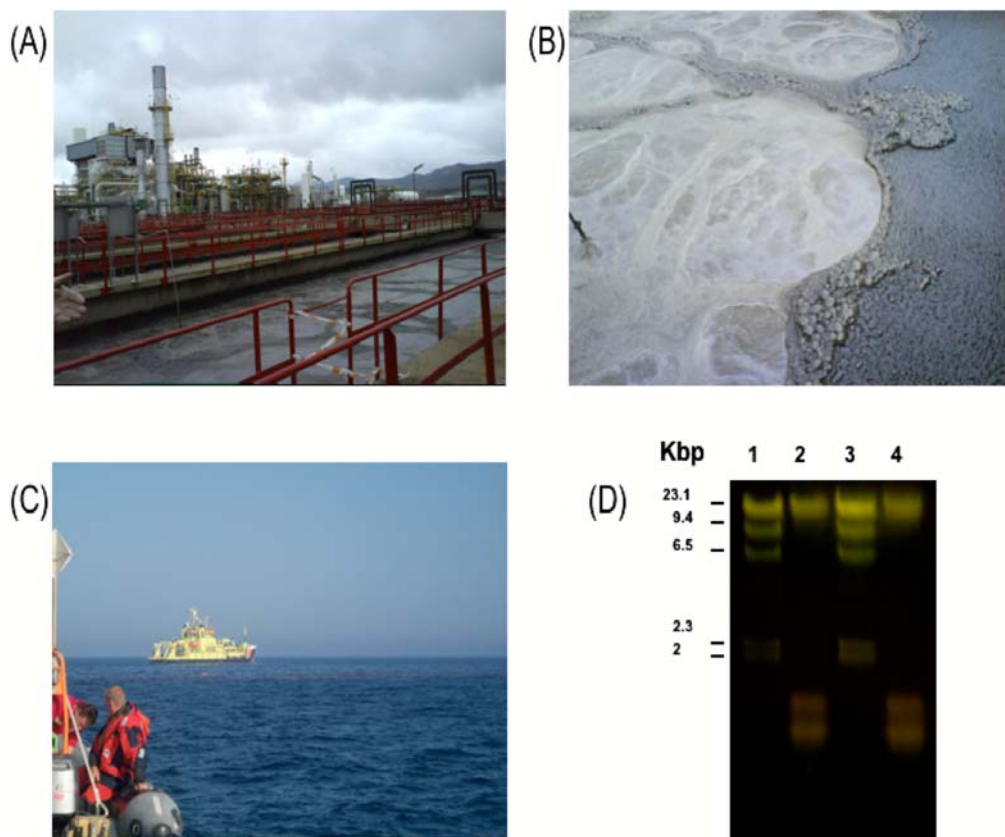


Fig. 34. Toma de muestras para la construcción de genotecas metagenómicas. (A) y (B) Muestras tomadas de la refinería de Repsol YPF en Puerto Llano (Ciudad Real). (C) Vertido de petróleo (mancha de color rojo) en el Mar del Norte. (D) ADN genómico (carriles 2 y 3) extraído de la fracción bacteriana correspondiente a 30 l de agua marina contaminada. (Carriles 1 y 4 : Marcadores). En ambos tipos de muestra la historia por contaminación con hidrocarburos de las mismas es alto. Esta característica las convierte en sitios de interés para llevar a cabo búsquedas de monooxigenasas de anillo y actividades de biodesulfurización de DBT.

2. Entrecruzamiento químico.

Los reguladores transcripcionales son los elementos claves en la construcción de trampas genéticas y de biosensores bacterianos. Se trata de proteínas, en muchos casos modulares, que controlan la activación de circuitos genéticos. Como ya se ha discutido anteriormente, la activación de estos circuitos tiene lugar por un fenómeno bien definido como es la interacción del efector con el factor de transcripción. A lo largo de este

trabajo se han descrito ejemplos de proteínas reguladoras y moléculas que interaccionan. Algunas de ellas son DmpR y fenol, HbpRCBP6 y 2-HBP o XylR5 y 1,2,4-TCB. Sin embargo aunque se conoce una gran cantidad de reguladores y sus efectores, no se conoce con exactitud cuál es el mecanismo de interacción entre ambos. Un mayor conocimiento de los elementos claves que participan en el mecanismo de interacción, puede permitir la creación de nuevas variantes de reguladores *a la carta* con nuevas especificidades. La proteína XylR de la familia NtrC ha sido elegida para estudiar en profundidad la interacción que se establece entre ésta y su efector.

La estrategia para caracterizar la interacción entre XylR y tolueno, *m*-xileno y *p*-xileno ha sido usar una técnica de entrecruzamiento químico. La idea que se barajó fue la de que una molécula funcionalizada, análoga a los efectores naturales de XylR, podría interaccionar químicamente con esta proteína en una posición igual o muy cercana a las posiciones propuestas como de unión con los efectores. El efector funcionalizado elegido fue el bromuro de bencilo y se caracterizó su interacción con la proteína XylR tanto *in vivo* como *in vitro*.

2.1 Experimentos *in vivo*: Actividad β -galactosidasa. Las evidencias de la interacción *in vivo* se obtuvieron por ensayos de actividad β -galactosidasa de las proteínas XylR silvestre y XylR-His. La forma de proceder fue comprobar cómo se comportaban estas proteínas en presencia y ausencia tanto de *m*-xileno como de bromuro de bencilo. Los resultados demostraron que estas proteínas eran totalmente activas en presencia de *m*-xileno, ya que en su presencia eran capaces de activar la transcripción del promotor *Pu*. Por otro lado pusieron de manifiesto que el Br[^]Ph interaccionaba de alguna manera con XylR de forma que ésta no era capaz de activar el promotor. Para comprobar si la interacción del bromuro de bencilo con XylR tenía lugar en la misma parte de la proteína que con *m*-xileno, se hicieron distintos ensayos con una versión de la proteína XylR sin el dominio A. Este dominio como ya se indicó anteriormente es el responsable de la unión al efector. Los resultados de estos ensayos demostraron que efectivamente la interacción entre el efector funcionalizado y XylR tenía lugar mayoritariamente en el dominio A, si bien parecía que también podía interaccionar con otros dominios implicados en su activación. Con el fin de confirmar estos datos se hicieron los experimentos que se describen a continuación.

2.2 Experimentos de cinética de producción de bioluminiscencia. Estos ensayos (Fig. 30) confirmaron los resultados obtenidos del registro de la actividad β -galactosidasa. Mientras el *m*-xileno activa XylR como una especie de sustrato, el bromuro de bencilo parece actuar como un inhibidor. Para comprobar la relación entre ambos efectores se registraron las cinéticas de producción de bioluminiscencia en presencia y ausencia de inhibidor y se representaron de la forma adecuada. La interpretación de estos datos fue que el *m*-xileno y el bromuro de bencilo son ligandos de XylR, pero uno es un activador (agonista) y el otro un antagonista. Esto quiere decir que ambos compiten por el mismo sitio de unión de la proteína. Es interesante destacar que según los datos cinéticos la inhibición de XylR por bromuro de bencilo *in vivo* no es de carácter permanente, es decir en estas condiciones de ensayo en las células en cultivo no se forma un enlace covalente entre ambos. Dada la naturaleza reactiva del Br[^]Ph se pensó que éste podría interaccionar covalentemente con las proteínas de las bacterias afectando así su viabilidad. Sin embargo los resultados obtenidos en los ensayos de registro de β -galactosidasa y bioluminiscencia confirman que este fenómeno no ocurre ya que en presencia de bromuro de bencilo las células siguen creciendo y viables. Este fenómeno se puede explicar en las condiciones de ensayo *in vivo* en las que la presión de vapor del Br[^]Ph es muy baja y las moléculas de Br[^]Ph que llegan a interaccionar con XylR dentro de la célula son limitadas. No obstante el Br[^]Ph llega a inhibir la actividad de XylR pero parece que en estas condiciones no es capaz de reaccionar químicamente con los residuos de XylR.

Por lo tanto de los datos que se obtienen *in vivo* (Fig. 28, 29C y 31) parece que la interacción entre XylR y *m*-xileno es de la misma naturaleza que con bromuro de bencilo. Ambos compuestos interaccionan *in vivo* con el mismo dominio de XylR.

2.3 Experimentos *in vitro*: XylR-His con bromuro de bencilo. Con el fin de confirmar los datos *in vivo* de la interacción que se establece entre el bromuro de bencilo y XylR se procedió a realizar un experimento *in vitro* de entrecruzamiento químico. En las condiciones de este ensayo se pretendía comprobar si XylR albergaba en su estructura al Br[^]Ph en las mismas posiciones en las que lo haría con su efector natural. De tal forma que al acomodarse el Br[^]Ph con XylR en esas posiciones pudiese reaccionar químicamente con los aminoácidos que forman parte de la región de interacción. Para llevar a cabo este experimento se purificó la proteína XylR-His y se

incubó en unas determinadas condiciones con el efector funcionalizado. Las condiciones de este ensayo favorecieron que se estableciese una reacción química entre algunos residuos de XylR-His y Br^{Ph}. La reacción tuvo lugar en un medio tamponado, con un exceso de reactivo para que XylR-His acomodase el Br^{Ph} en su estructura y reaccionase con él. Posteriormente se determinó por espectrometría de masas qué aminoácidos habían reaccionado covalentemente y por lo tanto de forma permanente con el bromuro de bencilo. Los resultados determinaron que un total de 16 aminoácidos habían reaccionado. Estos residuos se encontraban repartidos en 15 péptidos. En todos los casos se pudo observar la masa del péptido marcado, que contenía la unidad bencílica y sin marcar. Este dato reflejó que en ningún caso la reacción fue cuantitativa y no se pudo determinar si la reacción era más favorable en uno u otro residuo.

En un primer lugar se pensó que según lo descrito por Rogers *et al.* (1976) y Lang *et al.* (2006), la reacción entre el bromuro de bencilo debería darse favorablemente con residuos de tipo metionina. Según estos trabajos, en aminoácidos aislados que no forman parte de una cadena polipeptídica la bencilación de la metionina es 32 veces más rápida que la del grupo imidazol de la histidina y la del anillo indol del triptófano. Además en condiciones de pH neutro (en la que se llevó a cabo el ensayo), el átomo de azufre de la metionina es más nucleófilo que el de la cisteína, lo que favorece todavía más la hipótesis de que preferentemente la reacción tenga lugar en este tipo de residuos. En estos trabajos también se determinó que en proteínas como la fumarasa y la calmodulina, la reacción de bromuro de bencilo tenía lugar sólo con residuos tipo metionina. Sin embargo de un total de 17 metioninas presentes en la proteína, sólo se pudo registrar la reacción con tres de ellas. El resto de aminoácidos reaccionantes fueron cisteína, triptófano, arginina, serina, tirosina, lisina, histidina y ácido aspártico. En los casos de metionina y cisteína, el módulo bencílico ha debido incorporarse en el átomo de azufre. En la arginina y lisina la sustitución nucleófila que conduce a la incorporación del bencilo se ha debido producir en un átomo de nitrógeno. En la serina, tirosina y ácido aspártico debe ser el oxígeno el responsable del ataque nucleófilo en el carbono bencílico del efector. Los casos de triptófano e histidina son interesantes porque su reacción frente a un electrófilo como el bromuro de bencilo se debe producir en el sistema heteroaromático, formándose un enlace covalente C-C. Aunque la nucleofilia de los anillos aromáticos no es muy elevada, la naturaleza π -excedente de los sistemas de indol e imidazol existentes en el triptófano e histidina, respectivamente,

Discusión

hacía razonable esta suposición. Esta reactividad explica la identificación de tres triptófanos diferentes (W31, W448 y W504) y una histidina (H402) benciladas. Estos resultados ponen de manifiesto que en este experimento el bromuro de bencilo reacciona con residuos *a priori* no tan reactivos, fruto probablemente de la forma que tiene XylR de acomodar anillos aromáticos en su estructura.

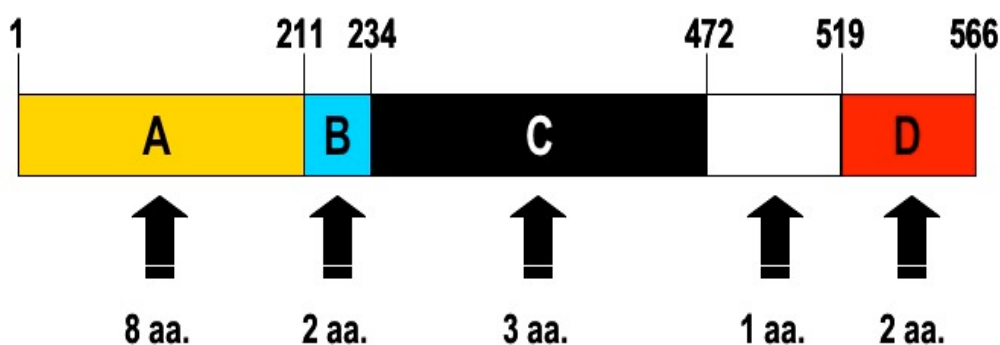


Fig. 35. Esquema de la estructura modular de XylR y los aminoácidos marcados en los distintos dominios. Los dominios de XylR son: [i] dominio A que representa el 37% de la secuencia de XylR; [ii] dominio B (4%); [iii] dominio C (42%) y [iv] dominio D (8%). Debajo de cada dominio se indica el número de aminoácidos que han reaccionado químicamente con el bromuro de bencilo.

La distribución de los aminoácidos marcados en la proteína reveló que 10 de los 16 residuos marcados se encontraban en los dominios A y B. Todos estos datos confirman que efectivamente XylR reacciona con bromuro de bencilo y que en el caso del ensayo *in vitro* la interacción es de carácter químico e irreversible. Como se puede ver en la distribución de los aminoácidos marcados sobre la proteína aquellos que no interaccionan con los dominios A y B se reparten entre los dominios C y D casi por igual. Este dato refleja la exposición de residuos reaccionantes en la superficie de la proteína.

En resumen, la hipótesis de que el bromuro de bencilo interacciona con la proteína XylR-His queda patente por los datos obtenidos de los ensayos *in vivo* e *in vitro*. En el caso de las condiciones *in vivo* esta interacción es de naturaleza reversible mientras que en las condiciones *in vitro* el Br^{Ph} parece reaccionar químicamente y de forma prioritaria con los aminoácidos que forman el dominio A de XylR. Esta reacción parece dar lugar a enlaces covalentes que hacen que la interacción entre ambos sea permanente.

2.4 El modelo del dominio A de XylR y el entrecruzamiento químico. Para interpretar los resultados del entrecruzamiento químico entre XylR y Br⁺Ph se mapearon en el modelo del dominio A de XylR (Devos *et al.*, 2002), los aminoácidos marcados (8 residuos) y los identificados como susceptibles de participar en la interacción de XylR con los efectores naturales. Se obtuvieron las siguientes conclusiones.

- Los residuos M37, F65, E140 y E172 junto con la región comprendida entre los aminoácidos 110-186, susceptibles de interaccionar con el efector de XylR, se extienden por casi la mitad del dominio A. Además los residuos M37 y F65 parecen estar parcialmente expuestos en la superficie de la proteína mientras los E140 y E172 podrían formar parte de un bolsillo menos expuesto.
- Los residuos marcados R118 y C175, caen en la zona predicha de interacción 110-186 y ocupan posiciones expuestas en la estructura. La proximidad entre el residuo E172 y C175 parece confirmar la importancia del residuo E172 en la interacción con el efector. La hipótesis que argumenta esta afirmación es que la cadena hidrofóbica del residuo E172 puede interaccionar con la molécula efectora acomodando ésta en la estructura de XylR y favoreciendo la reacción química con residuos adyacentes como el C175. Por otro lado el residuo R118 parece también estar involucrado en la interacción con el efector ya que reacciona directamente con él.
- El resto de aminoácidos marcados M14, W31, R60, M75, R81 y S205 se distribuyen en la estructura en posiciones próximas a la superficie. A excepción de M75 que parece incluir el grupo bencilo en el camino del efector hacia el centro activo.

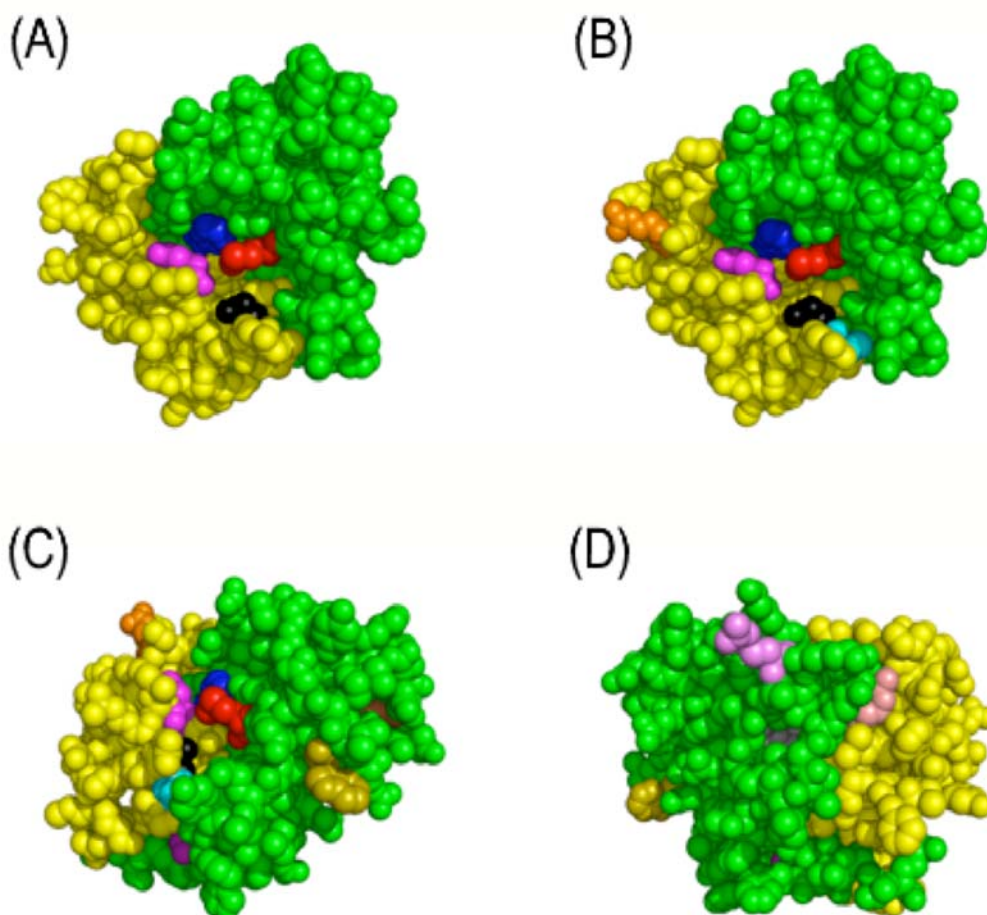


Fig. 36. Mapeo de residuos interaccionantes con el efector y marcados con bromuro de bencilo en la superficie del modelo estructural del dominio A de XylR (Devos *et al.*, 2002). (A) La región comprendida entre los residuos 110-186 en amarillo y los residuos M37 (rojo), F65 (azul), E140 (magenta) y E172 (negro). (B) La misma vista que (A) pero con los residuos R118 (naranja) y C175 (Azul claro). (C) y (D) Distintas vistas de (B) con los residuos M14 (marrón), W31 (dorado), R60 (salmón), M75 (gris), R81 (violeta) y S205 (púrpura).

El hecho de que sólo dos de los aminoácidos marcados en el dominio A (R118 y C175), se localicen en la zona predicha para la interacción de la molécula con el efector y que los restantes se localicen fundamentalmente en la superficie de la proteína indica la topología de la misma. El bromuro de bencilo tiene una estructura muy parecida al tolueno y por lo tanto es de esperar que se acomode de forma similar en la proteína a como lo haría éste. Sin embargo también es mucho más reactivo que el tolueno lo que puede explicar que los aminoácidos reaccionantes estén en su mayoría en la superficie de la proteína. Si además se tiene en cuenta las condiciones del ensayo en las que se favorece la reacción entre el Br[^]Ph y la proteína esta suposición parece razonable.

Por lo tanto se podría considerar que las interacciones del bromuro de bencilo con el dominio A de XylR en las posiciones R118 y C175 son específicas en cuanto que concuerdan con los datos predichos en el modelo de Devos *et al.* (2002) mientras que el resto de aminoácidos modificados, han reaccionado de forma inespecífica. Esta inespecificidad pone de manifiesto que Br^{Ph} reacciona con los aminoácidos más expuestos que parecen proteger el bolsillo de unión al efector.

2.5 Perspectivas futuras.

Con el fin de profundizar en la caracterización de la interacción entre la proteína XylR y sus efectores naturales, parece interesante llevar a cabo sobre la proteína purificada XylR-His ensayos de microcalorimetría, de dicroísmo circular y de ultracentrifugación analítica. Estos ensayos permitirán obtener medidas de afinidad de la proteína por distintos efectores, así como conocer el estado de oligomerización de la misma en presencia y ausencia de efectores.

A lo largo de este trabajo, experimentos de dicroísmo circular y ultracentrifugación analítica no se han podido llevar a cabo sobre la proteína purificada XylR-His. El motivo es que el medio en el que se encuentra purificada la proteína tiene un conjunto de componentes que no son compatibles con estas técnicas espectroscópicas. En el caso de la microcalorimetría si se podrían llevar a cabo estudios de afinidad de XylR-His con efectores naturales como tolueno o *m*-xileno, pero dada su baja solubilidad son técnicamente difíciles de llevar a cabo. Lo que se propone para próximos estudios es purificar variantes de XylR que tengan afinidad por efectores más solubles y que se purifiquen en un medio compatible con estas técnicas espectroscópicas.

En conclusión, este trabajo presenta un conjunto de herramientas para la traducción de reacciones químicas en fenotipos artificiales así como datos que confirman la validez del modelo estructural del dominio A de XylR (Devos *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

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

1. El sistema diseñado y construido para la inserción ortogonal y estable de circuitos genéticos en el cromosoma de bacterias Gram-negativas, es eficaz en la construcción de biosensores y trampas genéticas.
2. La cepa *P. putida* KTMOx se puede usar tanto como biosensor de fenol como trampa genética para la búsqueda de actividades tipo monooxigenasas de anillo.
3. Se ha construido la cepa *P.putida* KTDBT capaz de ser utilizada como biosensor de 2-HBP y como trampa genética para la búsqueda de actividades tipo biodesulfurización de DBT.
4. La detección de 1,2,4-TCB en muestras ambientales y la búsqueda de actividades relacionadas con la dehidroclorinación de lindano, se puede llevar a cabo con la cepa *P. putida* KTBx5 diseñada a tal efecto.
5. La cepa *P. putida* KTDntR puede ser utilizada como biosensor de salicilato en rutas de degradación de naftaleno y antraceno.
6. El bromuro de bencilo es instrumental como agente de entrecruzamiento químico con la proteína XylR.
7. Los residuos R118 y E172 de la proteína XylR participan en la interacción entre el efector y la proteína.
8. Los resultados obtenidos de los ensayos de entrecruzamiento químico confirman que en el modelo estructural del dominio A de XylR descrito por Devos *et al.* (2002) existe un bolsillo de unión al efector alejado de la superficie de la proteína.

BIBLIOGRAFÍA

- Abremski, K. y Hoess, R. (1984) Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* **259**: 1509-1514.
- Andrews, B.J., Proteau, G.A., Beatty, L.G., y Sadowski, P.D. (1985) The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. *Cell* **40**: 795-803.
- Assinder, S.J. y Williams, P.A. (1990) The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv Microb Physiol.* **31**: 1-69.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F.C., Bagdasarian, M.M., Frey, J. y 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.
- Becher, A., y Schweizer, H.P. (2000) Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *BioTechniques* **29**: 948-950, 952.
- Beggah, S., Vogne, C., Zenaro, E. y van der Meer, J.R. (2008) Mutant HbpR transcription activator isolation for 2-chlorobiphenyl via green fluorescent protein-based flow cytometry and cell sorting. *Microbial Biotechnology* **1**: 68-78.
- Bertoni, G., Bolognese, F., Galli, E. y Barbieri, P. (1996) Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene and o-xylene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3704-3711.
- Burlage, R.S., Saylor, G.S. y Larimer, F. (1990) Monitoring of naphthalene catabolism by bioluminescence with *nah-lux* transcriptional fusions. *J Bacteriol* **172**: 4749-4757.
- Camps, M., Naukkarinen, J., Johnson, B. P. y L.A. Loeb . (2003.) Targeted gene evolution in *Escherichia coli* using a highly error-prone DNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 9727-9732.
- Carbajosa, G., Trigo, A., Valencia, A. y Cases, I. (2009) Bionemo: molecular information on biodegradation metabolism. *Nucleic Acids Res* **37**: D598-602.
- Carmona, M., Rodríguez, M.J., Martínez-Costa, O. y De Lorenzo, V. (2000) *In vivo* and *in vitro* effects of (p)ppGpp on the sigma(54) promoter *Pu* of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **182**: 4711-4718.
- Carmona, M., Fernández, S., Rodríguez, M.J. y de Lorenzo, V. (2005) *m*-xylene-responsive *Pu-PnifH* hybrid sigma54 promoters that overcome physiological control in *Pseudomonas putida* KT2442. *J Bacteriol* **187**: 125-134.
- Carreño, C.A. y de Lorenzo, V. (2009) Genetic traps for surveying new catalysts in (meta)genomic DNA. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Ed. K.N. Timmis) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Experimental Protocols and appendices*. **4** Chapter 96.
- Cerniglia, C.E. (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**: 351-368.
- Chalberg, T.W., Genise, H.L., Vollrath, D. y Calos, M.P. (2005) phiC31 integrase confers genomic integration and long-term transgene expression in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**: 2140-2146.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. y Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.
- Chauhan, S., Barbieri, P. y Wood, T.K. (1998) Oxidation of trichloroethylene, 1,1-dichloroethylene, and chloroform by toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3023-3024.

Bibliografía

- Cherepanov, P.P. y Wackernagel, W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14.
- Choi, K., Gaynor, J.B., White, K.G., Lopez, C., Bosio, C.M., Karhoff-Schweizer, R.R. y H.P. Schweizer. (2005) A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods* **2**: 443-448.
- Choi, K.H., Kumar, A. y Schweizer, H.P. (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* **64**: 391-397.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G. y Ward, W.W. (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**: 1212-1218.
- Cottrell, M.T., Moore, J.A. y D. L. Kirchman. (1999.) Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2553-2557.
- Daniel, R. (2005) The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 470-478.
- de las Heras, A., Carreño, C.A. y de Lorenzo, V. (2008) Stable implantation of orthogonal sensor circuits in Gram-negative bacteria for environmental release. *Environ Microbiol* **10**: 3305-3316.
- de Lorenzo, V. y 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 Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. y Timmis, K.N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**: 6568-6572.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Metzke, M. y Timmis, K.N. (1991) An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the sigma 54-dependent *Pu* promoter of TOL plasmid. *EMBO J* **10**: 1159-1167.
- de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B. y Timmis, K.N. (1993) Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17-24.
- Delgado, A. y J.L. Ramos. (1994.) Genetic evidence for activation of the positive transcriptional regulator XylR, a member of the NtrC family of regulators, by effector binding. *J Biol Chem* **269**: 8059-8062.
- Devos, D., Garmendia, J., de Lorenzo, V. y Valencia, A. (2002) Deciphering the action of aromatic effectors on the prokaryotic enhancer-binding protein XylR: a structural model of its N-terminal domain. *Environ Microbiol* **4**: 29-41.
- Díaz, E., y M.A. Prieto. (2000) Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Microbiol* **11**: 467-475.
- Diaz-Torres, M.L., McNab, R., Spratt, D.A., Villedieu, A., Hunt, N., Wilson, M. y Mullany, P. (2003) Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1430-1432.
- Eberl, L., Kristensen, C. S., Givskov, M., Grohmann, E., Gerlitz, M. y H. Schwab. (1994) Analysis of the multimer resolution system encoded by the parCBA operon of broad-host-range plasmid RP4. *Mol Microbiol* **12**: 131-141
- Edwards, R.A. y Rohwer, F. (2005) Viral metagenomics. *Nat Rev Microbiol* **3**: 504-510.
- Engbrecht, J., Simon, M. y Silverman, M. (1985) Measuring gene expression with light. *Science* **227**: 1345-1347.

- Engebrecht, J., Nealson, K. y M. Silverman. (1983.) Bacterial Bioluminescence: Isolation and Genetic Analysis of Functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* **32**: 773-781.
- Ensley, B.D., Ratzkin, B.J., Osslund, T.D., Simon, M.J., Wackett, L.P. y Gibson, D.T. (1983) Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* **222**: 167-169.
- Fernandez, S., Shingler, V. y de Lorenzo, V. (1994) Cross-regulation by XylR and DmpR activators of *Pseudomonas putida* suggests that transcriptional control of biodegradative operons evolves independently of catabolic genes. *J Bacteriol* **176**: 5052-5058.
- Ferrer, M. (2004) Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables. *Temas de Actualidad SEM* **38**: 11-17.
- Ferrer, M., Martínez-Abarca, F. y Golyshin, P.N. (2005a) Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 588-593.
- Ferrer, M., Beloqui, A., Timmis, K. y Golyshin, P. (2009) Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**: 109-123.
- Ferrer, M., Chernikova, T., Yakimov, M., Golyshin, P. y Timmis, K. (2003) Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat Biotechnol* **21**: 1266-1267.
- Ferrer, M., Golyshina, O., Chernikova, T., Khachane, A., Reyes-Duarte, D. y Santos, V.A. (2005b) Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ Microbiol* **7**: 1996-2010.
- Franklin, F.C., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M. y Timmis, K.N. (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7458-7462.
- Frøhlich, R.F., Hansen, S.G., Lisby, M., Grainge, I., Westergaard, O., Jayaram, M. y Knudsen, B.R. (2001) Inhibition of Flp recombinase by the topoisomerase I-targeting drugs, camptothecin and NSC-314622. *J Biol Chem* **276**: 6993-6997.
- Fu, Y., Chen, W. y Huang, Q. (2008) Construction of two *lux*-tagged Hg²⁺-specific biosensors and their luminescence performance. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**: 363-370.
- Gallardo, M.E., Ferrandez, A., de Lorenzo, V., Garcia, J.L., y Diaz, E. (1997) Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. *J Bacteriol* **179**: 7156-7160.
- Galvao, T.C. y de Lorenzo, V. (2006) Transcriptional regulators *a la carte*: engineering new effector specificities in bacterial regulatory proteins. *Curr Opin Biotechnol* **17**: 34-42.
- Galvao, T.C., Mohn, W.W. y de Lorenzo, V. (2005) Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. *Trends Biotechnol* **23**: 497-506.
- Galvao, T.C., Mencia, M. y de Lorenzo, V. (2007) Emergence of novel functions in transcriptional regulators by regression to stem protein types. *Mol Microbiol* **65**: 907-919.
- Garmendia, J., Devos, D., Valencia, A., y de Lorenzo, V. (2001) *A la carte* transcriptional regulators: unlocking responses of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR to non-natural effectors. *Mol Microbiol* **42**: 47-59.
- Gillespie, D.E., Brady, S.F., Bettermann, A.D., Cianciotto, N.P., Liles, M.R., Rondon, M.R. *et al.* (2002) Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a

Bibliografía

- metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4301-4306.
- Gingras, A.C., Gstaiger, M., Raught, B. y Aebersold, R. (2007) Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 645-654.
- Gray, K.A., Mrachko, G.T. y Squires, C.H. (2003) Biodesulfurization of fossil fuels. *Curr Opin Microbiol* **6**: 229-235.
- Griffiths, A.D. y Tawfik, D.S. (2003) Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by *in vitro* compartmentalization. *EMBO J* **22**: 24-35.
- Groth, A. y Calos, M. (2004) Phage Integrases: Biology and Applications. *Journal of Molecular Biology* **335**: 667-678.
- Gupta, R., Beg, Q.K. y Lorenz, P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 15-32.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J. y Goodman, R.M. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* **5**: R245-249.
- Hansen, L.H. y Sørensen, S.J. (2000a) Detection and quantification of tetracyclines by whole cell biosensors. *FEMS Microbiol Lett* **190**: 273-278.
- Hansen, L.H. y Sørensen, S.J. (2000b) Versatile biosensor vectors for detection and quantification of mercury. *FEMS Microbiol Lett* **193**: 123-127.
- Harayama, S., Rekik, M., Wubbolts, M., Rose, K., Leppik, R.A. y Timmis, K.N. (1989) Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. *J Bacteriol* **171**: 5048-5055.
- Hay, A.G., Rice, J.F., Applegate, B.M., Bright, N.G. y Saylor, G.S. (2000) A bioluminescent whole-cell reporter for detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol in soil. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4589-4594.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. y 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.
- Hoang, T.T., Karhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J. y Schweizer H.P. (1998) A broad host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77-86.
- Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A. y Schweizer, H.P. (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* **43**: 59-72.
- Højberg, O., Schnider, U., Winteler, H.V., Sørensen, J. y Haas, D. (1999) Oxygen-sensing reporter strain of *Pseudomonas fluorescens* for monitoring the distribution of low-oxygen habitats in soil. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4085-4093.
- Hugenholtz, P. y Tyson, G.W. (2008) Microbiology: metagenomics. *Nature* **455**: 481-483.
- Huson, D.H., Richter, D.C., Mitra, S., Auch, A.F. y Schuster, S.C. (2009) Methods for comparative metagenomics. *BMC Bioinformatics* **10 Suppl 1**: S12.
- Imai, R., Nagata, Y., Fukuda, M., Takagi, M. y Yano, K. (1991) Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that

- eliminates HCl molecules from gamma-hexachlorocyclohexane. *J Bacteriol* **173**: 6811-6819.
- Jacob, A.E. y Grinter, N.J. (1975) Plasmid RP4 as a vector replicon in genetic engineering. *Nature* **255**: 504-506.
- Jaspers, M.C., Meier, C., Zehnder, A.J., Harms, H. y van der Meer, J.R. (2001) Measuring mass transfer processes of octane with the help of an *alkSalkB::gfp*-tagged *Escherichia coli*. *Environ Microbiol* **3**: 512-524.
- Jaspers, M.C., Suske, W.A., Schmid, A., Goslings, D.A., Kohler, H.P. y van der Meer, J.R. (2000) HbpR, a new member of the XylR/DmpR subclass within the NtrC family of bacterial transcriptional activators, regulates expression of 2-hydroxybiphenyl metabolism in *Pseudomonas azelaica* HBP1. *J Bacteriol* **182**: 405-417.
- Johnson, G.R., Jain, R.K. y Spain, J.C. (2002) Origins of the 2,4-dinitrotoluene pathway. *J Bacteriol* **184**: 4219-4232.
- Junca, H. y Pieper, D.H. (2003) Amplified functional DNA restriction analysis to determine catechol 2,3-dioxygenase gene diversity in soil bacteria. *J Microbiol Methods* **55**: 697-708.
- Junca, H., Plumeier, I., Hecht, H.J. y Pieper, D.H. (2004) Difference in kinetic behaviour of catechol 2,3-dioxygenase variants from a polluted environment. *Microbiology (Reading, Engl)* **150**: 4181-4187.
- Kahmann, R., Rudt, F., Koch, C. y Mertens, G. (1985) G inversion in bacteriophage Mu DNA is stimulated by a site within the invertase gene and a host factor. *Cell* **41**: 771-780.
- Kessler, B., de Lorenzo, V. y Timmis, K.N. (1992) A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of Gram-negative eubacteria: regulation of the *Pm* promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**: 293-301.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. y Tolker-Nielsen, T. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**: 1511-1524.
- Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A. y Daniel, R. (2003) Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1408-1416.
- Koch, B., Jensen, L.E., y Nybroe, O. (2001) A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J Microbiol Methods* **45**: 187-195.
- Kolter, R. (1981) Replication properties of plasmic R6K. *Plasmid* **5**: 2-9.
- Kolter, R., Inuzuka, M. y Helinski, D.R. (1978) Trans-complementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. *Cell* **15**: 1199-1208.
- Kouker, G. y Jaeger, K.E. (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* **53**: 211-213.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. y Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Kristensen, C.S., Eberl, L., Sanchez-Romero, J.M., Givskov, M., Molin, S. y de Lorenzo, V. (1995) Site-specific deletions of chromosomally located DNA

Bibliografía

- segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J Bacteriol* **177**: 52-58.
- Kuhstoss, S. y Rao, R.N. (1991) Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage phi C31. *Journal of Molecular Biology* **222**: 897-908.
- Lang, S., Spratt, D.E., Guillemette, J.G. y Palmer, M. (2006) Selective labeling of selenomethionine residues in proteins with a fluorescent derivative of benzyl bromide. *Anal Biochem* **359**: 253-258.
- Leahy, J.G., Batchelor, P.J. y Morcomb, S.M. (2003) Evolution of the soluble diiron monooxygenases. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 449-479.
- Leedjärv, A., Ivask, A., Virta, M. y Kahru, A. (2006) Analysis of bioavailable phenols from natural samples by recombinant luminescent bacterial sensors. *Chemosphere* **64**: 1910-1919.
- Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F., Schleper, C. y J. Eck. (2003.) The Impact of Non-cultivated Biodiversity on Enzyme Discovery and Evolution. *Biocatal Biotrans* **21**: 87-91.
- Maddocks, S.E., y Oyston, P.C. (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology (Reading, Engl)* **154**: 3609-3623.
- Majerník, A., Gottschalk, G. y Daniel, R. (2001) Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na⁽⁺⁾(Li⁽⁺⁾)/H⁽⁺⁾ antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. *J Bacteriol* **183**: 6645-6653.
- Manoil, C. y J. Beckwith. (1985.) Tn*phoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci* **82**: 8129-8133.
- Martinez-Morales, F., Borges, A.C., Martinez, A., Shanmugam, K.T. y Ingram, L.O. (1999) Chromosomal integration of heterologous DNA in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons used during construction. *J Bacteriol* **181**: 7143-7148.
- Masson, L., Comeau, Y., Brousseau, R., Samson, R. y Greer, C. (1993) Construction and application of chromosomally integrated *lac-lux* gene markers to monitor the fate of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacterium in contaminated soils. *Microb Releases* **1**: 209-216.
- Mattson, G., Conklin, E., Desai, S., Nielander, G., Savage, M.D. y Morgensen, S. (1993) A practical approach to crosslinking. *Mol Biol Rep* **17**: 167-183.
- McFarland, B.L. (1999) Biodesulfurization. *Curr Opin Microbiol* **2**: 257-264.
- Merkx, M., Kopp, D.A., Sazinsky, M.H., Blazyk, J.L., Müller, J. y Lippard, S.J. (2001) Dioxygen Activation and Methane Hydroxylation by Soluble Methane Monooxygenase: A Tale of Two Irons and Three Proteins A list of abbreviations can be found in Section 7. *Angew Chem Int Ed Engl* **40**: 2782-2807.
- Miller, J. (1972) Experiments in molecular genetics. 466.
- Miller, V.L. y J.J. Mekalanos. (1998.) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. bacteriol.* **170**: 2575-2583.
- Mirete, S., de Figueras, C.G. y González-Pastor, J.E. (2007) Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6001-6011.

- Mohn, W.W., Garmendia, J., Galvao, T.C. y de Lorenzo, V. (2006) Surveying biotransformations with *a la carte* genetic traps: translating dehydrochlorination of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) into *lacZ*-based phenotypes. *Environ Microbiol* **8**: 546-555.
- Monticello, D.J. (2000) Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 540-546.
- Morett, E. y Segovia, L. (1993) The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J Bacteriol* **175**: 6067-6074.
- Møller, S., Sternberg, C., Andersen, J.B., Christensen, B.B., Ramos, J.L., Givskov, M., y Molin, S. (1998) In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl Environ Microbiol* **64**: 721-732.
- Nagata, Y., Miyauchi, K. y Takagi, M. (1999) Complete analysis of genes and enzymes for gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**: 380-390.
- Nicklin, S.D., Patent 2007. Pub. No.: WO/2007/083137; International Application No.: PCT/GB2007/000171. Whole cell biosensor using the release of a volatile substance as reporter.
- North, A.K., Klose, K.E., Stedman, K.M. y S. Kustu. (1993) Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J Bacteriol* **175**: 4267-4273.
- O'Connor, K.E., Dobson, A.D., y Hartmans, S. (1997) Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4287-4291.
- Oldfield, C., Wood, N.T., Gilbert, S.C., Murray, F.D. y Faure, F.R. (1998) Desulphurisation of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genus *Rhodococcus*, and related taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek* **74**: 119-132.
- Olivares, E.C., Hollis, R.P., Chalberg, T.W., Meuse, L., Kay, M.A. y Calos, M.P. (2002) Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat Biotechnol* **20**: 1124-1128.
- Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., Keene, D.R., Lin, Q., Fang, M., Calos, M.P. y Khavari, P.A. (2002) Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat Med* **8**: 1166-1170.
- Pavel, H., Forsman, M. y Shingler, V. (1994) An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600 on *para*-substituted methylphenols. *J Bacteriol* **176**: 7550-7557.
- Peisajovich, S.G. y Tawfik, D.S. (2007) Protein engineers turned evolutionists. *Nat Methods* **4**: 991-994.
- Perez-Martin, J. y de Lorenzo, V. (1996) ATP binding to the sigma 54-dependent activator XylR triggers a protein multimerization cycle catalyzed by UAS DNA. *Cell* **86**: 331-339.
- Peters, J.E., y N.L. Craig. (2001) Tn7: smarter than we thought. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 806-814.
- Phillips, G.J. (2001) Green fluorescent protein a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 9-18.
- Phillips, T.M., Seech, A.G., Lee, H. y Trevors, J.T. (2001) Colorimetric assay for Lindane dechlorination by bacteria. *J Microbiol Methods* **47**: 181-188

Bibliografía

- Prieto, M.A. y García, J.L. (1997) Identification of a novel positive regulator of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **232**: 759-765.
- Raes, J., Foerstner, K.U. y Bork, P. (2007) Get the most out of your metagenome: computational analysis of environmental sequence data. *Curr Opin Microbiol* **10**: 490-498.
- Rajendhran, J. y Gunasekaran, P. (2008) Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnol Adv* **26**: 576-590.
- Ramos, J.L. y Marques., S. (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. *et al.* (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* **56**: 743-768.
- Riesenfeld, C.S., P.D. Schloss y J. Handelsman (2004) Metagenomics: genomic Analysis of Microbial Communities. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 525-53.
- Riether, K.B., Dollard, M.A. y Billard, P. (2001) Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli zntAp::lux* and *copAp::lux*-based biosensors. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**: 712-716.
- Rogers, G.A., Shaltiel, N. y Boyer, P.D. (1976) Facile alkylation of methionine by benzyl bromide and demonstration of fumarase inactivation accompanied by alkylation of a methionine residue. *J Biol Chem* **251**: 5711-5717.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R. *et al.* (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2541-2547.
- Salto, R., Delgado, A., Michán, C., Marqués, S. y Ramos, J.L. (1998) Modulation of the function of the signal receptor domain of XylR, a member of a family of prokaryotic enhancer-like positive regulators. *J Bacteriol* **180**: 600-604.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y T. Maniatis. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A. *et al.* (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**: 687-695.
- Sarand, I., Skarfstad, E., Forsman, M., Romantschuk, M. y Shingler, V. (2001) Role of the DmpR-mediated regulatory circuit in bacterial biodegradation properties in methylphenol-amended soils. *Appl Environ Microbiol* **67**: 162-171.
- Sazinsky, M.H., Bard, J., Di Donato, A. y Lippard, S.J. (2004) Crystal structure of the toluene/o-xylene monooxygenase hydroxylase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. Insight into the substrate specificity, substrate channeling, and active site tuning of multicomponent monooxygenases. *J Biol Chem* **279**: 30600-30610.
- Schloss, P.D. y J. Handelsman. (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* **14**:303-10.
- Schweizer, H.P. (2001) Vectors to express foreign genes and techniques to monitor gene expression in Pseudomonads. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 439-445.
- Schweizer, H.P. y de Lorenzo, V. (2004) Molecular Tools for Genetic Analysis of Pseudomonads. *Pseudomonas*, **1**: 317-349.
- Schweizer, H.P., Hoang, T., Propst, K.L. y Ornelas, H.R. (2001) Vector design and development of host system for *Pseudomonas*. *Gent Eng* **23**:69-81.

- Sepp, A., Tawfik, D.S. y Griffiths, A.D. (2002) Microbead display by *in vitro* compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry. *FEBS Lett* **532**: 455-458.
- Shen, H., Gold, S.E., Tamaki, S.J. y Keen, N.T. (1992) Construction of a Tn7-*lux* system for gene expression studies in Gram-negative bacteria. *Gene* **122**: 27-34.
- Shingler, V. y Pavel, H. (1995) Direct regulation of the ATPase activity of the transcriptional activator DmpR by aromatic compounds. *Mol Microbiol* **17**: 505-513.
- Shingler, V., Bartilson, M. y Moore, T. (1993) Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pV1150 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators. *J Bacteriol* **175**: 1596-1604.
- Shingler, V., Franklin, F.C., Tsuda, M., Holroyd, D. y Bagdasarian, M. (1989) Molecular analysis of a plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. *J Gen Microbiol* **135**: 1083-1092.
- Skärfstad, E., O'Neill, E., Garmendia, J. y Shingler, V. (2000) Identification of an effector specificity subregion within the aromatic-responsive regulators DmpR and XylR by DNA shuffling. *J Bacteriol* **182**: 3008-3016.
- Steele, H.L., Jaeger, K.E., Daniel, R. y Streit, W.R. (2009) Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**: 25-37.
- Stiner, L., y Halverson, L.J. (2002) Development and characterization of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for bioavailable toluene and related compounds. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1962-1971.
- Stocker, J., Balluch, D., Gsell, M., Harms, H., Feliciano, J., Daunert, S. *et al.* (2003) Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environ Sci Technol* **37**: 4743-4750.
- Sullivan, J.P., Dickinson, D. y Chase, H.A. (1998) Methanotrophs, *Methylosinus trichosporium* OB3b, sMMO, and their application to bioremediation. *Crit Rev Microbiol* **24**: 335-373.
- Tecon, R., Wells, M., y van der Meer, J.R. (2006) A new green fluorescent protein-based bacterial biosensor for analysing phenanthrene fluxes. *Environ Microbiol* **8**: 697-708.
- Trun, N., y Trempey, J. (2004) *Fundamental Bacterial Genetics*. Blackwell Publishing
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M. *et al.* (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428**: 37-43.
- Uchiyama, T. y Watanabe, K. (2008) Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening of metagenome libraries. *Nat Protoc* **3**: 1202-1212.
- Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T. y Watanabe, K. (2005) Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat Biotechnol* **23**: 88-93.
- van der Meer, J.R., Tropel, D. y Jaspers, M. (2004) Illuminating the detection chain of bacterial bioreporters. *Environ Microbiol* **6**: 1005-1020.
- Van Dien, S.J. y de Lorenzo, V. (2003) Deciphering environmental signal integration in sigma54-dependent promoters with a simple mathematical model. *J Theor Biol* **224**: 437-449.
- van Sint Fiet, S., van Beilen, J.B. y Witholt, B. (2006) Selection of biocatalysts for chemical synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 1693-1698.

Bibliografía

- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A. *et al.* (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.
- Vidgren, J., Svensson, L.A. y Liljas, A. (1994) Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature* **368**: 354-358.
- Wackett, L.P. (2001) Soil DNA and the microbial metagenome. An annotated selection of World Wide Web sites relevant to the topics in Environmental Microbiology Web alert.. *Environ Microbiol* **3**: 352-353.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. y Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6578-6583.
- Wolber, P.K., Deininger, C.A., Southworth, M.W., Vandekerckhove, J., van Montagu, M. y Warren, G.J. (1986) Identification and purification of a bacterial ice-nucleation protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7256-7260.
- Wootton, J.C. y Drummond, M.H. (1989) The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. *Protein Eng* **2**: 535-543.
- Wyckoff, T.J. y Wozniak, D.J. (2001) Transcriptional analysis of genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Meth Enzymol* **336**: 144-151.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yooseph, S., Sutton, G., Rusch, D.B., Halpern, A.L., Williamson, S.J., Remington, K. *et al.* (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: expanding the universe of protein families. *PLoS Biol* **5**: e16.
- Zhou, F., Olman, V., y Xu, Y. (2008) Barcodes for genomes and applications. *BMC Bioinformatics* **9**: 546.

ANEXO

ANEXO I: Inserción de circuitos genéticos en *E. coli*.

1. Cepas. En la Tabla 11 se detallan las estirpes bacterianas usadas en esta parte del trabajo, así como sus características genotípicas y fenotípicas.

Tabla 11. Cepas de *Escherichia coli* insertadas con circuitos genéticos.

<i>E. coli</i>	Genotipo/fenotipo	Referencia
JS200	Tc ^r ; <i>recA718, polA12 (ts), uvrA155, trpE65, lon-11, sulA</i>	Camps, 2003
XLOLR	Tc ^r , Nx ^r ; $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, <i>endA1, thi1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F', proAB, lacI^q, ZAM15, Tn10] Su^r, λ^r</i>	www.stratagene.com
XL1Blue MRF'	Tc ^r , Nx ^r ; $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, <i>endA1, supE44, thi1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F', proAB, lacI^q, ZAM15, Tn10]</i>	www.stratagene.com
JS-LUX	Tc ^r , Km ^r ; JS200 con el segmento Tn5LUX en el cromosoma	Este trabajo
JS-GFP	Tc ^r , Km ^r ; JS200 con el segmento Tn5GFP en el cromosoma	Este trabajo
JS-LacZ	Tc ^r , Km ^r ; JS200 con el segmento Tn5LacZ en el cromosoma	Este trabajo
XLO-GFP	Tc ^r , Km ^r , Nx ^r ; XLOLR con el segmento Tn5GFP en el cromosoma	Este trabajo
XLO-LacZ	Tc ^r , Km ^r , Nx ^r ; XLOLR con el segmento Tn5LacZ en el cromosoma	Este trabajo
XLB-LUX	Tc ^r , Km ^r , Nx ^r ; XL1BlueMRF' con el segmento Tn5LUX en el cromosoma	Este trabajo
XLB-GFP	Tc ^r , Km ^r , Nx ^r ; XL1BlueMRF' con el segmento Tn5GFP en el cromosoma	Este trabajo
XLB-LacZ	Tc ^r , Km ^r , Nx ^r ; XL1BlueMRF' con el segmento Tn5LacZ en el cromosoma	Este trabajo
JSBx-LUX	Tc ^r , Km ^r , Gm ^r ; JS-LUX con el transposón mini-Tn7, con <i>xylR</i> y <i>Pu-lux</i> , en el cromosoma	Este trabajo
JSBx-GFP	Tc ^r , Km ^r , Gm ^r ; JS-GFP con el transposón mini-Tn7, con <i>xylR</i> y <i>Pu-gfp</i> , en el cromosoma	Este trabajo
JSBx-LacZ	Tc ^r , Km ^r , Gm ^r ; JS-LacZ con el transposón mini-Tn7, con <i>xylR</i> y <i>Pu-lacZ</i> , en el cromosoma	Este trabajo
XLODmpR-LacZ	Tc ^r , Km ^r , Nx ^r , Gm ^r ; XLO-LacZ con el transposón mini-Tn7, con <i>dmpR</i> y <i>Pu-lacZ</i> , en el cromosoma	Este trabajo
XLBDmpR-LacZ	Tc ^r , Km ^r , Nx ^r , Gm ^r ; XLB-LacZ con el transposón mini-Tn7, con <i>dmpR</i> y <i>Pu-lacZ</i> , en el cromosoma	Este trabajo
JSBx-LacZAT7R	Tc ^r , Km ^r , Gm ^r ; JSBx-LacZ sin extremo derecho del mini-Tn7	Este trabajo
XLODmpR-LacZAT7R	Tc ^r , Km ^r , Nx ^r , Gm ^r ; XLODmpR-LacZ sin extremo derecho del mini-Tn7	Este trabajo
XLBDmpR-LacZAT7R	Tc ^r , Km ^r , Nx ^r , Gm ^r ; XLBDmpR-LacZ sin extremo derecho del mini-Tn7	Este trabajo

2. Construcción de cepas informadoras de *E. coli*. Los segmentos Tn5LUX, Tn5GFP y Tn5LacZ fueron insertados en el cromosoma de las cepas *E. coli* JS200, *E. coli* XLOLR, *E. coli* XLIBLue MRF' por conjugación tripartita de los plásmidos pTn5Lux, pTn5GFP o pTn5LacZ. Los exconjugantes se plaquearon en los siguientes medios selectivos. Para *E. coli* JS200 en placas de LB-Agar Tc Km. En el caso de *E. coli* X11Blue MRF' y *E. coli* XLOLR, en placas de LB-Agar con Nx y Km. Una vez seleccionados y reestriados los exconjugantes se comprobó que todos eran resistentes a Km y además sensibles a Ap y así asegurar que el segmento mini-Tn5 hubiese saltado al cromosoma de la cepa receptora. Finalmente y para comprobar que las inserciones fueron efectivas, se hizo una PCR de colonia sobre los distintos exconjugantes usando las parejas de oligos. ResR1F/LUX3R en el caso del segmento Tn5LUX, ResR1F/Gfp t3R para Tn5GFP y ResR1F/Trp2R en el caso de Tn5LacZ. Las cepas así generadas se designaron como *E. coli* JS-LUX, *E. coli* JS-GFP, *E. coli* JS-LacZ, *E. coli* XLO-GFP, *E. coli* XLO-LacZ, *E. coli* XLB-LUX, *E. coli* XLB-GFP y *E. coli* XLB-LacZ.

3. Inserción de reguladores transcripcionales y promotores en cepas informadoras de *E. coli*. La implantación de XylR y DmpR con el promotor *Pu* en cepas informadoras de *E. coli* se hizo por conjugación tripartita. Para ello se movilizaron los vectores pCAC5BxPu y pCAC5DmpRPu en las cepas *E. coli* JS-LUX, *E. coli* JS-GFP, *E. coli* JS-LacZ, *E. coli* XLO-LacZ y *E. coli* XLB-LacZ. A continuación se plaqueó la mezcla de conjugación en los correspondientes medios selectivos. En LB-Agar Tc Gm para las cepas construidas sobre fondo *E. coli* JS200 y en LB-Agar Nx Gm para las cepas en *E. coli* XLOLR y *E. coli* X11BlueMRF'. Los exconjugantes seleccionados fueron reestriados y su resistencia a Gm y sensibilidad a Ap verificada. Para terminar se comprobó por PCR que la inserción del transposón Tn7 había tenido lugar en la orientación deseada usando las parejas de cebadores Pu1F/Lux3R, Pu1F/ Gfpt3R y Pu1F/Trp2R. Las cepas se designaron como *E. coli* JSBx-LUX, *E. coli* JSBx-GFP, *E. coli* JSBx-LacZ, *E. coli* XLODmpR-LacZ y *E. coli* XLBDmpR-LacZ.

4. Eliminación del extremo derecho del transposón Tn7 en las cepas *E. coli* JSBx-LacZ, *E. coli* XLODmpR-LacZ y *E. coli* XLBDmpR-LacZ. Para que las trampas genéticas sean funcionales se necesita activar las fusiones transcripcionales entre los promotores y los distintos genes informadores. Para ello es necesario eliminar el extremo derecho del transposón Tn7. Con el fin de recombinar las secuencias FRT que

flanquean el extremo derecho del transposón Tn7, se expresó la flipasa FLP en estas cepas. Para ello se movilizó el plásmido termosensible pCP20 por conjugación tripartita. A continuación en el caso de *E. coli* JSBx-LacZ la conjugación se plaqueó en un medio selectivo de LB-Agar Km, Cm, X-Gal y *m*-xileno y se creció a 30 °C. Los exconjugantes azules fueron reestriados sucesivamente en LB-Agar Km, X-Gal hasta que se comprobó su sensibilidad a Cm por pérdida del plásmido pCP20. Finalmente la eliminación del extremo derecho del transposón fue comprobada por PCR con los cebadores Pu1F/Trp 2R. Para *E. coli* XLODmpR-LacZ y *E. coli* XLBDmpR-LacZ la conjugación se plaqueó en un medio selectivo^c de Tc, Ap, X-Gal y fenol y se creció a 30 °C. Los exconjugantes fueron reestriados y crecidos a 42 °C para inducir la expresión de la FLP flipasa y la pérdida del plásmido pCP20. Aunque ninguno de los exconjugantes presentaba coloración azul se pudo comprobar por PCR con los oligonúcleotidos Pu1F/Trp 2R que se había perdido el extremo derecho del transposón.

Las cepas sin el extremo derecho del transposón fueron denominadas *E. coli* JSBx-LacZΔT7R, *E. coli* XLODmpR-LacZΔT7R y *E. coli* XLBDmpR-LacZΔT7R y se ensayó su actividad β-galactosidasa en presencia y ausencia de efectores (*m*-xileno y fenol respectivamente). Los resultados demostraron que aunque el extremo derecho del transposón había sido eliminado, la cepa no activaba la fusión *Pu-LacZ* en presencia de efector. Una posible explicación es que los efectores son demasiado tóxicos para estas células de *E. coli* o que estos reguladores transcripcionales en estas estirpes no son igual de funcionales que en otras.

^c Cuando se intentó la eliminación del extremo derecho del mini-Tn7, expresando la flipasa FLP y seleccionando en un medio que contuviese Nx, se observó que en ningún caso la recombinación de las secuencias FRT era efectiva. Una posible explicación a este hecho es que la FLP recombinasa se inhibe por la presencia de Nx, ya que éste tiene una alta homología estructural con la camptotecina que es un inhibidor de esta proteína (Frøhlich *et al.*, 2001).

Anexo II: Interacción entre bromuro de bencilo y la proteína de fusión MBP-XylR.

Para confirmar que existe una interacción entre XylR y bromuro de bencilo como se muestra en Resultados 6.1, se repitieron los ensayos de registro de actividad β -galactosidasa de la cepa de *E.coli* CC118 *Pu-lacZ* cuando expresaba XylR. En este caso, XylR en su forma nativa (pCON916) y también como una proteína de fusión N-terminal con la proteína de unión a maltosa (pMalC2T-XylR). Se comprobó que en las condiciones de ensayo, tanto la proteína XylR silvestre como la proteína de fusión MBP-XylR eran activas en presencia de *m*-xileno (Fig. 37A). A continuación se ensayó la actividad β -galactosidasa en presencia y ausencia de Br[^]Ph usando como control la cepa MC4100 [MAD2]; (Fig. 37B).

Al igual que ocurría con la proteína XylR-His la actividad de MBP-XylR es inferior a la de la proteína silvestre probablemente debido a que en el extremo N-terminal está fusionada la proteína MBP, lo que puede afectar a la unión del efector.

Estos resultados confirmaron que al igual que en los casos de XylR y XylR-His, el bromuro de bencilo parece interaccionar con la fusión MBP-XylR. Para confirmar si la interacción también tenía lugar en el mismo dominio se hicieron ensayos de actividad β -galactosidasa exponiendo la proteína de fusión a distintas condiciones de presión de vapor de *m*-xileno y Br[^]Ph (Fig. 38).

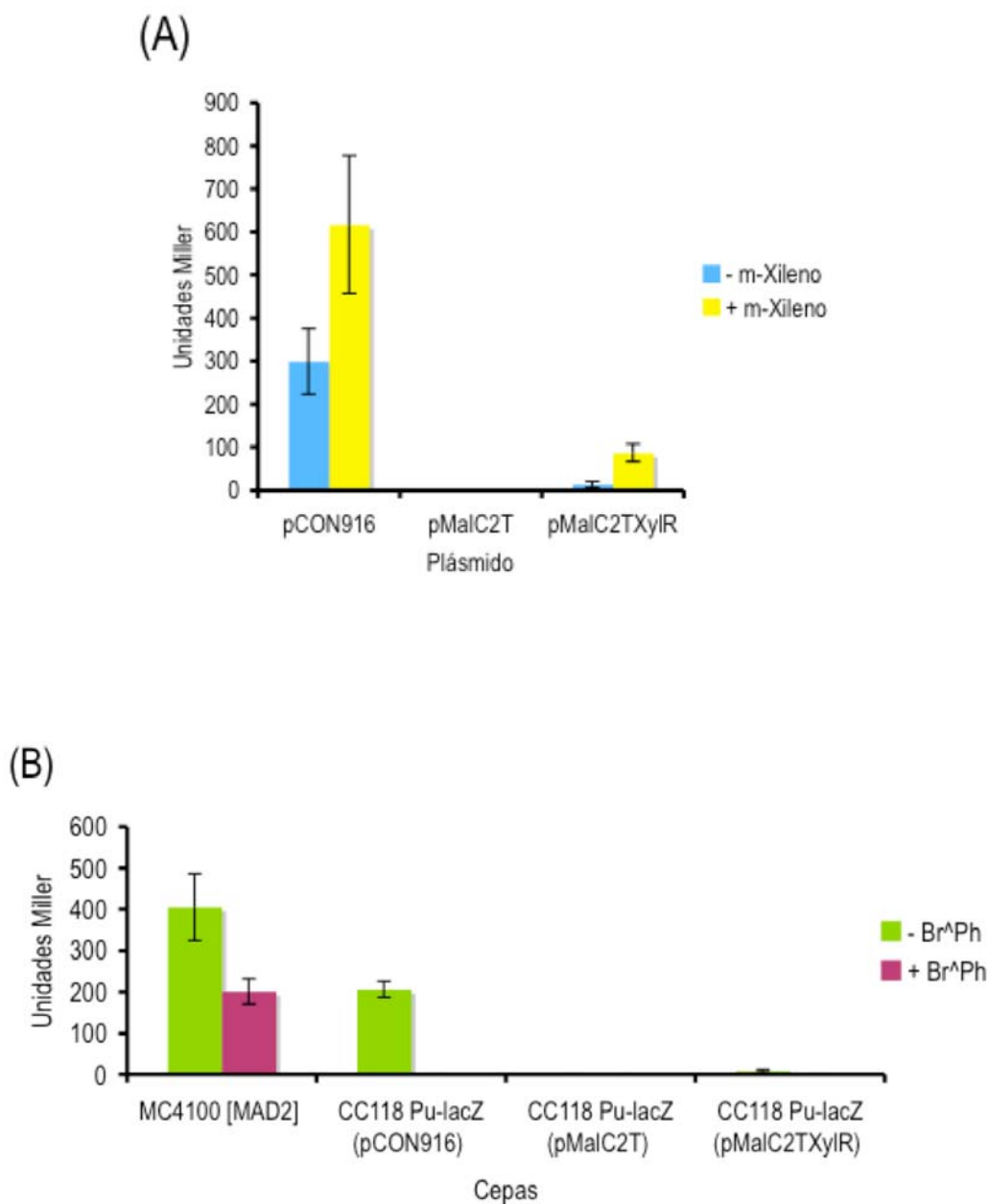


Fig. 37. Evidencias *in vivo* de la interacción de XylR y MBP-XylR con *m*-xileno y bromuro de bencilo. (A) Actividad β -galactosidasa de *E. coli* CC118 *Pu-lacZ* en presencia y ausencia de *m*-xileno con los plásmidos pCON916 (XylR silvestre), pMalC2T (MBP) y pMalC2TXyIR (MBP-XylR). (B) Actividad β -galactosidasa registrada en ausencia y presencia de Br^{Ph} de la cepa *E. coli* MC4100 [MAD2] (XylR Δ A) y las cepas *E. coli* CC118 *Pu-lacZ* con pCON916, pMalC2T y pMalC2TXyIR.

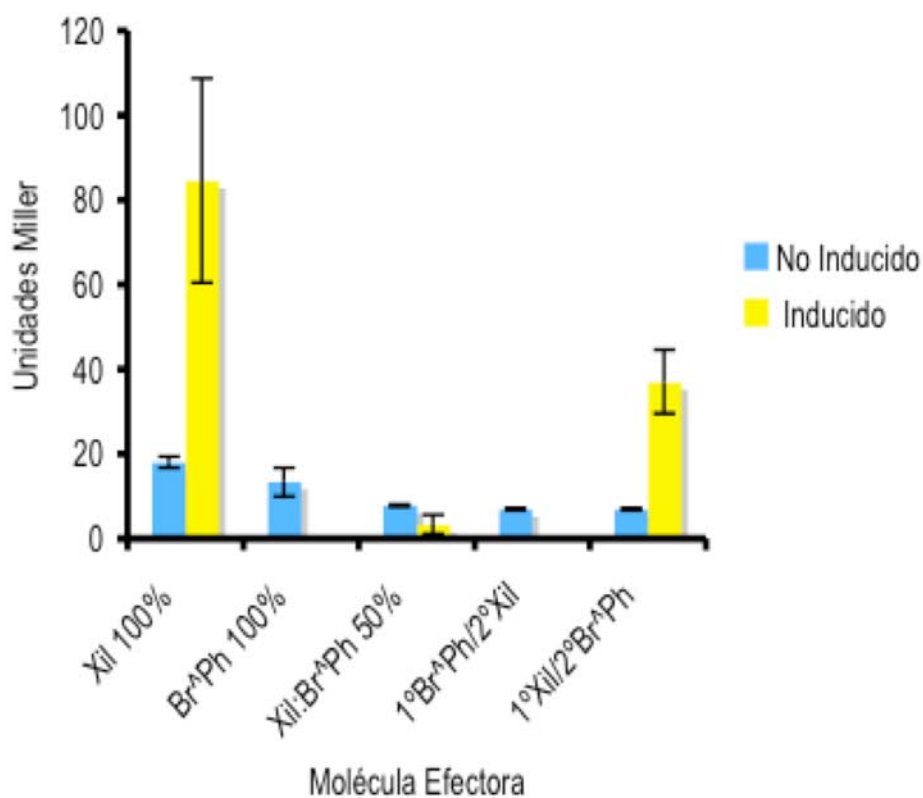


Fig. 38. Actividad β -galactosidasa de la cepa *E. coli* CC118 *Pu-lacZ* (pMalC2TXylR) en distintas condiciones de exposición a *m*-xileno y Br^{Ph}. Esta cepa expresa la proteína de fusión MBP-XylR. Las condiciones de exposición a *m*-xileno y Br^{Ph} se detallan en el apartado 14 de Materiales y Métodos.

En resumen, todos estos datos confirmaron que XylR interacciona con bromuro de bencilo como se ha podido comprobar con las variantes MBP-XylR, XylR-His y XylR silvestre.