

3000

Q639414

C/2754

B-

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Dept. de Biología Molecular

MECANISMOS DE AJUSTE METABÓLICO DE LA
RUTA TOL DEL PLÁSMIDO pWW0 EN *Pseudomonas*
putida KT2440

Tesis Doctoral

Reg. F.C. 34072



Francisco Velázquez Duarte
Madrid, 2004

UNIVERSIDAD AUTONOMA MADRID
REGISTRO GENERAL

Entrada 01 Nº. 200400013949
14/06/04 16:56:29

Memoria presentada por Francisco Velázquez Duarte
para optar al grado de Doctor en Ciencias, por la
Universidad Autónoma de Madrid.

Director de Tesis.

Dr. Victor de Lorenzo Prieto.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Para la consecución de este trabajo ha sido inestimable la participación de muchísimas personas, a todas ellas mi mas sincero agradecimiento; sin menoscabo de los ausentes, me gustaría personalizar y agradecer :

Al Doctor Victor de Lorenzo, por acogerme en su laboratorio, y apoyarme hasta el último minuto. Por todo lo que he aprendido con él, y por como me lo ha enseñado.

Al Doctor G^a del Portillo por aceptar ser mi tutor de la Universidad

A Alonso, por la paciencia, la impaciencia y la ciencia que ha compartido conmigo.

To Doctor Zylstra for the american experience.

To Doctor Stratz for the german experience.

Al laboratorio de Ecología Molecular del Centro de Astrobiología, por la experiencia extraterrestre.

Al Doctor Toser por el anticuerpo anti-bpHC

A todos los miembros del 212, a los que están y a los que han estado durante este tiempo.

A todos los miembros de otros laboratorios que han compartido conmigo este trabajo, especialmente, al 213 y 216.

A Ilaria di Bartolo, por su trabajo con los mutantes del metabolismo de *P. putida*, y por acercarme a otros laboratorios.

A Marc Valls, por su trabajo con los *arrays* de *P. putida* y mas cosas.

A Tatiana, Wancho, Luisma, Elia,...a Lolo, Jose,... y ya esta.

ABREVIATURAS

aa:	Aminoácidos
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AMPc:	Adenosín nucleótido monofosfato cíclico
Ap:	Ampicilina
ARN:	Ácido ribonucleico
ATP:	Adenosín nucleótido trifosfato
Caa:	Casaminoácidos
CDS:	En una ORF, la secuencia codificante para una proteína
Cm:	Cloramfenicol
DEPC:	Dietil-pirocarbonato
DO:	Densidad óptica
ED:	Ruta Entner-Doudorouff
EM:	Ruta Embden-Meyerhof
GMPC:	Guanosin nucleótido monofosfato cíclico
IHF:	Factor de integración del hospedador
IPTG:	Isopropil- β -D-tiogalactósido
Km:	Kanamicina
kb:	kilobase
ORF:	Pauta abierta de lectura
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP:	Fosfoenolpiruvato
(p)ppGpp:	penta- o tetra-fosfato de guanosina
PTS:	Del inglés <i>Phosphoenol pyruvate: carbohydrate transferase system</i> . Sistema de transporte de azúcares dependiente de PEP
PHAs:	Poli-hidroxi-alcanoatos.
SDS/PAGE:	Separación de proteínas por electroforesis desnaturizante
Sm:	Estreptomina
Succ:	Succinato
Tel:	Telurito

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	
1.1	La integración de las rutas biodegradativas en el metabolismo general de la célula	1
1.1.1	Regulación específica y global de rutas biodegradativas	1
1.1.2	La inhibición por fuente de carbono alternativa y el sistema PTS	4
1.2	<i>Pseudomonas</i> como modelo para el estudio de rutas catabólicas	9
1.2.1	La ruta TOL del plásmido pWW0	10
1.2.1.1	Regulación específica de la ruta TOL del plásmido pWW0	11
1.2.1.2	Regulación fisiológica de la ruta TOL del plásmido pWW0	13
2	OBJETIVOS	18
3	MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1	Cepas y plásmidos	19
3.2	Medios y condiciones de cultivo	22
3.3	Visualización de PHAs	23
3.4	Metodologías genéticas	23
3.4.1	Técnicas generales	23
3.4.2	Construcción de mutantes nulos en la cepa <i>P. putida</i> MAD2	24
3.5	Metodologías para el tratamiento de proteínas	29
3.5.1	Técnicas generales	29
3.5.2	Cálculo de actividad β -galactosidasa	29
3.5.3	Ensayo catecol 2,3 dioxigenasa	29
3.6	Protocolo seguido en los experimentos con <i>arrays</i> de ADN	30
3.6.1	Condiciones de cultivo	30
3.6.2	Extracción de ARN	31
3.6.3	Marcaje del ARN, hibridación y lectura del <i>array</i>	31
3.6.4	Tratamiento de las imágenes y de los datos generados	32
4	RESULTADOS	
4.1	El sistema PTS en <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	33

4.1.1	Análisis <i>in silico</i> del genoma de <i>P. putida</i> KT2440	33
4.1.2	Análisis de las funciones celulares del sistema PTS	37
4.1.2.1	Utilización de la fructosa como única fuente de carbono y energía	37
4.1.2.2	Papel de PtsP en la síntesis de PHA	37
4.2	Represión por fuente de carbono	38
4.2.1	El sistema PTS y el promotor <i>Pu</i>	38
4.2.2	Metabolismo de azúcares en <i>P. putida</i>	39
4.2.3	<i>cyoB</i> y <i>crc</i> en la represión por glucosa del promotor <i>Pu</i>	42
4.2.4	<i>eda</i> y <i>fda</i> en la represión por glucosa del promotor <i>Pu</i>	42
4.3	Efecto de diferentes sustratos de la ruta TOL de <i>P. putida</i> pWW0	44
4.3.1	Inductores de la ruta <i>upper</i> : <i>m</i> -xileno, 3-metil-bencilalcohol	45
4.3.2	Inducción de la ruta <i>meta</i>	48
4.3.3	Regulación cruzada de las ramas <i>upper</i> y <i>meta</i>	48
4.4	Efecto de distinto tipo de estreses en la expresión de la ruta TOL	51
4.4.1	Efecto del estrés nutricional	51
4.4.2	Efecto del estrés ambiental	53
4.4.2.1	Estrés provocado por tóxicos	53
4.4.2.2	Un estresante natural: vertido de fuel	55
5	DISCUSIÓN	
5.1	El sistema PTS en <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	60
5.2	La represión por fuente de carbono sobre el promotor <i>Pu</i>	62
5.2.1	Papel de PTS	62
5.2.2	Metabolismo de azúcares: <i>fda</i> , <i>eda</i> <i>cyoB</i> y <i>crc</i>	63
5.3	Respuesta de <i>P. putida</i> (pWW0) a inductores de la ruta TOL	65
5.3.1	Inducción de la ruta <i>upper</i> : <i>m</i> -xileno y 3-metil-bencilalcohol	66
5.3.2	Inducción de la ruta <i>meta</i>	67
5.3.3	La cascada de regulación del promotor <i>Pm</i>	67
5.4	Respuesta de <i>P. putida</i> (pWW0) a estreses ambientales	68
5.4.1	El metabolismo y las condiciones ambientales	68
5.4.2	Un contaminante complejo: el fuel	69
6	CONCLUSIONES	71

7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8	ANEXO 1	88
9	ANEXO 2	100

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La integración de las rutas biodegradativas en el metabolismo general de la célula

Los microorganismos en general, y las bacterias en particular, poseen una gran variedad de reacciones enzimáticas y rutas metabólicas, que les ha permitido colonizar ambientes muy diversos y usar como fuente de alimento casi cualquier compuesto del panorama químico (Madigan *et al.*, 2003; Varnam, 2000). Esto representa una ventaja evolutiva para el organismo. Los microorganismos poseen un papel principal en el proceso de mineralización de la materia orgánica. Los microorganismos bien usando bien modificando rutas previas son capaces de mineralizar o transformar compuestos recalcitrantes. Esto resulta cierto incluso para compuestos derivados de la actividad humana a los que nunca antes se han enfrentado en el medio ambiente; esta versatilidad metabólica les ha convertido hasta el momento en los agentes preferidos como catalizadores en la mayoría de procesos de interés biotecnológico (Demain and Davies, 1999). De muchos microorganismos poseemos profundos conocimientos gracias a que son manejables en el laboratorio y han sido objeto de estudio. Estos conocimientos sobre su fisiología y genética han hecho posible que podamos utilizarlos para la producción de sustancias de alto valor añadido (Demain and Davies, 1999), o bien para la eliminación de compuestos tóxicos del medio ambiente (Timmis *et al.*, 1994). Con el uso de diversas herramientas genéticas en estos organismos podemos manipular la expresión de genes, propios o de otros organismos, o hacer que la célula destine mas recursos energéticos en una función metabólica concreta. Pero en general estas manipulaciones son solo viables en condiciones de cultivo de laboratorio, o biorreactores controlados (Diaz and Prieto, 2000).

1.1.1 Regulación específica y global de rutas biodegradativas

En numerosos trabajos se han logrado bacterias con capacidades metabólicas nuevas o mejoradas (Bongaerts *et al.*, 2001; Buhler *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003; Gruenewald *et al.*, 2004; Hollmann *et al.*, 2003; Kyla-Nikkila *et al.*, 2000; Morrissey *et al.*, 2002; Spain *et al.*, 2003; van Beilen *et al.*, 2003; van Beilen *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2001). Pero estas capacidades deben actuar en armonía con el resto del

metabolismo celular para evitar gastos superfluos de recursos que pudieran afectar el ajuste al nicho ecológico o comprometer su supervivencia. Para ello las bacterias han desarrollado mecanismos de regulación que permiten modular la expresión de estas capacidades en función de las condiciones internas y externas (Fig. 1) (Shingler, 2004). Estos mecanismos representan un freno en el diseño de estrategias para el uso de microorganismos en condiciones de cultivo no controladas. La mayor parte de las rutas de degradación de compuestos recalcitrantes solo son expresadas cuando los substratos de la ruta se encuentran presentes, evitando así el gasto de unos recursos que no tendría su compensación. Este tipo de regulación suele depender de un regulador asociado a de la ruta, y constituye un tipo de regulación específica de esta (Gerischer, 2002). Como se discutirá mas adelante en este trabajo la expresión de las rutas de degradación de tolueno y compuestos similares depende de la activación de un regulador que responde a substratos de la ruta. Este regulador, XylR, es capaz de disparar la expresión de la ruta solo cuando reconoce al compuesto en el medio; cuando el compuesto ha sido completamente degradado y desaparece, el regulador vuelve a ser inactivo y la ruta es silenciada. Esto asegura a la célula ahorrar recursos de la expresión de una ruta que no va a ser utilizada. A esta regulación específica se le une una regulación general que conecta el metabolismo especializado de la ruta con el estado general de la célula y su estatus energético. Este otro tipo de regulación depende de muchos factores y esta mediado por mecanismos de regulación global de la célula que afectan a muy diversos procesos celulares (Gerischer, 2002; Shingler, 2004). Esta regulación global aporta los elementos necesarios para ajustar el metabolismo a las señales ambientales. En este sentido podemos encontrar respuestas celulares a variaciones en la temperatura (Arsene *et al.*, 2000; Bukau, 1993; Tatsuta *et al.*, 1998; Tomoyasu *et al.*, 1998), presencia de otros organismos (Saikaly and Oerther, 2004), aumento de su propia población (Gonzalez and Marketon, 2003; Podbielski and Kreikemeyer, 2004; Winzer *et al.*, 2003), o también a la variación de la concentración de nutrientes, a la velocidad de crecimiento (Chatterji and Ojha, 2001; Hilbert *et al.*, 2004; Madhusudhan *et al.*, 2003), etc.

El Dilema Fisiológico

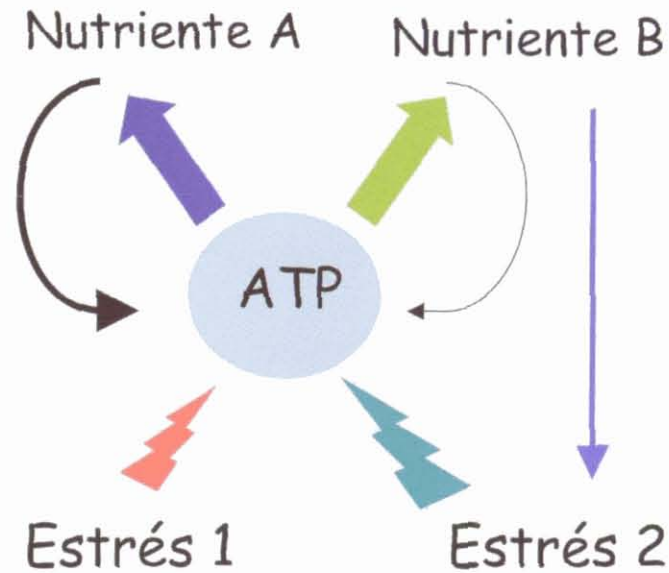


Figura 1. Representación del dilema que se le presenta a un microorganismo cuando tienes varias fuentes de carbono; y de cómo las condiciones ambientales pueden influir en la decisión final.

Para elaborar esta respuesta los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos que se basan en sistemas traductores de señales. Así la célula debe notar que hay una bajada en los niveles de un nutriente y traducir esto en una señal citoplásmica que sea reconocida por aquellos procesos metabólicos que deben ajustarse a las nuevas condiciones; esto incluye el buscar alternativas metabólicas o sintetizar transportadores para ese nutriente. Para ajustarse a las nuevas condiciones, los diversos procesos se regulan a muy diversos niveles; de este modo se pueden encontrar mecanismos de regulación a nivel de actividades enzimáticas, enzimas que se activan o inactivan en respuesta a cambios ambientales (Bonnemain *et al.*, 2004; Yamazaki *et al.*, 2003); regulación a nivel de la estabilidad del ARN mensajero, variando esta en función de los requerimientos celulares (Carrier and Keasling, 1997; Leroy *et al.*, 2002; Regnier and Arraiano, 2000); también existen mecanismos basados en la modulación de la traducibilidad del mensajero (Storz *et al.*, 2004), regulación a nivel de la estabilidad de la proteína etc. Todas las etapas del proceso de expresión de un gen son susceptibles de ser objeto de regulación.

Una de las etapas más finamente regulada es la iniciación de la transcripción, tal vez por ser el primer paso en la expresión de un gen. La célula utiliza para la mayoría de los genes promotores cuya transcripción está dirigida por el factor $\sigma 70$, pero existen conjuntos específicos de genes cuya transcripción depende, al menos en parte, de otros factores sigmas alternativos (Gruber and Gross, 2003; Laurie *et al.*, 2003; Manganelli *et al.*, 2004; Nies, 2004); esto permite a la célula usar estos factores sigmas alternativos frente a diferentes señales para activar así un conjunto de genes que le permita ajustarse a las nuevas condiciones ambientales. En este contexto se han descrito factores sigmas alternativos para respuesta a choque térmico, para la asimilación de nitrógeno, la síntesis del flagelo, procesos de esporulación, etc. La célula, regulando la proporción de ARN polimerasa que se encuentra asociada a cada factor sigma, puede variar el conjunto de genes expresados, lo que se ha constituido un fenómeno regulador denominado competición de sigmas (Jishage *et al.*, 2002).

1.1.2 La inhibición por fuente de carbono alternativa y el sistema PTS

Quizás el fenómeno de control global mejor conocido es la regulación que sufren rutas catabólicas en presencia de otras fuentes de carbono alternativas (Bruckner and Titgemeyer, 2002; Neidhardt, 1987). En este fenómeno la fuente de carbono preferida desencadena una señal que lleva a la represión del metabolismo de otras fuentes de carbono. El caso de la represión por glucosa del metabolismo de otros azúcares en *E. coli* es paradigmático. En este caso, cuando *E. coli* se encuentra en el medio de cultivo glucosa, no se sintetizan ni los transportadores ni los genes del metabolismo de otros carbohidratos, como el manitol o la fructosa, aunque estos se encuentren presentes en el medio (Saier and Reizer, 1994). El sistema PTS (de *phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system*) proporciona gran parte de las bases moleculares de la traducción de señales desencadenadas durante este control fisiológico ejercido sobre el metabolismo de azúcares en *E. coli* (Postma *et al.*, 1993). El sistema PTS es una cadena de fosfotransferasas, descrita en bacterias y que aunque se le ha relacionado con diversos procesos metabólicos (Postma *et al.*, 1993; Saier and Reizer, 1994), tiene como principal función el transporte y fosforilación de azúcares. El esquema básico del sistema PTS consta de tres elementos: enzima I (EI), HPr (de *histidine containing protein*) y enzima II (EII) (Postma *et al.*, 1993; Saier and Reizer, 1994).

El enzima I toma el grupo fosfato del fosfoenol piruvato, y se lo transfiere a HPr; este a su vez a un dominio de la enzima II, denominado EIIA, que lo transfiere a su vez a otro dominio EIIB que lo transfiere finalmente al azúcar que es transportado al citoplasma por el dominio EIIC. Estos dominios de EII pueden aparecer bien juntos en un solo polipéptido, como en el caso del EII de manitol de *E. coli*, o se pueden presentar alguno de los dominios como polipéptido independiente como en el caso de EIIA y EIIBC de glucosa (Fig. 2) (Saier and Reizer, 1994; Tchieu *et al.*, 2001).

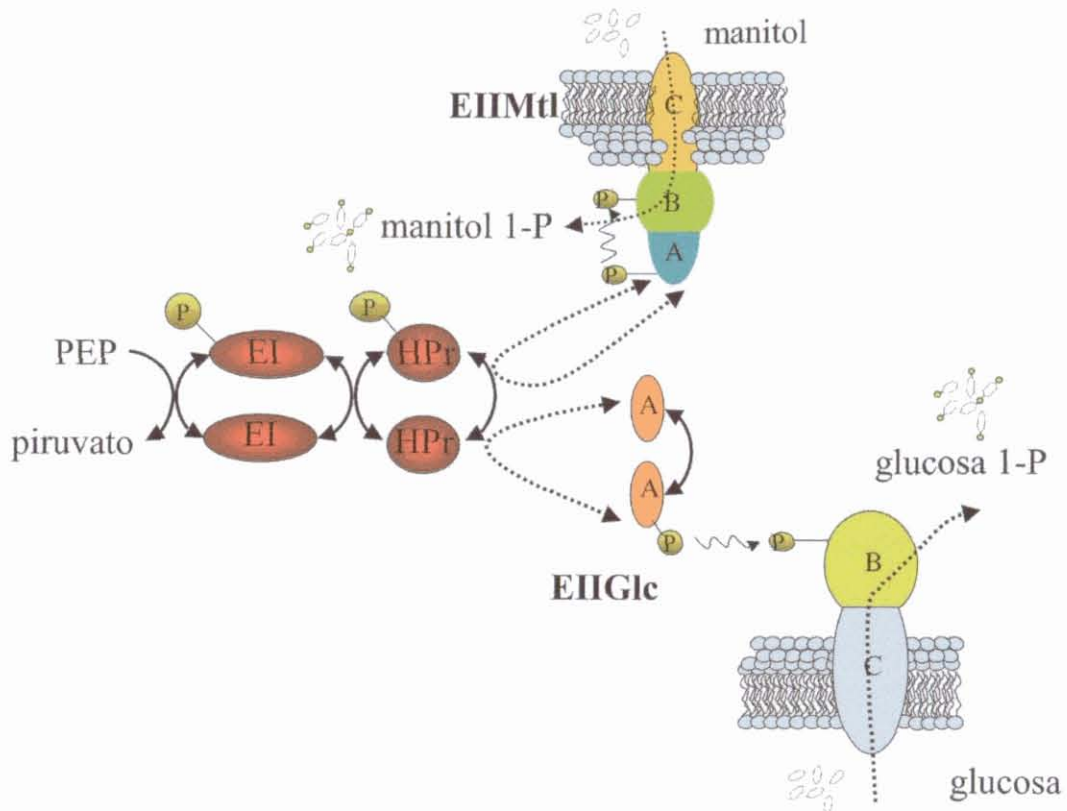


Figura 2. Esquema del funcionamiento general del sistema PTS. El primer componente de la cascada de fosfotransferasas (EI) toma el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato, y lo transfiere al segundo componente (HPr); este lo transfiere a los distintos EII específicos para cada azúcar. Este tercer elemento se puede presentar como un solo polipéptido, como el caso del EII para manitol, o en diferentes como el EII para glucosa. Los EII reciben el fosfato en un dominio llamado EIIA, que lo transfiere al EIIB, que lo transfiere al azúcar que es transportado por el EIIC. Figura modificada de Postma, P.W. (Postma *et al.* 1993).

Mientras que las proteínas EI y HPr son generales, es decir participan en el transporte de todos los azúcares que son incorporados vía PTS, las proteínas EII son específicas para cada azúcar; existiendo un EII para el manitol, glucosa, fructosa y así sucesivamente para todos los azúcares transportados por el sistema PTS. Las reacciones de fosfotransferencia entre las proteínas PTS son reversibles, estableciéndose un equilibrio entre las formas fosforiladas y no fosforiladas de cada

componente de la cascada en función de la tasa de transporte de azúcares en cada momento (Fig. 3). De este modo el transporte de glucosa provoca una acumulación relativa de las formas no fosforiladas del EII específico para glucosa y de las proteínas EI y HPr, al actuar la glucosa como sumidero del grupo fosfato.

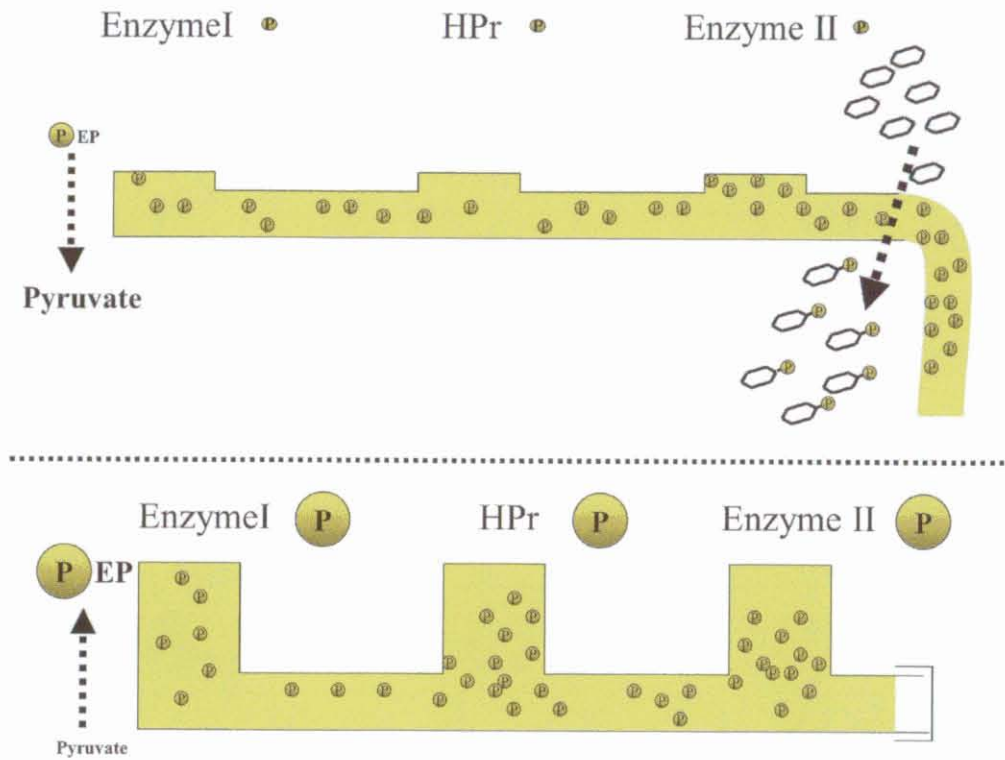


Figura 3. Flujo del grupo fosfato que se establece en el transporte de azúcares vía PTS como consecuencia de la reversibilidad de las reacciones de fosfotransferencia. Cuando un azúcar es transportado vía PTS este produce un descenso relativo de las formas fosforiladas de los elementos EI y HPr generales, y del EII específico de su transporte. Al desaparecer el azúcar, se produce a su vez una acumulación de las formas fosforiladas. Esquema inspirado en Postma (Postma *et al.* 1993)

De la misma forma la ausencia del transporte de azúcares produce una acumulación de las formas fosforiladas. Mediante este mecanismo la célula traduce la presencia/ausencia de azúcares en el medio en variaciones de la concentración de las formas fosforiladas de las proteínas PTS. De este modo la presencia de glucosa es señalizada hasta los promotores de los genes responsable del metabolismo de otros azúcares. Por un lado la forma no fosforilada del EIIA específico para la glucosa, inhibe alostéricamente a las permeasas de otros azúcares, produciéndose una exclusión de su transporte, que no activan por tanto a los reguladores específicos de su metabolismo. Por otro lado el transporte de glucosa provoca un descenso de las formas fosforiladas

de EI y HPr, que son necesarias para el transporte de otros azúcares. Finalmente la expresión de los genes responsables del metabolismo de otros azúcares, es dependiente de la proteína CAP (de *cyclic AMP acceptor protein*) que requiere de la unión de AMPc para activar la expresión de estos genes. La forma fosforilada del EIIA de glucosa es un activador de la adenilato ciclasa, por tanto al producirse un descenso de la forma fosforilada de EIIAGlc se produce un descenso de los niveles intracelulares de AMPc, lo que se traduce en una inhibición de la expresión de otros genes para el metabolismo de azúcares (Fig. 4).

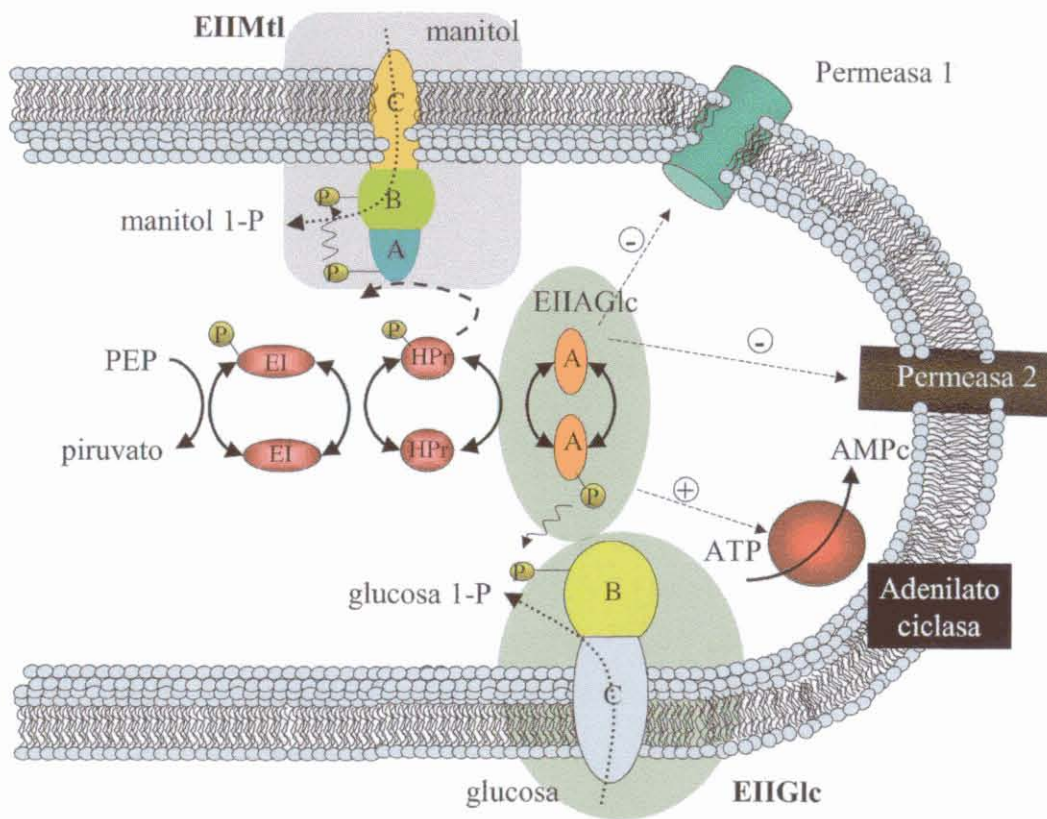


Figura 4. Esquema del mecanismo de señalización de la presencia de glucosa en el medio y su efecto sobre el transporte y metabolismo de otros azúcares en *E.coli*. La entrada de glucosa se traduce en un descenso de la forma fosforilada de EIIAGlc, y por tanto una desactivación de la adenilato ciclasa; el aumento relativo de la forma desfosforilada de EIIAGlc produce una inhibición alostérica de las permeasas de otros azúcares; la exclusión de estos del citoplasma impide la activación de los reguladores específicos de los genes responsables de su metabolismo.

Como se observa en este caso, a diferencia de la regulación específica, el control global de rutas metabólicas involucra a muchas proteínas, el sistema PTS, las permeasas, la adenilato ciclasa, CAP, etc., y afecta a muchos procesos celulares, transporte y metabolismo de azúcares, además de otros procesos que se ven afectados

por las variaciones de la concentración de AMPc (Busby and Ebright, 1999; Gosset *et al.*, 2004; Kolb *et al.*, 1993).

Este sistema es usado por *E. coli* para aprovechar nutrientes mas ricos que permiten mayores tasas de crecimiento. Esto puede representar una ventaja en escenarios naturales donde *E. coli* tiene que competir con otros organismos; el usar exclusivamente las fuentes mas ricas permite un aumento de la población mas rápido y poder colonizar antes un nicho. Este razonamiento puede extenderse a otros fenómenos de control global aunque el fenómeno de represión por fuente de carbono no se presenta siempre con las mismas características que en *E. coli*. Así nos encontramos que en *Pseudomonas aeruginosa*, el transporte de manitol se encuentra inhibido cuando existe succinato presente en el medio (Collier *et al.*, 1996; Collier *et al.*, 2001; Wolff *et al.*, 1991). En este caso el succinato es la fuente de carbono preferida y en su presencia el metabolismo del manitol esta inhibido. De forma similar la ruta de degradación de alcanos de *P. putida* GPo1 es reprimida en presencia de lactato o succinato (Yuste *et al.*, 1998; Yuste and Rojo, 2001). El sentido biológico de la represión por fuentes de carbono alternativas de rutas especializadas como esta aparece si cabe mas clara ya que generalmente el coste energético neto que suponen en comparación con otras fuentes de carbono es muy alto. En este sentido se ha propuesto en algunos casos parece que la degradación de sustancias, que son además tóxicos, tiene una función protectora que resulta a veces mas importante que la propia contribución al crecimiento que pueda tener (Ramos *et al.*, 2001). Se han descrito numerosas rutas de degradación de compuestos recalcitrantes (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de rutas catabólicas de compuestos recalcitrantes descritas

CEPA	COMPUESTO	Referencia
<i>P. putida</i> mt-2 (pWW0)	Tolueno	(Assinder and Williams, 1990)
<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 (pVII150)	Fenol	(Shingler <i>et al.</i> , 1992)
<i>Burkholderia</i> sp. RP007	Fenantreno	(Laurie and Lloyd-Jones, 1999)
<i>P. putida</i> TMB	Trimetilbenceno	(Bestetti and Galli, 1987)
<i>P. putida</i> NAH (NAH7)	Nafataleno	(Sanseverino <i>et al.</i> , 1993)
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	Aril ésteres	(Jones <i>et al.</i> , 1999)

<i>Ralstonia eutropha</i> (pJP4)	Ácido 2,4 difenoxiacético	(Trefault <i>et al.</i> , 2004)
<i>Pseudomonas sp.</i> (pP51)	Triclorobenceno	(van der Meer <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. putida</i> UCC22 (Ptdn1)	Anilina	(Fukumori and Saint, 1997)
<i>P. oleovorans</i> (pOCT)	Alcanos	(van Beilen <i>et al.</i> , 1992)
<i>B. cepacia</i> LB400	Bifenilo, PCBs	(Mondello, 1989)
<i>Pseudomonas sp.</i> VLB120	Estireno	(Panke <i>et al.</i> , 1998)

Muchas de estas rutas tienen al género *Pseudomonas* y especies relacionadas como hospedador, esto junto con su fácil manejo en el laboratorio y la abundancia de herramientas genéticas y moleculares ha convertido a este género en uno de los modelos favoritos de estudio de estas rutas.

1.2 *Pseudomonas* como sistema modelo para el estudio de rutas catabólicas

El género *Pseudomonas* destaca por su gran versatilidad metabólica, lo que le permite usar una gran variedad de compuestos como fuentes de carbono y energía. Entre estos compuestos se encuentran especies químicas altamente tóxicas (Timmis *et al.*, 1994). Algunas de esta representan un problema de contaminación en nuestra sociedad, al haber sidos producidos y liberados al medio ambiente en grandes cantidades como consecuencia de la actividad industrial. Por su potencial en bio-remediación varias especies de este género han sido objeto de estudio; se ha logrado acumular un profundo conocimiento de su fisiología y el desarrollo de numerosas herramientas genéticas (de Lorenzo and Timmis, 1994; Schweizer and de Lorenzo, 2004). Este interés se ha trasladado en proyectos de secuenciación del genoma de varias especies entre ellas *Pseudomonas putida* KT2440, objeto de este estudio.

La genómica se ha convertido en un importante campo emergente dentro del estudio de microorganismos como consecuencia del aumento de los proyectos de secuenciación (Casjens, 2003; Chalker and Lunsford, 2002; Cole and Buchrieser, 2001; Donadio *et al.*, 2002; Fritz and Raczniak, 2002; Sampson *et al.*, 2003; Suerbaum *et al.*, 2002). La disponibilidad de la secuencia genómica permite por un lado explorar, con las herramientas bioinformaticas adecuadas, las posibilidades que presenta un organismo para desarrollar un proceso. Realizar comparaciones sobre la proporción de genes implicados en cada función celular así como las diferencias y

similitudes que presenta con otros microorganismos. Pero mas allá de la información contenido en la propia secuencia, el conocimiento de la secuencia genómica facilita el uso de tecnologías de laboratorio a escala genómica; la tecnología de los *arrays* de ADN es una de estas tecnologías. El potencial de esta tecnología se basa en la capacidad de monitorizar un gran numero de genes al mismo tiempo. Los *arrays* de ADN están siendo utilizado para una gran diversidad de estudios, pero sigue siendo el estudio de las variaciones de los niveles de mensajero la utilización mas extendida (Anderton *et al.*, 2004; Hu and Coates, 2001; Rudi *et al.*, 2003). En función de la pregunta biológica que se quiere abordar varían los diseños de los *arrays* y el tipo de experimentos utilizados. Así si se quiere ver que genes participan de un proceso importante, como genes implicados en la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de *Azotobacter*, o genes implicados en la formación de biofilm en *P. aeruginosa*, se opta por la utilización de *arrays* de ADN que monitoricen todas las ORFs del organismo en cuestión (Whiteley *et al.*, 2001). Si se quiere determinar variaciones en la composición la flora bacteriana de un suelo a lo largo de un periodo de tiempo, se diseñará un *array* que sea capaz de discriminar entre un genero y otro, colocando genes o grupos de genes cuyo patrón sea diferente en cada caso (Loy *et al.*, 2002). Durante el desarrollo de este trabajo se ha completado la secuencia del genoma de *P. putida* KT2440 lo que ha permitido el desarrollo de esta tecnología en el contexto de esta investigación (Nelson *et al.*, 2002; Stjepandic *et al.*, 2002; Weinel *et al.*, 2002).

1.2.1 La ruta TOL del plásmido pWW0

P. putida KT2440 es una cepa derivada de un aislado natural *P. putida* mt-2 (Bagdasarian *et al.*, 1981; Regenhardt *et al.*, 2002), en la que se ha curado el megaplásmido pWW0. La cepa *P. putida* mt-2 posee la capacidad de crecer con tolueno, *m*-, *p*- xileno como única fuente de carbono y energía; se aisló en virtud de su capacidad de degradar *meta*-toluato. Estas capacidades se encuentran codificadas en el plásmido pWW0. Como se muestra en la Figura 5, la ruta TOL codificada en este plásmido consta de cuatro unidades transcripcionales: dos operones metabólicos (*upper* y *meta*), y dos que codifican reguladores transcripcionales (*xylR* y *xylS*) responsables respectivamente de la transcripción de los operones catabólicos. Numerosos trabajos han tenido como objeto el estudio de esta ruta catabólica, lo que ha permitido profundizar sobre los circuitos de regulación que modulan la expresión

de esta ruta (Assinder and Williams, 1990; Greated *et al.*, 2002; Marques and Ramos, 1993; Marques *et al.*, 1993; Marques *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 1987).

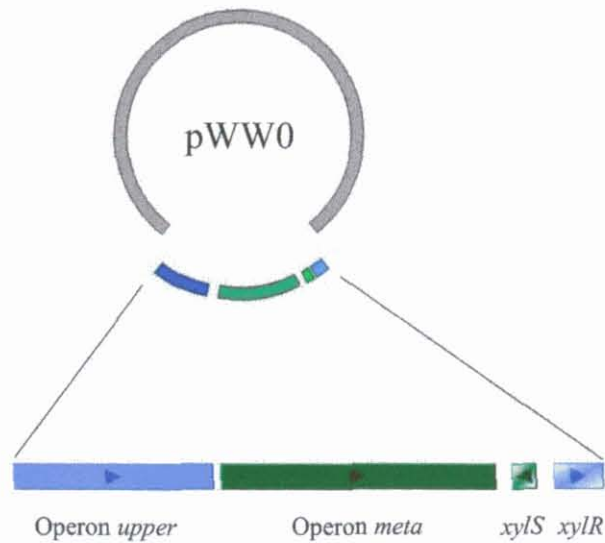


Figura 5. Esquema de las unidades transcripcionales de la ruta TOL del plásmido pWW0. La ruta TOL del plásmido pWW0 presenta cuatro unidades transcripcionales: dos operones catabólicos, y dos que codifican reguladores transcripcionales.

1.2.1.1 Regulación específica de la ruta TOL del plásmido pWW0

P. putida es capaz de crecer con tolueno *m*-, *p*-xileno cuando porta algunos de los plásmidos TOL. El plásmido TOL pWW0 permite la completa mineralización de estas especies químicas y su uso como única fuente de carbono y energía. Como reflejo de la organización genética la ruta TOL se divide en dos etapas, una primera, *upper*, consiste en la transformación del tolueno en benzoato mediante la oxidación secuencial de su grupo metilo. En una segunda etapa, *meta*, el benzoato es metabolizado hasta intermediarios del ciclo de Krebs mediante la rotura en posición *meta* del intermediario catecol (Assinder and Williams, 1990; Marques and Ramos, 1993). La expresión de cada una de las etapas es dependiente de un regulador asociado codificado también en el plásmido. El promotor de la ruta *upper*, *Pu*, depende de XylR, un activador de la familia de activadores de $\sigma 54$ (Marques and Ramos, 1993; Ramos *et al.*, 1987; Studholme and Dixon, 2003; Xu and Hoover, 2001; Zhang *et al.*, 2002), responsable también de aumentar los niveles de expresión del promotor de *xylS*; XylS es un regulador transcripcional de la familia AraC/XylS (Egan, 2002; Gallegos *et al.*, 1997; Marques and Ramos, 1993; Marques *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1997) y el responsable de la expresión del promotor de la ruta *meta*, *Pm*.

Los circuitos de regulación de la ruta TOL del plásmido pWW0 han sido objeto de estudio tanto desde la perspectiva específica como desde la fisiología de la célula (Fig. 6).

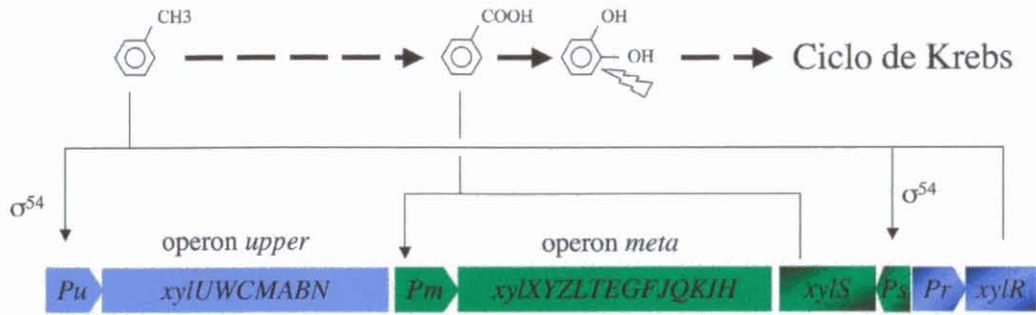


Figura 6. Esquema simplificado del circuito de regulación específica de la ruta TOL. Cuando El tolueno se encuentra presente en el medio, el activador XylR dirige la transcripción del promotor P_u (*upper*) y del promotor P_s (*xyIS*). La acción de las enzimas de la ruta *upper* producen la transformación de tolueno en benzoato; este es responsable de la activación de XylS que dirige entonces la expresión de la ruta *meta*. Las enzimas de rama *meta* continúan la mineralización desde benzoato hasta intermediarios del ciclo de Krebs mediante la rotura *meta* del anillo aromático.

XylR y XylS median la regulación específica del conjunto de rutas TOL; en ausencia de sustratos, tanto XylS como XylR son sintetizadas en formas no competentes para activar a sus promotores respectivos. En respuesta a la presencia de sustratos de la ruta *upper* XylR, cambia de conformación y pasa a ser competente para activar P_u y P_s . De este modo se expresan las enzimas encargadas de los primeros pasos de la ruta, y se aumentan los niveles del segundo regulador (XylS) que reconoce los productos de esta primera etapa. XylS entonces activa el promotor de la rama encargada de los siguientes pasos de degradación (Fig. 6). Este puede activar la expresión desde el promotor P_m bien en presencia de sustratos de la ruta *meta* o bien cuando se sintetiza a altos niveles como consecuencia de la acción de XylR (Marques and Ramos, 1993; Marques *et al.*, 1993; Marques *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 1997). La expresión de *xylR* es constitutiva y se ha descrito que XylR posee capacidad para reprimir su propio promotor, en un equilibrio que conlleva al mantenimiento de niveles constantes de la proteína (Abril *et al.*, 1989; Bertoni *et al.*, 1997; Bertoni *et al.*, 1998; Duetz *et al.*, 1994; Fraile *et al.*, 2001; Inouye *et al.*, 1985).

1.2.1.2 Regulación fisiológica

En toda la ruta TOL se codifican 20 proteínas catalíticas y 2 reguladores. Esto supone un gasto importante de recursos energéticos, por lo que la necesidad de ser capaces de modular la expresión de esta ruta es si cabe mas importante. Numerosas observaciones se han llevado a cabo en este sentido. La primera que sugería una regulación fisiológica de la ruta TOL fue realizada Hugovieux (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1990). En este trabajo se observó que no era posible detectar actividad de la ruta *upper* durante el crecimiento en medios ricos hasta alcanzar la fase estacionaria. Trabajos en esta línea determinaron que mientras que en medio mínimo se detectaban mensajeros a los cinco minutos de exposición al inductor, al añadir Caa o extracto de levadura se producía un retraso hasta alcanzar fase estacionaria (Holtel *et al.*, 1994). Como se observa en la Figura 7 al monitorizar la expresión del promotor *Pu*, en la cepa de *P. putida* MAD2 durante la fase exponencial de crecimiento en medio LB, pese a que esta cepa porta un alelo de *xylR* que codifica para una proteína constitutivamente activa que no necesita de efector para ser capaz de disparar la expresión desde *Pu* (Cases *et al.*, 1996), este disparo no se produce hasta que el cultivo deja la fase exponencial del crecimiento. En esta cepa se mide la expresión del promotor *Pu* desde una fusión cromosómica del promotor al gen reportero *lacZ*.

No se ha determinado cual es exactamente la señal, aunque combinaciones concretas de aa son suficientes para provocar este silenciamiento de la ruta durante la fase exponencial del crecimiento en medios ricos. Aunque los mecanismos subyacentes a este silenciamiento no están elucidados, se ha sugerido que la capacidad del factor σ_{54} para activar el promotor *Pu* en esas condiciones esta disminuida (Cases *et al.*, 1996). Sería a este nivel donde la señal del medio rico se trasladaría a la ruta TOL

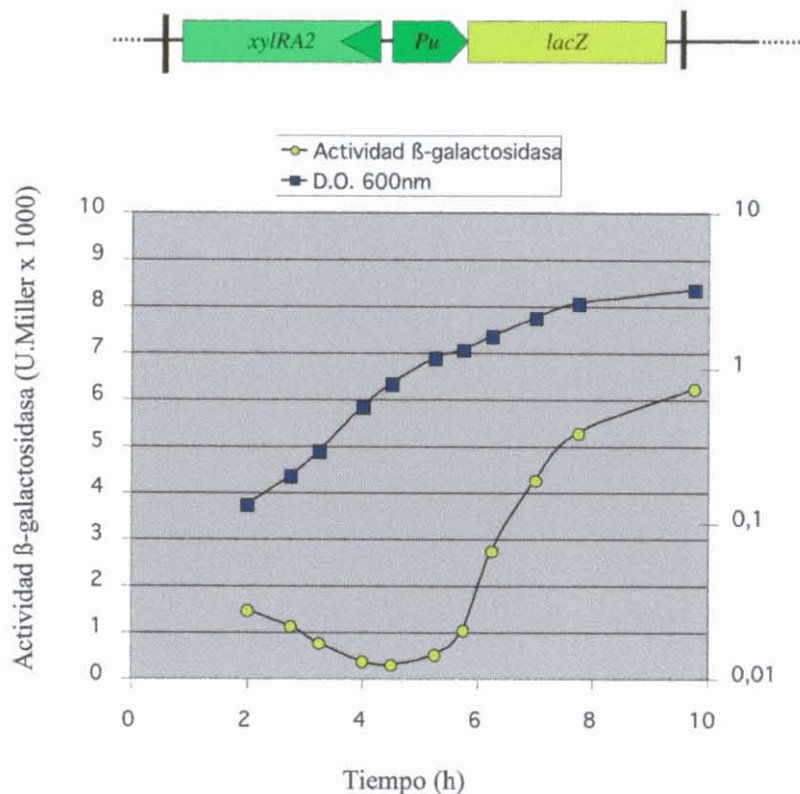


Figura 7. Curvas de crecimiento y de expresión del promotor *Pu* de un cultivo de la cepa *Pseudomonas putida* MAD2 en medio LB. La expresión del promotor *Pu* se mide como actividad β-galactosidasa ; esta cepa lleva una inserción cromosómica que porta una fusión de este promotor y el gen reportero *lacZ* junto un alelo de *xylR* que codifica para una proteína constitutivamente activa. Experimento recreado de Cases *et al.*(1996).

Otro fenómeno de control fisiológico ejercido sobre la ruta TOL que ha sido objeto de estudio es la represión que ejercen ciertas fuentes de carbono sobre algunos promotores de la ruta. Cuando se añaden al medio de cultivo glucosa o gluconato, los niveles de expresión del promotor *Pu* descienden hasta un 66%. Los primeros trabajos observaron que al crecer las células en medio mínimo con diferentes compuestos como fuente de carbono, y se inducía el promotor *Pu* con bencil alcohol, la inducción en presencia de glucosa o de gluconato era de hasta un 70% menor que otras fuentes de carbono como el succinato o la fructosa (Holtel *et al.*, 1994). En trabajos posteriores para poder separar los efectos debidos a diferencias en la velocidad de crecimiento de los producidos por la presencia de fuentes de carbono alternativas, se visualizó el disparo de la expresión del promotor, en medios mínimos con Caa. 0,2 % que iguala las tasas de crecimientos, en presencia de diferentes fuentes de carbono (Fig. 8). Este problema biológico se ha abordado tanto desde cultivos en matraces como desde cultivos en quimiostatos (Cases *et al.*, 1999; Duetz *et al.*, 1994; Duetz *et*

al., 1996; Holtel *et al.*, 1994; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1990; Marques *et al.*, 1994)

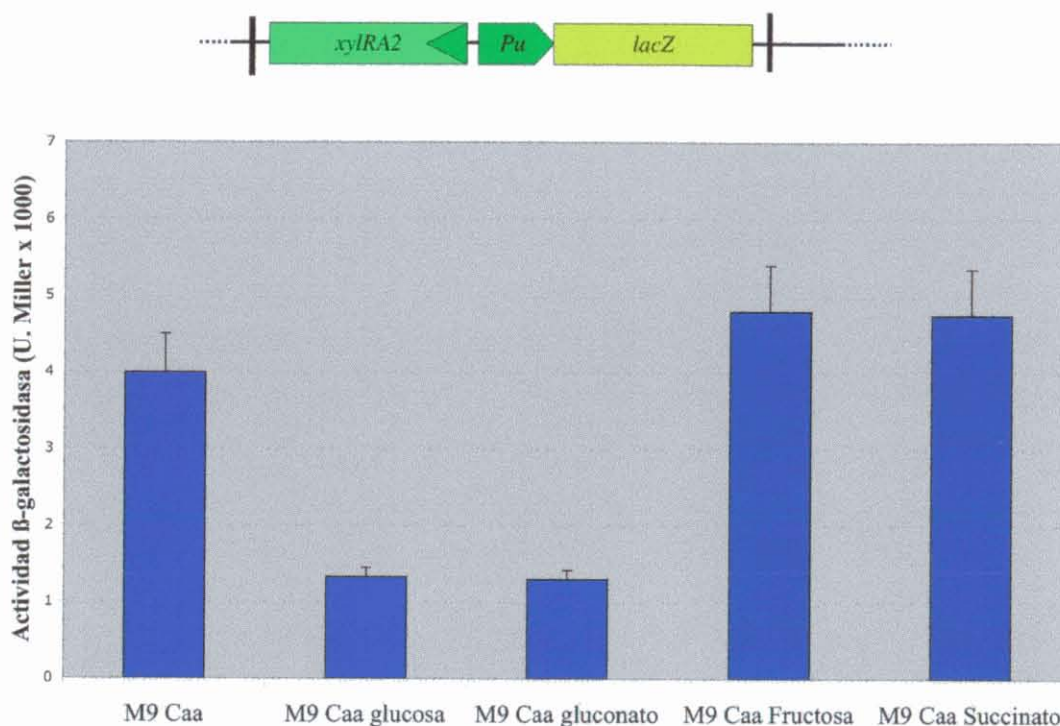


Figura 8. Efecto de diferentes fuentes de carbono en la actividad del promotor *Pu*. La actividad del promotor *Pu* es medida durante la entrada en la fase estacionaria de cultivo en medio mínimo suplementado con Caa, para evitar variaciones en la velocidad de crecimiento y con diferentes fuentes de carbono añadidas. La actividad del promotor *Pu* se mide como actividad β-galactosidasa en la cepa de *P. putida* MAD2. Figura de (Cases, 1998).

Ya en estos trabajos se pone de manifiesto que no existe relación entre las velocidades de crecimiento permitidas por las distintas fuentes de carbono y su capacidad de reprimir la expresión de *Pu*. Trabajos posteriores han logrado demostrar la implicación de los genes *ptsN* y *ptsO* en la represión ejercida por glucosa o gluconato sobre la expresión del promotor *Pu* (Cases *et al.*, 1999; Cases *et al.*, 2001).

Estos genes codifican para las proteínas EIIA^{Ntr} y Npr respectivamente, y pertenecen a una subfamilia del sistema PTS (Fig. 21). Los genes *ptsN* y *ptsO* se localizan agrupados en el cromosoma con el gen *rpoN*, que codifica para el factor sigma alternativo σ54 (Fig. 9)

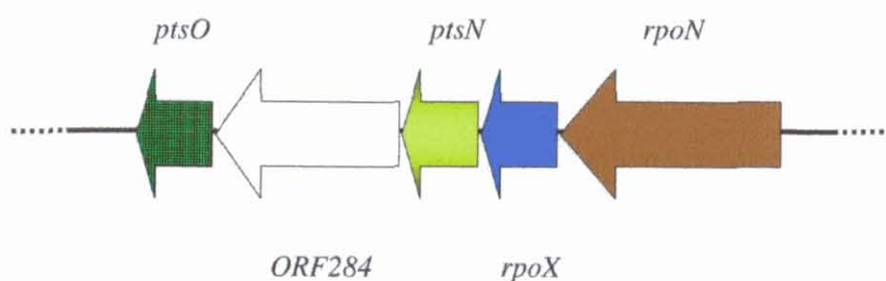


Figura 9. Agrupamiento génico de *ptsN* y *ptsO*. Esquema deducido desde www.tigr.org.

Un mutante defectivo para $EIIA^{Ntr}$ no es capaz de responder a la presencia de glucosa bajando los niveles de expresión del promotor *Pu*, presentando niveles de expresión desreprimidos incluso en presencia de glucosa (Cases *et al.*, 1999); se ha demostrado que para que $EIIA^{Ntr}$ pueda desempeñar su papel en esta cascada de señalización es necesaria la conservación de la histidina fosforilable de los EIIA. Experimentos con mutantes dirigidos en este residuo y que mimetizan las formas fosforiladas y no fosforiladas de EII^{Ntr} sugieren que es la forma fosforilada de EII^{Ntr} la que dispara la represión (Cases *et al.*, 1999). En esta cascada también participa NPr, un mutante defectivo de esta proteína presenta unos niveles de expresión reprimidos incluso en ausencia de glucosa en el medio. Este fenómeno de control del promotor *Pu* se manifiesta de forma independiente del control ejercido durante la fase exponencial del crecimiento en medios ricos, de modo que los mutantes defectivos en NPr y $EIIA^{Ntr}$ siguen presentado un silenciamiento en esas condiciones (Cases *et al.*, 1999; Cases *et al.*, 2001).

El hecho de encontrarse agrupados con $\sigma 54$, históricamente asociado al metabolismo del nitrógeno, y algunos fenotipos relacionados con el metabolismo del nitrógeno de *ptsN*, hizo que se propusiera un papel para *ptsN* y *ptsO* en comunicar el metabolismo del nitrógeno y el carbono (Powell *et al.*, 1995). En estudios posteriores se demostró *in vitro* una mayor afinidad de NPr por $EIIA^{Ntr}$ que por $EIIAGlc$ (Rabus *et al.*, 1999). Como se observa en la Figura 21 EII^{Ntr} posee similitud de secuencia con dominios EIIA, y NPr con proteínas HPr. Estudios con el doble mutante *ptsN ptsO* sugieren para NPr un papel en el proceso de desfosforilación de EII^{Ntr} en ausencia de glucosa (Cases *et al.*, 2001).

Como se describe en la Figura 10 la entrada de la glucosa favorecería mediante un mecanismo desconocido la acumulación de la forma fosforilada de $EIIA^{Ntr}$, la cual

induciría la represión del promotor Pu , al desaparecer la glucosa, NPr se encargaría de desfosforilar $EIIA^{Ntr}$ y producir la liberación del promotor Pu de la represión.

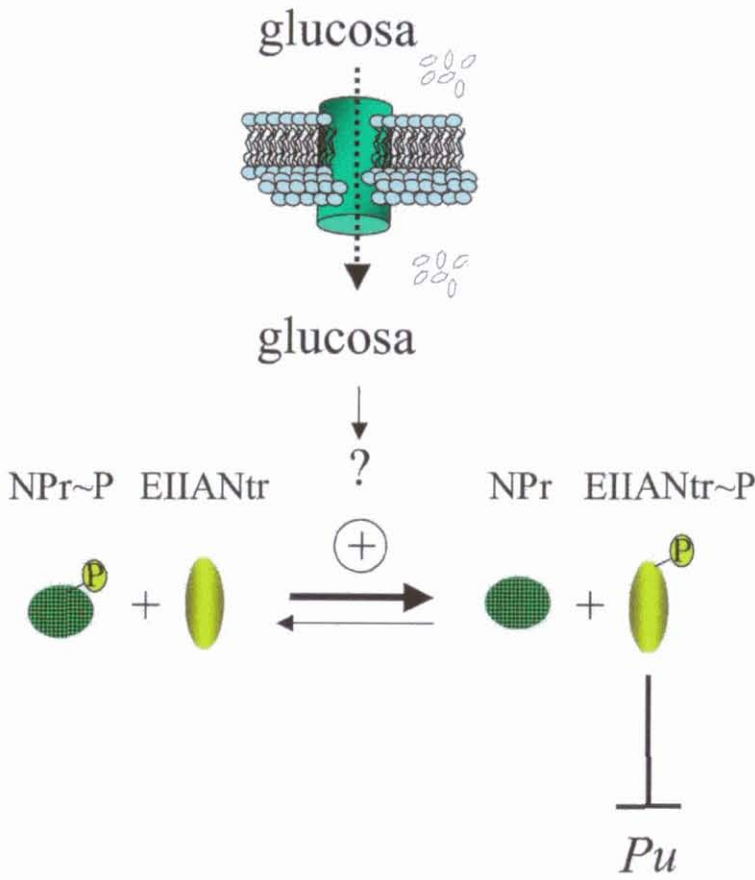


Figura 10. Esquema del modelo propuesto de la represión ejercida por la glucosa del promotor Pu . La forma fosforilada de $EIIANtr$ se acumularía en el citoplasma en presencia de glucosa en el medio, y dispararía la represión del promotor. Cuando la glucosa desaparece del medio, la proteína NPr se encargaría de desfosforilar $EIIANtr$ y se liberaría la represión (Cases *et al.*, 2001).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Con estos antecedentes nos planteamos los siguientes objetivos en este trabajo:

- 2.1 Profundizar en el mecanismo de control por fuente de carbono ejercido sobre el promotor *Pu* y el papel del sistema PTS en este proceso
- 2.2 Explorar la información genómica disponible en relación al papel del sistema PTS en *P. putida* KT2440
- 2.3 Diseñar un *array* que nos permitiera visualizar desde una perspectiva global el comportamiento de la ruta TOL y esbozar el estatus metabólico de *P. putida*
- 2.4 Visualizar el impacto de la implantación de las rutas TOL en el metabolismo de *P. putida* KT2440
- 2.5 Explorar el efecto de diferentes tipos de estreses en las capacidades metabólicas asociadas a las rutas TOL, dentro del contexto de *P. putida* KT2440.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas y plásmidos

A continuación se enumeran los plásmidos y cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*, así como sus características genotípicas y fenotípicas más relevantes, utilizados en este trabajo.

Tabla 2. Estirpes de *E. coli*

Estirpe	Fenotipo/genotipo	Referencia
DH5 α	F ⁻ Φ 80d lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 R ⁻ M ⁺ supE44 thi1 gyrA relA1	Hanahan (1983)
CC118	Δ (ara-leu) ara Δ Δ lacX74 galE galK phoA thi1 rpsE rpoB argE(Am) recA1	Manoil y Beckwith (1985)
CC118 λ pir	CC118 lisógeno λ pir	de Lorenzo y Timmis (1994)
S17-1 λ pir	Tp ^r Sm ^r ; recA thi hsd R ⁻ M ⁺ RP4::2- Tc:Mu::Km::Tn7, lisógeno λ pir	de Lorenzo y Timmis (1994)
HB101 (pRK600)	Sm ^r , Cm ^r ; hsd R ⁻ M ⁺ pro leu thi recA (pRK600). Estirpe ayudante en conjugaciones tripartitas.	Sambrook <i>et al.</i> (1989)

Tabla 3. Estirpes de *P. putida*

Estirpe	Fenotipo/genotipo/descripción	Referencia
mt-2	Aislado natural de <i>P. putida</i> (pWW0)	Nozaki <i>et al.</i> (1973)
KT2440	mt-2 curada de pWW0	Bagdasarian <i>et al.</i> (1981)
KT2442	KT2440 Rif ^r	Franklin <i>et al.</i> (1981)
MAD1	Tel ^r ; KT2442 con una inserción cromosómica del transposón de pMAD1, mini-Tn5 con <i>xyIR</i> bajo su propio promotor y una fusión <i>Pu-lacZ</i>	Fernández <i>et al.</i> (1995)

MAD1 (pWW0)	Tel ^r ; MAD1 con el plásmido pWW0	Este trabajo
MAD2	Tel ^r ; KT2442 con una inserción cromosómica del transposón de pMAD2, mini Tn-5 con el alelo constitutivo <i>xylRΔA2</i> bajo su propio promotor y una fusión <i>Pu-lacZ</i>	Fernández <i>et al.</i> (1995)
<i>ptsN::Km</i>	Tel ^r , Km ^r ; MAD2 con el gen <i>ptsN</i> interrumpido con un gen que confiere resistencia a kanamicina.	Cases <i>et al.</i> (1999)
<i>ptsN::xylE</i>	Tel ^r , XylE ⁺ ; MAD2 con el gen <i>ptsN</i> interrumpido con un gen que codifica para la catecol 2,3 dioxigenasa.	Cases <i>et al.</i> (2001)
<i>ptsO::Km</i>	Tel ^r , Km ^r ; MAD2 con el gen <i>ptsN</i> interrumpido con un gen que confiere resistencia a kanamicina.	Cases <i>et al.</i> (1999)
<i>ptsP::Km</i>	Tel ^r , Km ^r ; MAD2 con el gen <i>ptsP</i> interrumpido con un gen que confiere resistencia a kanamicina.	Cases <i>et al.</i> (2001)
<i>fruB::xylE</i>	Tel ^r , XylE ⁺ ; MAD2 con el gen <i>fruB</i> interrumpido con un gen que codifica para la catecol 2,3 dioxigenasa.	Cases <i>et al.</i> (2001)
<i>ptsP::Km</i> <i>fruB::xylE</i>	Tel ^r , Km ^r , XylE ⁺ ; MAD2 con los genes <i>ptsP</i> y <i>fruB</i> interrumpidos con genes que codifican para resistencia a kanamicina y para la catecol 2,3 dioxigenasa respectivamente.	Cases <i>et al.</i> (2001)
<i>fda::Km</i>	Tel ^r , Km ^r ; MAD2 con el gen <i>fda</i> interrumpido con un gen que confiere resistencia a kanamicina..	Este trabajo
<i>eda::xylE</i>	Tel ^r , XylE ⁺ ; MAD2 con el gen <i>eda</i> interrumpido con un gen que codifica para la catecol 2,3 dioxigenasa.	Este trabajo
<i>crc::Tc</i>	Tel ^r , Tc ^r ; MAD2 con el gen <i>crc</i> interrumpido con un gen que confiere resistencia a tetraciclina.	Este trabajo
<i>cyoB::Tc</i>	Tel ^r , Tc ^r ; MAD2 con el gen <i>cyoB</i> interrumpido con un gen que confiere resistencia a tetraciclina.	Este trabajo

Tabla 4. Plásmidos

Plásmido	Descripción	Referencia
pUC18Not	Ap ^r , α complementación de <i>lacZ</i> ; similar al pUC18 pero con el MCS flanqueado por las dianas de corte de la enzima <i>NotI</i> .	de Lorenzo <i>et al.</i> (1994)
pUCKm	Ap ^r , Km ^r ; derivado de pUC19, en el que se ha clonado el gen que confiere resistencia a Km del pACYC177 en el sitio de corte de <i>BamHI</i> .	Cases <i>et al.</i> (1999)
pXyle10	Km ^r , Xyle ⁺ ; plásmido que lleva el gen <i>xyle</i> de pWW0 flanqueado por múltiples dianas de restricción.	Stein D.C. (1992)
pUCptsP	Ap ^r , pUC18Not en el que se ha clonado como fragmento <i>EcoRI-BamHI</i> la CDS del gen <i>ptsP</i> .	Cases <i>et al.</i> (2001)
pUCeda	Ap ^r , pUC18Not en el que se ha clonado como fragmento <i>XbaI-EcoRI</i> 1.6 kb que contienen el gen <i>eda</i> y regiones flanqueantes.	Este trabajo
pUCfruB	Ap ^r , pUC18Not en el que se ha clonado como fragmento <i>EcoRI-BamHI</i> el gen <i>fruB</i> .	Cases <i>et al.</i> (2001)
pUCptsPKm	pUCptsP en el que un fragmento <i>ptsP</i> ha sido sustituido por 0.8 kb (casete sin región promotora de Km ^r) de pUCKm.	Cases <i>et al.</i> (2001)
pUCedaXyle	pUCeda en el se ha interrumpido la CDS de <i>eda</i> con el gen <i>xyle</i> del plásmido pXyle10.	Este trabajo
pUCfruBXyle	Ap ^r , Xyle ⁺ ; pUCfruB en el que un fragmento de <i>fruB</i> ha sido sustituido por el fragmento que incluye el gen <i>xyle</i> de pXyle10	Este trabajo Cases <i>et al.</i> (2001).
pKNG101	Sm ^r , Sac ^s ; vector con selección positiva y negativa usado para realizar integraciones por recombinación homóloga en el cromosoma. Origen de replicación RK2, dependiente de la proteína Pir de lambda	Kaniga <i>et al.</i> (1991)
pKNGptsP	Sm ^r , Sac ^s ; derivado de pKNG101 para la interrupción del gen <i>ptsP</i> .	Cases <i>et al.</i> (2001)
pKNGfruB	Sm ^r , Sac ^s , Xyle ⁺ ; derivado de pKNG101	Cases <i>et al.</i> (2001)

	para la interrupción del gen <i>fruB</i>	
pKNGeda	Sm ^r , Sac ^s , Xyle ⁺ ; derivado de pKNG101 para la interrupción del gen <i>eda</i>	Este trabajo
pCRC20	Sm ^r , Sac ^s , Tc ^r ; derivado de pKNG101 para la interrupción del gen <i>crc</i>	Dinamarca <i>et al.</i> (2002)
pKCYOBTc	Sm ^r , Sac ^s , Tc ^r ; derivado de pKNG101 para la interrupción del gen <i>cyoB</i>	Dinamarca <i>et al.</i> (2002)
pVLT <i>fruB</i>	Sm ^r ; derivado de pVLT35 en el que se ha clonado la CDS del gen <i>fruB</i> .	Este trabajo
pVLT <i>fda</i>	Sm ^r ; derivado de pVLT35 en el que se ha clonado la CDS del gen <i>fda</i> .	Este trabajo
pCHESIΩKm	Km ^r , Ap ^r ; derivado de pUC	Marqués S.
pCHESI <i>fda</i> Km	Km ^r , Ap ^r ; derivado de pCHESIΩKm para seleccionar en un solo evento de recombinación la interrupción del gen <i>fda</i> .	Este trabajo
pVLT35	Sm ^r ; vector de expresión basado en <i>lacI^f/Ptrc</i> , con origen de replicación de RSF1010 de amplio espectro de hospedador y MCS de pUC18.	de Lorenzo <i>et al.</i> (1993)
pVLT <i>ptsP</i>	Sm ^r ; derivado de pVLT35 en el que se ha clonado la CDS del gen <i>ptsP</i> .	Este trabajo

3.2 Medios y condiciones de cultivo

Como medio de cultivo rico se empleó la receta de Luria-Bertani (LB, Sambrook *et al.*, 1989). Salvo que se indique lo contrario los medios mínimos utilizados llevaron como base las sales M9 (Sambrook *et al.*, 1989) a la que se añadieron las fuentes de carbono a las concentraciones finales siguientes: succinato a 10 mM, glucosa a 15 mM, casaminoácidos a 0.2%, 3-.metil-bencilalcohol a 3 mM y 3-metil-benzoato a 3 mM.

m-xileno y *o*-xileno fueron añadidos en fase gaseosa depositando en un compartimento *ad hoc*, 200 µl de una disolución 1:5 en dibutilftalato (Fig 11) en matraces con tapa de teflón.

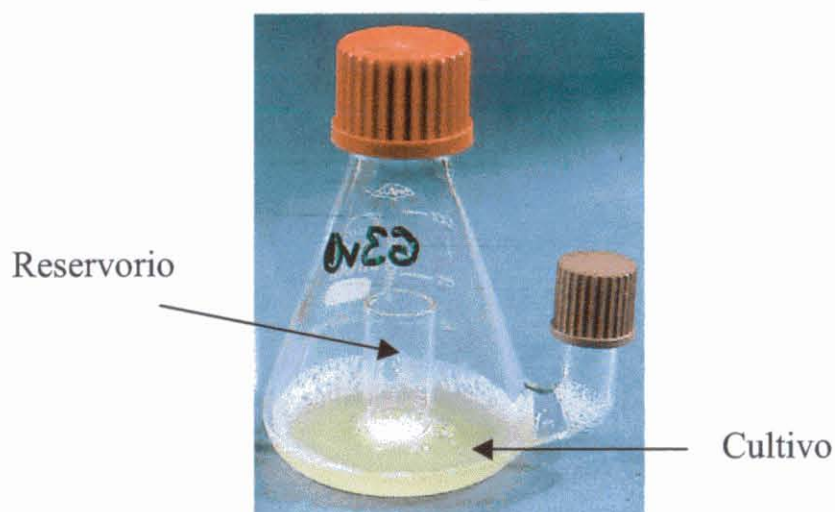


Figura 11. Matraz utilizado para el cultivo de *P. putida* para añadir fuentes de carbono en la fase gaseosa. Con flechas se señalan el lugar que ocupa el cultivo y el reservorio separado para la adición de la fuente de carbono volátil.

De manera rutinaria las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37 °C y las de *P. putida* a 30°C y los antibióticos se usaron a las siguientes concentraciones: Ap, 150 µg/ml; Tc, 15 µg/ml; Cm, 30 µg/ml; Km, 50 µg/ml; Tel, 80 µg/ml; Sm, 50 µg/ml para *E. coli* y 125 µg/ml para *P. putida*.

3.3 Visualización de PHAs

Para el análisis de la síntesis de PHAs el medio de cultivo fue M63 (Sambrook *et al.*, 1989) suplementado con octanoato sódico 15 mM, y una variante de M63 donde la fuente de nitrógeno se redujo 10 veces. Ambos medios fueron inoculados a DO 600nm 0.05 con un preinóculo en LB de la estirpes a estudiar, lavado dos veces en SO₄Mg 10 mM. Se incubó durante 16-48 h a 30 °C y se visualizaron los gránulos intracelulares en un microscopio de contraste de fases.

3.4 Metodologías genéticas

3.4.1 Técnicas generales

La preparación de ADN, digestión, ligación y otras técnicas comunes para la manipulación de ácidos nucleicos se realizaron siguiendo los protocolos descritos por (Sambrook *et al.*, 1989). Las condiciones estándar para amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR fueron las siguientes. Las reacciones se llevaron a cabo en una mezcla tampón que contenía 1.5 mM Cl₂Mg, 50 mM ClK, 10 mM Tris-HCl pH 8.3,

0.001% gelatina y 0.1 mM de cada uno de los dNTPs. Los cebadores se emplearon a 20 μ M. Las muestras se sometieron a un programa estándar en el termociclador que consistió en 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, y 1 min/kb del amplicón a 72 °C. Finalizados los 30 ciclos se mantiene la temperatura a 72 °C durante 7 min. Como molde de la reacción se usaron preparaciones de extracción de plásmido, o de ADN cromosómico o una colonia bacteriana hervida 10 minutos en agua bidestilada; si el molde provenía de una preparación de ADN cromosómico o de una colonia, se incluía en protocolo del termociclador un paso previo de incubación de la reacción a 94 °C de 5 min. La purificación de productos de PCR se realizó usando el *PCR purification Kit*, siguiendo las recomendaciones del fabricante (QIAGEN GmbH Germany). Para la inducción de competencia en *E. coli* se utilizó el método del $CaCl_2$ descrito por (Sambrook *et al.*, 1989). La movilización de plásmidos a *P. putida*, se realizó por conjugación bipartita o tripartita según (de Lorenzo and Timmis, 1994) usando en su caso como cepa ayudante *E. coli* HB101 (pRK600). Para la inducción de competencia en *E. coli* se utilizó el método del $CaCl_2$ descrito por (Sambrook *et al.*, 1989).

3.4.2 Construcción de mutantes nulos en la cepa *P. putida* MAD2

Para la construcción de mutantes nulos en la cepa *P. putida* MAD2, se usaron derivados del plásmido pKNG101 y del pCHESI Ω Km. Para los mutantes construidos con derivados del pKNG101 se procedió como se esquematiza en las Figura 12-13.

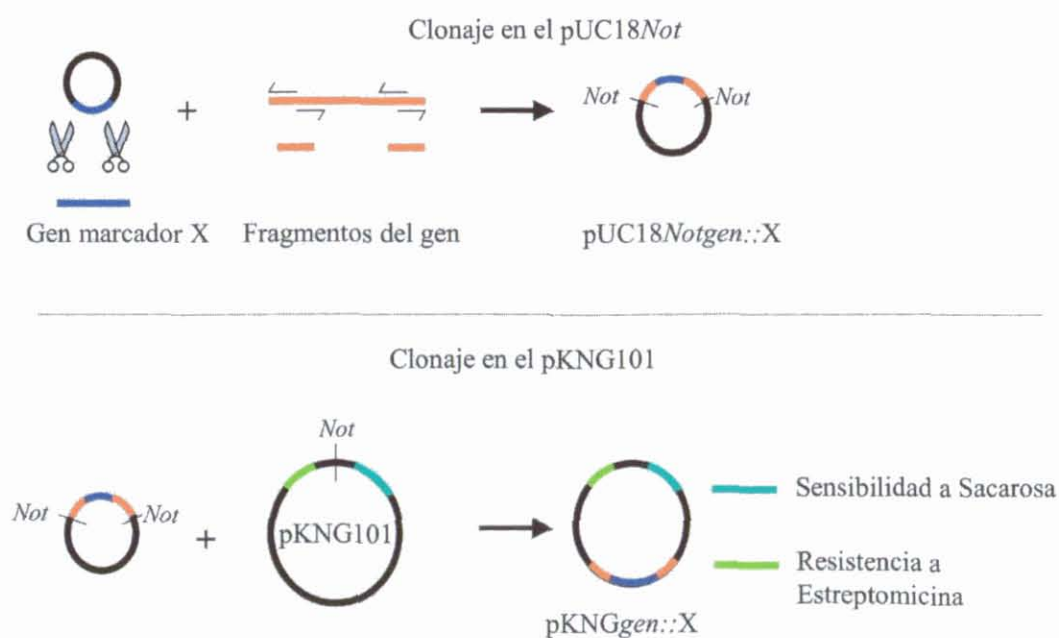


Figura 12. Esquema de la construcción de derivados del pKNG101 para la interrupción de genes en *P. putida* MAD2. Se clonó en el pUC18*Not* un gen marcador flanqueado por regiones del gen a interrumpir; del plásmido resultante se obtuvo la versión interrumpida como fragmento *Not*I y se clonó a su vez en el pKNG101 obteniéndose así el derivado correspondiente a cada gen.

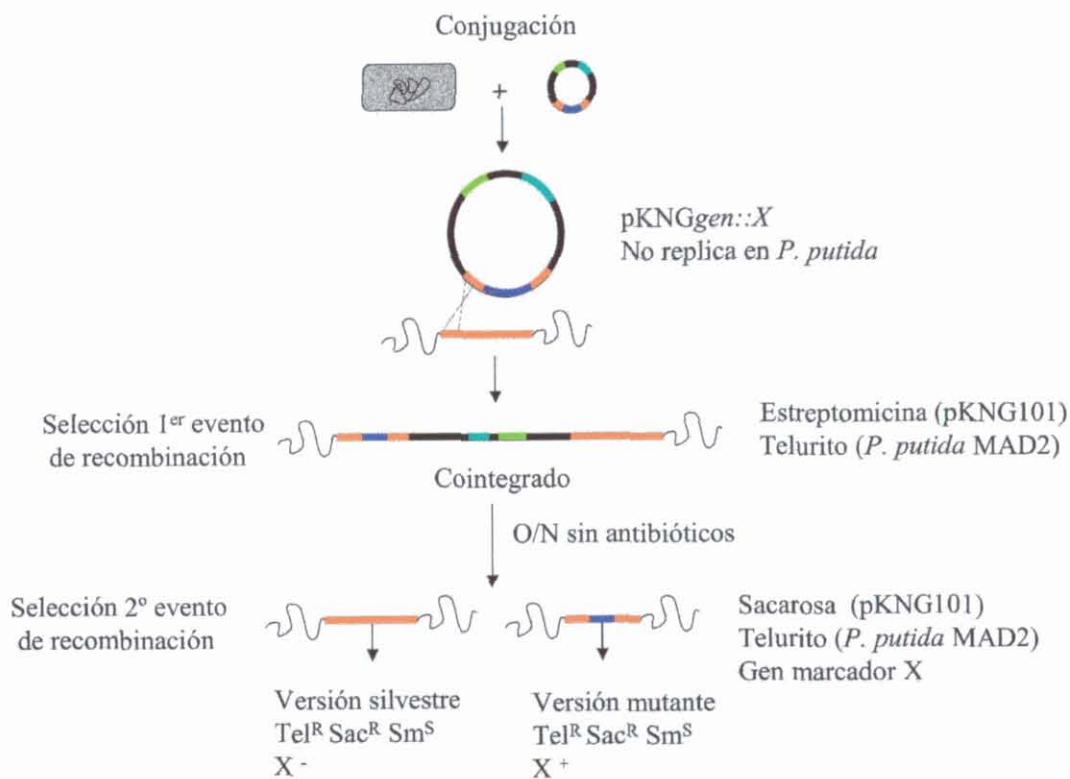


Figura 13. Esquema de la construcción de mutantes nulos a partir de derivados de pKNG101. Los derivados de pKNG101 fueron introducidos en la cepa *P. putida* MAD2 por conjugación seleccionando los transconjugantes por resistencia a telurito (MAD2) y a estreptomicina (pKNGs). Como los derivados de pKNG101 no pueden replicar en *Pseudomonas* los transconjugantes deben representar el resultado de una integración en el cromosoma (1^{er} evento de recombinación). Para permitir la resolución del cointegrado, se incubó durante toda una noche en medio rico sin antibióticos, y se seleccionaron los resueltos (2^o evento de recombinación) en un medio con sacarosa al 8% (sensibilidad codificada en pKNGs). De las colonias resultantes se escogieron aquellos que eran sensibles a estreptomicina, y positivas para el marcador utilizado en cada caso. También se comprobó por PCR que poseyeran la versión mutante.

Para la construcción del mutante *fda* se utilizó un derivado del plásmido pCHESIΩKm y se procedió según el esquema siguiente (Fig. 14-15).

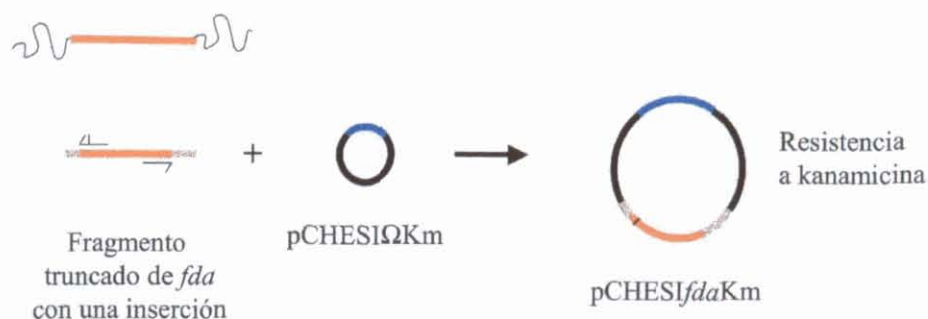


Figura 14. Esquema de la construcción de derivados de pCHESIΩKm para la construcción del mutante *fda*. Se amplificó por PCR un fragmento interno del gen *fda* que poseía además un cambio en la pauta de lectura y se clonó en el plásmido pCHESIΩKm rindiendo el pCHESI *fda* Km.

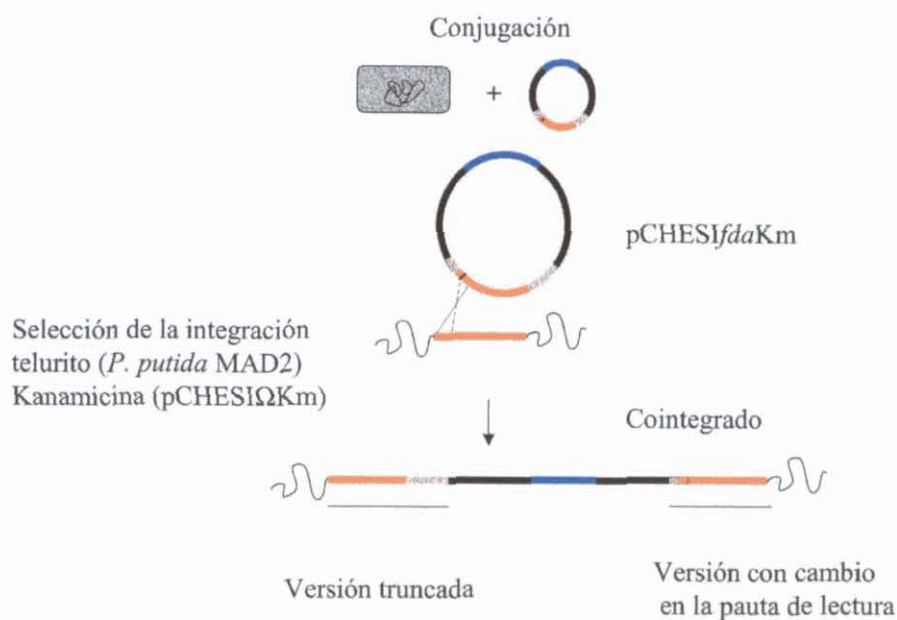


Figura 15. Esquema de la construcción del mutante *fda* a partir de un derivado de pCHESIΩKm. El plásmido pCHESI *fda* Km se transfirió a *P. putida* MAD2 por conjugación, seleccionando la integración de este con telurito (*P. putida* MAD2) y kanamicina (pCHESI *fda* Km). La integración produce una duplicación del gen *fda* pero con ambas truncadas. Se comprobó por PCR la presencia de ambas copias truncadas.

Para la construcción del mutante nulo del gen *ptsP* se amplificó la secuencia correspondiente por PCR desde el codón 36 al 678 usando como cebadores los oligonucleótidos *PTSPR* y *PTSPL* (Tabla 11. Anexo 1). El producto de PCR fue clonado como un fragmento *EcoRI*-*Bam*HI en pUC18Not, originando así el plásmido

pUC*ptsP*. Este se digirió con la enzima *MscI*, que eliminaba 249 codones de la secuencia codificante de *ptsP*, para substituirlos por el fragmento *BamHI* (cuyos extremos se hicieron romos tratando con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa) de pUCKm resultando el plásmido pUC*ptsPKm*. Este fue digerido y clonado como fragmento *NotI* en el plásmido pKNG101, rindiendo el pKNG*ptsP*. Este último por tanto poseía la secuencia del gen *ptsP* truncado por una casete de resistencia a Km. Esta variante del pKNG101 fue movilizado por conjugación tripartita a la cepa *P. putida* MAD2, seleccionando los transconjugantes por resistencia a telurito (*P. putida* MAD2) y Sm (pKNG*ptsP*). Dado que el plásmido no replica en *P. putida*, estos deberían ser el resultado un evento de recombinación. Mediante PCR se comprobó la presencia de ambas versiones del gen en los cointegrados resultantes. Para permitir la resolución de los cointegrados, estos se incubaron sin antibióticos en LB durante la noche. Para seleccionar los clones que hubieran resuelto la integración se plaquearon en LB con sacarosa al 8% (sensibilidad otorgada por el pKNG*ptsP*) y telurito. Se aislaron colonias resistentes a sacarosa, y se comprobó su sensibilidad a Sm. Todos resultaron ser resueltos genuinos (sensibles a Sm). Se buscó por PCR aquellos cuyo segmento del gen *ptsP* correspondiera a la versión truncada, ya que el casete de resistencia a Km no se expresaba en LB a niveles suficientes para otorgar resistencia a Km.

Para la construcción del mutante nulo del gen *fruB* se procedió de manera análoga, construyéndose los plásmidos pUC*fruB*, pUC*fruBXylE*, pKNG*fruB*. Usando los cebadores 5MTP y 3MTP (Tabla 11. Anexo 1) y deleccionando del alelo silvestre 1500 pb con la enzima *NgoMIV*, para substituirlos por el fragmento *XmaI* del plásmido pXylE10 (Tabla 4).

Para la construcción del doble mutante *ptsP fruB* se movilizó el plásmido pKNG*fruB* hacia una cepa *P. putida ptsP* y se procedió de forma análoga a la construcción del mutante simple.

Para la construcción del mutante nulo del gen *eda* se construyeron los plásmidos, pUC*eda*, pUC*edaXylE* y pKNG*eda*. Con los oligonucleótidos FwEda y RevEda (Tabla 11. Anexo 1) como cebadores se amplificó por PCR 1.6 kb del genoma que contenía la región codificante de *eda*, mas 464 pb aguas arriba y 473 pb aguas debajo de

la secuencia codificante. El producto fue clonado como fragmento *XbaI-EcoRI* en pUC18*NotI*. El plásmido resultante (pUCeda) fue digerido con la enzima *XhoI* y ligado con el fragmento *SmaI* de pXylE10, tratando previamente con el fragmento Klenow de la polimerasa generando el plásmido pUCedaXylE. A partir de este se obtuvo una versión truncado del gen como fragmento *NotI*, para clonar en el pKNG101 y obtener pKNGeda. Este último se usó para conseguir la sustitución de la copia silvestre de *eda* en dos pasos sucesivos, eventos de recombinación homóloga.

Para la construcción del mutante deleciónado en *fda* se amplificó un fragmento 628 pb de la secuencia codificante de *fda*, con los cebadores Ffda2 y Rfda2 (Tabla 11. Anexo 1), que no incluía el gen entero. Además Ffda2 incluía una inserción de una base que altera la pauta de lectura con respecto del gen silvestre. Rfda2 no amplifica los 59 últimos aminoácidos. Este fragmento Fda Δ C digerido *EcoRI-BglIII* se clonó *EcoRI-BamHI* en el pCHESI Ω Km resultando pCHESI*fda*. Este se movilizó por conjugación tripartita hacia *P. putida* MAD2, y se seleccionaron los transconjugantes por resistencia a Km. Se comprobó por PCR que ambas copias del gen se encontraban truncadas en los transconjugantes.

Para la construcción del mutante nulo del gen *cre* se movilizó por conjugación el plásmido pCRC20 proporcionado por el Dr. Fernando Rojo (Tabla 4) y se procedió de manera similar a la construcción del mutante *ptsP*, usando los cebadores Fw*cre* y Rev*cre* (Tabla 11. Anexo 1) para analizar las versiones del gen presentes en los diferentes clones de transconjugantes y posibles resueltos; y comprobando la sensibilidad a Sm y a sacarosa en cada paso.

Para la construcción del mutante nulo del gen *cyoB* se movilizó por conjugación el plásmido pKCYOBTc proporcionado por el Dr. Fernando Rojo (Tabla 4) y se procedió de manera análoga a la construcción del mutante *ptsP*, usando los cebadores Fw*cyoB* y Rev*cyoB* (Tabla 11. Anexo 1) para analizar las versiones presentes en los diferentes clones de transconjugantes y posibles resueltos; y comprobando la sensibilidad a Sm y a sacarosa en cada paso.

3.5 Metodologías para el tratamiento de proteínas

3.5.1 Técnicas generales

La separación electroforética de proteínas en condiciones desnaturalizantes se realizó en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE) conforme a lo descrito por (Laemmli, 1970). La tinción de extractos con el reactivo azul de Coomassie siguiendo las recomendaciones del distribuidor Bio-Rad (CA, EEUU).

Para la inmunodetección de proteínas, se separaron mediante SDS/PAGE y se transfirieron a una membrana de Immobilon-P (Millipore, Massachussets, EEUU) con un aparato de transferencia semiseca Bio-Rad (CA, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La membrana fue secuencialmente bloqueada en leche al 2%, incubada con un anticuerpo monoclonal frente a la proteína BphC, que es capaz de reconocer de forma específica a la catecol 2,3 dioxigenasa, proporcionado por el profesor Tesar (GBF, Braunschweig).

3.5.2 Cálculo de la actividad β -galactosidasa

Para el seguimiento de la actividad del promotor *Pu* se realizaron mediciones de la actividad β -galactosidasa de las estirpes que portaban una fusión del gen *lacZ* con este promotor en una inserción cromosómica. Para la realización de estos ensayos se partió siempre de preinóculos de la noche anterior crecidos a 30 °C y sin antibióticos, salvo en el caso de que las cepas portaran plásmidos. Estos preinóculos se usaron para inocular 20 ml de cultivo en matraces de 100 ml de volumen hasta una DO 600nm de 0.05 . Estos cultivos se incubaron a 30 °C durante toda la curva de crecimiento. Para el cálculo de la actividad β -galactosidasa se extrajeron muestras cada hora durante la fase exponencial de crecimiento y cada 30 minutos durante la transición entre la fase exponencial y la estacionaria. Se determinó la DO 600nm, de cada punto, y se ensayó la actividad β -galactosidasa acumulada según Miller sobre células permeabilizadas con cloroformo (Miller, 1972).

3.5.3 Ensayo catecol 2,3 dioxigenasa

Para estimar la inducción de la expresión de la ruta *meta* del plásmido pWW0 se realizó un ensayo semicuantitativo de la actividad catecol 2,3 dioxigenasa. Para ello

se tomaron 2 ml de cultivo, a los que se añadieron 15 μ l de una solución de catecol al 1% en H₂O. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifugó durante 2 min a 14000 r.p.m., para eliminar restos celulares y se determinó inmediatamente la absorbancia del sobrenadante a una DO 375nm; a esta longitud de onda el producto de la reacción, semi-aldehído β -hidroximucónico, tiene su máximo de absorción. Usando como su coeficiente de extinción molar 46000 M⁻¹cm⁻¹ (McPhee *et al.*, 2003) se pudo estimar la actividad catecol 2,3 dioxigenasa presente en diferentes condiciones de cultivo.

3.6 Protocolo seguido en los experimentos de *arrays* de ADN

Para visualizar los efectos de diferentes condiciones de cultivo en la expresión de la ruta TOL, y del estatus metabólico, se utilizó un *array* de ADN diseñado en el laboratorio (Anexo 1). En el *array* se depositaron puntos representando los genes de la ruta TOL, y genes descritos en la literatura como implicados en la respuesta a diferentes estreses. Para el tratamiento de los datos, se calcularon la mediana y la desviación estándar de al menos dos extracciones independientes. De cada extracción se realizaron hibridaciones recíprocas, misma muestra pero combinación de fluoróforos recíproca, por duplicado.

3.6.1 Condiciones de cultivo

Salvo que se indique lo contrario para la realización de estos experimentos se partió siempre de un preinóculo crecidos a 30 °C en MM con succinato como única fuente de carbono y sin antibióticos durante la noche. A los medios se le añadió Tritón X-100 al 0.05% para evitar la formación de grumos. Este preinóculo se usó para inocular 200 ml de cultivo, del mismo medio, en un matraz de 1 L de capacidad hasta una DO 600nm de 0.05. Este cultivo se incubó hasta una DO 600nm de 0.5. Llegado a este punto, se separaron 20 ml del cultivo en matraces de 100 ml de capacidad por cada condición a comparar. Para los experimentos de inducción de la ruta TOL, con xilenos, al matraz que constituía la condición de referencia se añadieron 200 μ l de dibutilftalato mientras que al otro se le añadieron 200 μ l de la disolución en este solvente. Para los experimentos de monitorización del efecto en la ruta TOL de los diferentes estreses, salvo el fuel, el inductor fue *m*-xileno 1:5 dibutilftalato, y se añadió desde el principio del crecimiento. Para los experimentos de falta de nutrientes el cultivo a DO 600nm de 0.5 fue lavado dos veces en SO₄Mg₂ 10 mM, y se

resuspendieron en dos matraces a DO 600nm de 0.5 uno en el medio de referencia y otro en el medio *estresante*. Este consistió para el hambre de carbono en M9+ Succ 1 mM, hambre de nitrógeno M9 con la fuente de amonio a 1 mM y otra donde se sustituyó por NO₃Na la fuente de nitrógeno. La microaerofilia fue inducida resuspendiendo en un medio previamente burbujeado con gas sin oxígeno (BIO-15.B50. Air Liquide; 10% hidrógeno, 5 % CO₂ y 85% nitrógeno) en una cámara de anaerobiosis. Para determinar la concentración a usar en los experimentos con arsénico, paracuato, mitomicina C, azida sódica o fuel se realizaron curvas de crecimiento a distintas concentraciones y se escogieron concentraciones subletales de cada *estresante*. Las concentraciones finales usadas de cada compuesto fueron: arsénico 50 mM (AsO₄KH₂), paracuato 100 μM , mitomicina C 3 μg/ml y azida sódica 1mM.

3.6.2 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN, se centrifugaron 8 ml de cultivo de cada condición durante 30 s para evitar variaciones en el transcriptoma, a 4 °C y 14.000 r.p.m. Tras descartar el sobrenadante y congelar el sedimento en nieve carbónica, se añadió 1 ml de TRIZOL Reagent (GIBCO, California, EEUU) por cada 2 ml de cultivo. Se descongelaron los sedimentos en presencia de TRIZOL; se añadió 250 μl de cloroformo por cada 2 ml de cultivo inicial; se separaron las fases orgánica y acuosa por centrifugación a 4° C y 14.000 r.p.m. y se recogió la fase acuosa en un tubo limpio. Para precipitar el ARN se añadió 1 volumen de isopropanol previamente enfriado a -20 °C y se incubó 30 min a -80 °C. El ARN fue resuspendido en H₂O tratada con DEPC durante 24 horas a 4° C. Posteriormente se trató con DNAsa (Ambion, Texas, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante para eliminar cualquier resto de ADN. Esta se eliminó posteriormente por fenolización tratando con una solución de fenol ácido, el ARN fue precipitado posteriormente con etanol absoluto y resuspendido en H₂O tratada con DEPC. Se cuantificó el ARN midiendo su absorbancia a DO 260nm y se comprobó su integridad por electroforesis en geles de agarosa.

3.6.3 Marcaje de ARN, hibridación y lectura

Para la hibridación de los *arrays*, cada condición a comparar fue marcada con un fluoróforo. En todos los experimentos se usaron como fluoróforos Cy3 y Cy5

(Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia); la sonda usada en las hibridaciones consistió en la mezcla del ARN marcado con distintos fluoróforos de las condiciones a comparar; en todas las comparaciones se llevaron a cabo siempre hibridaciones con sondas recíprocas, es decir provenientes de ARN de las mismas extracciones pero marcados con los fluoróforos intercambiados. El marcaje se realizó según describe J. de Risi, y las hibridaciones se llevaron a cabo en cámaras de hibridación (ArrayIt™ #AHC, TeleChem, California, EEUU) sumergidas en un baño de agua a 58 °C, desnaturizando la sonda previamente a 95 °C durante 2 minutos. Tras 6 horas de hibridación se llevaron a cabo los lavados recomendados por el fabricante de los portamuestras usados y se secaron por centrifugación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras esto se procedió a la lectura en un escáner 418 Array Scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA).

3.6.4 Tratamiento de las imágenes y datos generados

Las imágenes obtenidas en el escáner fueron solapadas y tratadas usando el paquete informático GenePixPro 4.1 (Axon, California EEUU). Los datos generados fueron analizados utilizando el programa Excel (Microsoft Office); con este se calcularon las medias y desviaciones de las diferentes replicas de cada gen en cada hibridación, de las repeticiones y réplicas de los experimentos llevados a cabo así como de las hibridaciones recíprocas (aquellas donde se comparan las mismas condiciones pero con los marcajes recíprocos) descartando del análisis aquellos puntos que fueran detectados por el programa GenePixPro como no validos para el análisis, en virtud de una baja intensidad o una forma inadecuada. Además de estos puntos, se descartaron todos aquellos cuya suma de las intensidades obtenidas para cada fluoróforos no superara el valor arbitrario de 1000.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 El sistema PTS en *Pseudomonas putida* KT2440

4.1.1 Análisis *in silico* de genes PTS en el genoma de *P.putida* KT2440

Como se describe en la introducción de este trabajo, *P. putida* muestra una regulación por fuente de carbono sobre el promotor *Pu*; fenómeno en el que están implicados EIIA^{Ntr} y NPr, proteínas del sistema PTS. Para la señalización celular de este fenómeno, la célula necesita modular el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr}. Con estos antecedentes nos planteamos evaluar el posible papel del resto de componentes del sistema PTS en *P. putida*. Usando la información existentes en las bases de datos públicas sobre la secuencia genómica de la cepa *P. putida* KT2440 realizamos la búsqueda sistemática de genes que codifican proteínas del sistema PTS.

Para ello se realizaron BLASTs usando como sonda las secuencias de proteínas PTS descritas en otros organismos contra la base de datos de la secuencia de *P. putida* KT2440. Posteriormente se tomaron las secuencias de las ORFs de *P. putida* candidatas y se realizaron BLASTs contra la totalidad de secuencias disponibles. Con independencia del origen de la sonda, las únicas ORFs que presentaban valores para una asignación fiable se resumen en la Tabla 5. De estos cinco genes, *ptsN* y *ptsO* ya se habían identificado en *P. putida*.

Tabla 5. Resumen de las similitudes con genes PTS presentadas por las ORFs de *P. putida*

ORF <i>P.putida</i>	Gen	Sonda	Valor e	% Similitud
PP0950	<i>ptsN</i>	EIIAFru_ <i>E.coli</i>	6.5e-09	52
PP0948	<i>ptsO</i>	HPr_ <i>E.coli</i>	1.9e-08	54
PP5145	<i>ptsP</i>	EI_ <i>E.coli</i>	1.7e-92	56
		EI_ <i>E.coli</i>	1.3e-96	56
PP0793	<i>fruB</i>	FPr_ <i>E.coli</i>	8e-11	52
		EIIA_ <i>E.coli</i>	5e-34	49
PP0795	<i>fruA</i>	EIIBCFru_ <i>E.coli</i>	1.3e-142	66

Para profundizar en su posible función analizamos tanto los dominios que presentaban las proteínas como el contexto cromosómico. Como ya se había descrito, EIIA^{Ntr} presenta un único dominio, que abarca toda la secuencia polipeptídica, presente en las proteínas EIIA del sistema PTS. NPr, pertenece a la familia de enzimas HPr (Fig. 16). Ambas proteínas tienen conservados los residuos intercambiadores de fosfato característicos de estas proteínas.

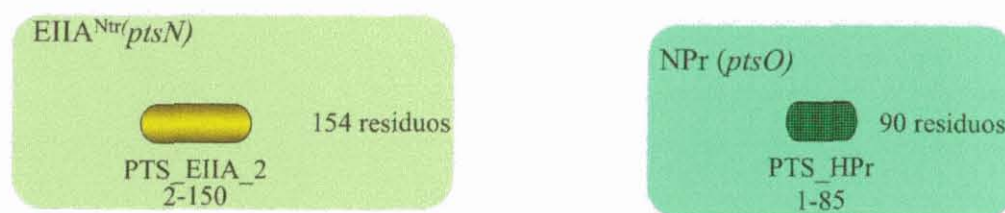


Figura 16. Representación de la estructura de dominios de las proteínas EIIANtr y NPr. EIIANtr presenta un solo dominio llamado PTS_EIIA_2 que cubre prácticamente todo el polipéptido. Este dominio se haya presente en las proteínas EIIA del sistema PTS. NPr presente un solo dominio llamado PTS_HPr, que cubre también prácticamente todo la proteína y que se haya presente en las proteínas PTS del tipo HPr.

El resto genes presentan combinaciones de dominios PTS, y en el caso de *ptsP* presenta además un dominio regulador tipo GAF. Este dominio se encuentra en proteínas con muy diversas funciones; esta presente en reguladores transcripcionales, como NifA o FlhA, pero también en fosfatasa, fosfodiesterasas y otras proteínas transmisoras de señales; se ha propuesto que esta implicado en procesos de regulación dependiente de GMPc (Yew-Seng *et al.*, 2000). Tanto PtsP como FruB presenta los dominios denominados PEP_utiliser, presentes en proteínas que unen fosfoenolpiruvato (PEP); pero solo en los EI, se presentan las tres variantes, PEP-util_N, PEP-util, y PEP-util_C, y siempre dispuestas en ese orden. Ninguna otra ORF del genoma de *P. putida* presenta dominios PEP_utiliser, salvo la PEP sintasa que presenta un dominio PEP_utiliser y otro PEP-utiliser_C, como en ocurre en las PEP sintasas de otros organismos (Fig. 17A y B).

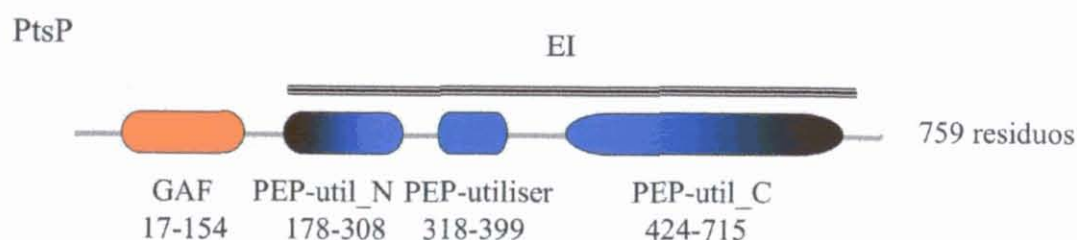


Figura 17 A. Estructura de dominios presentes en la proteína PtsP. PtsP presenta un dominio GAF, presente en proteínas como NifA o FlhA y también en fosfatasas y fosfodiesterasas, al que se le ha propuesto un papel en la regulación por GMPC. Junto a este presenta la combinación y disposición de dominios PEP_utiliser que constituyen el dominio EI de las proteínas PTS.

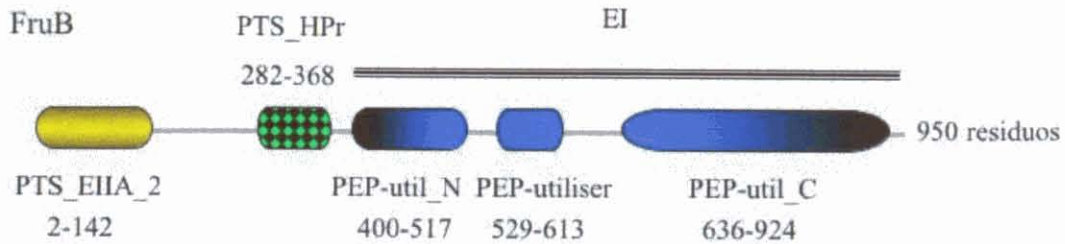


Figura 17 B. Estructura de dominios presentes en la proteína FruB. FruB presenta la combinación y disposición de dominios PEP_utiliser que constituyen el dominio EI de las proteínas PTS fusionado a los dominios PTS_HPr y PTSEIIA_2 correspondientes a los dominios HPr y EIIA de las proteínas del sistema PTS.

FruB, presenta además de dominio EI, un dominio HPr y un dominio EIIA, con las histidinas fosforilables de cada uno conservadas en su secuencia. Completa las proteínas PTS presentes en *P. putida* FruA, que posee un dominio EIIB asociado a un dominio EIIC.

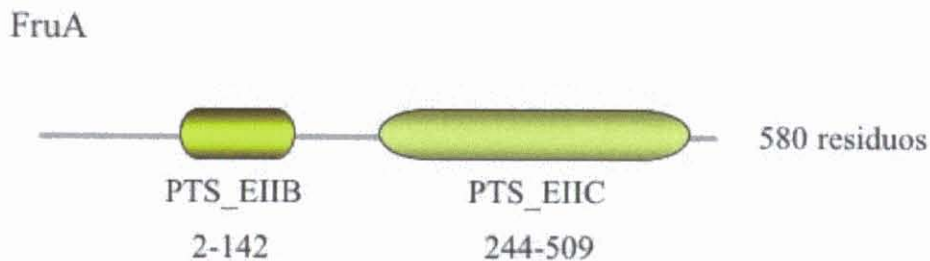


Figura 17 C. Estructura de dominios presentes en la proteína FruA. FruA presenta asociados un dominio EIIB y uno EIIC de proteínas del sistema PTS.

Analizamos también el contexto cromosómico de los distintos genes. Como se indica en la Figura 18, *fruA* y *fruB* se encuentran en un mismo agrupamiento génico relacionado con el metabolismo de la fructosa.

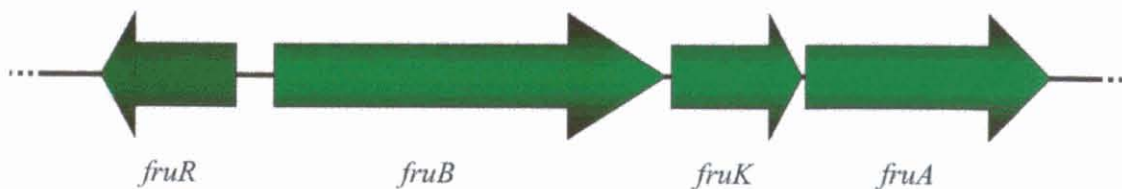
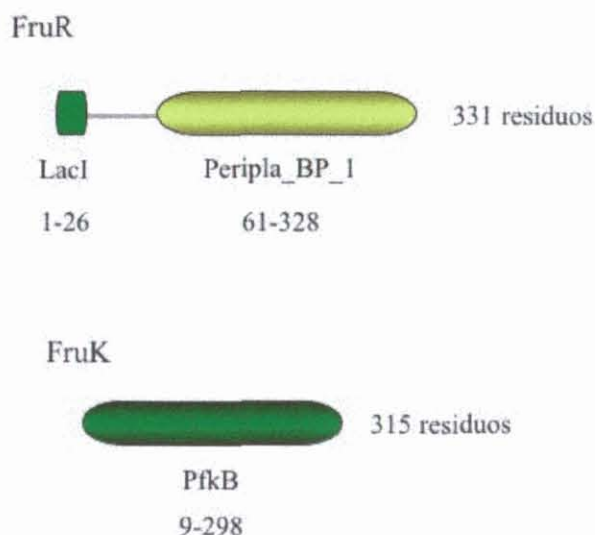


Figura 18 . Esquema del agrupamiento génico de los genes *fruAB*

En este mismo agrupamiento génico se encuentra *fruK* que codifica para una quinasa de fructosa 1-fosfato. El agrupamiento se completa con un regulador transcrito en la dirección contraria (Tabla 6). Esta estructura génica se encuentra conservada en otros organismos, como *P. aeruginosa*, o *P. syringae* pero no en enterobacterias.

Tabla 6. Anotación del agrupamiento génico de los genes *fruAB*

ORF	Gen	Función
PP0792	<i>fruR</i>	Represor transcripcional del operón <i>fruBKA</i>
PP0793	<i>fruB</i>	Componentes EI/HPr/EIIA específicos de fructosa
PP0794	<i>fruK</i>	1-fosfofructoquinasa
PP0795	<i>fruA</i>	Componentes EIIBC específicos para fructosa



Como se describe en la Figura 19 *fruR* presenta la estructura de dominios de un tipo de regulador transcripcional. Con un dominio llamado LacI, presente en regulador del operón de la lactosa de *E. coli* y otro reguladores, y un dominio Peripla_BP_1 presente en proteína con capacidad de unión de azúcares.

Figura 19. Estructura de los dominios presentes en las proteínas FruR y FruK (ver texto)

La proteína FruK presenta un único dominio presente en las quinasas de fructosa 1 fosfato, llamado PfkB.

El análisis del contexto cromosómico de *ptsP* no aporta información sobre la función de este gen (Tabla 7).

Tabla 7. Anotación del contexto cromosómico del gen *ptsP*

ORF	Función
PP5143	Sin determinar
PP5144	Sin determinar
PP5145 (<i>ptsP</i>)	Fosfotransferasa del sistema PTS
PP5146	Putativa (di)nucleosido polifosfato hidrolasa
PP5147	hidrolasa

4.1.2 Análisis de las funciones celulares del sistema PTS

4.1.2.1 Utilización de la fructosa como única fuente de carbono y energía

Dada la asignación que hacíamos del agrupamiento *fruRBKA* decidimos analizar la capacidad de un mutante defectivo en FruB para utilizar distintos compuestos como únicas fuentes de carbono. Como se indica en la Tabla 9 el mutante *fruB* es incapaz de usar la fructosa como única fuente de carbono y energía mientras que crece con casaminoácidos, LB o glucosa.

4.1.2.2 Papel de PtsP en la síntesis de PHAs

Como se mencionó en la introducción, genes del sistema PTS han sido involucrados en otros procesos celulares diferentes del transporte de carbohidratos (Cases *et al.*, 1999; Postma *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1995; Rabus *et al.*, 1999; Reizer *et al.*, 1999; Saier and Reizer, 1994; Segura and Espin, 1998). *ptsP* había sido identificado previamente en *P. aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii* y *E. coli* con distintas funciones. En *P. aeruginosa* se le había otorgado un papel en proceso infectivo usando el modelo de infección de *C. elegans* (Tan *et al.*, 1999). En *E. coli* se le ha implicado como un EI asociado a NPr y EIIA^{Ntr} en una cascada de señalización que une el metabolismo del carbono y el nitrógeno. En *A. vinelandii* se le ha vinculado en el proceso de enquistamiento y la síntesis de PHAs (Segura and Espin, 1998). Con estos antecedentes decidimos analizar los posibles papeles de *ptsP*. Por un lado determinamos la relación con las funciones de NPr y EIIA^{Ntr} ya descritas en *P. putida*, y por otro con el proceso de síntesis de PHAs. Como se observa en la Figura 20 el mutante defectivo en PtsP tiene disminuida la capacidad de acumular PHAs en un

medio donde la cepa silvestre si lo hace. Esta diferencia fenotípica no aparece cuando en el ensayo se realiza en un medio en el que se ha reducido la concentración de amonio 10 veces. Por otro lado, si expresamos *ptsP* desde un promotor inducible en un plásmido se produce una hiperacumulación del polímero con independencia de la composición del medio.

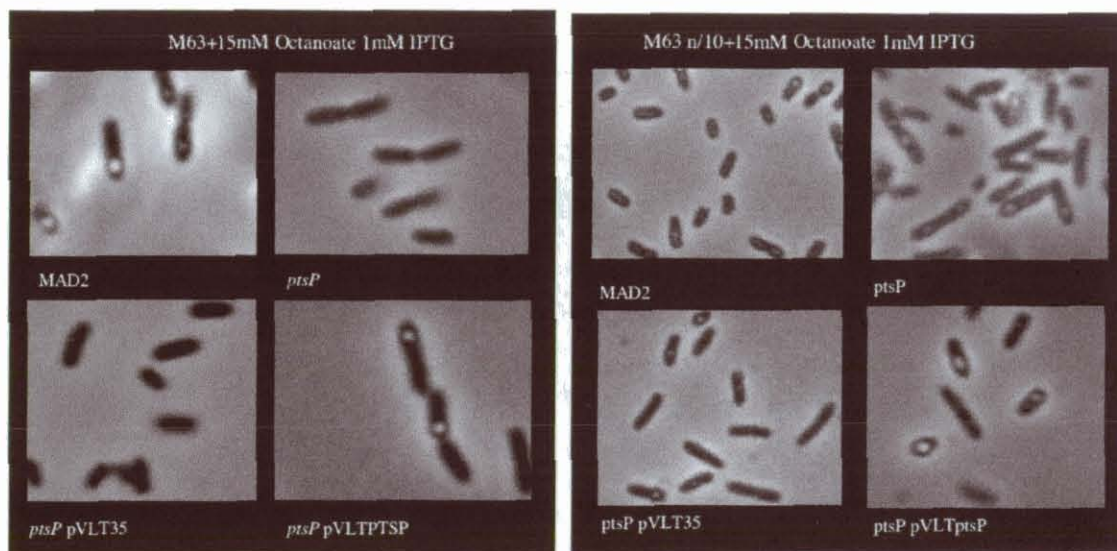


Figura 20. Visualización de la acumulación de PHAs intracelular en *P. putida* MAD2, *ptsP* y al sobreexpresar *ptsP* en los mismo fondos genéticos (ver texto).

4.2 Represión por fuente de carbono

4.2.1 El sistema PTS y el promotor *Pu*

Como se ha comentado anteriormente (Rabus *et al.*, 1999) se había propuesto un papel coordinado para las proteínas PtsP, NPr y EIIA^{Ntr}. Y dado que tanto EIIA^{Ntr} como NPr participan en la represión por glucosa ejercida sobre el promotor *Pu* y además el papel de EIIA^{Ntr} en este fenómeno depende de la fosforilación de la histidina 68, nos planteamos examinar el papel de las únicas proteínas con dominios EI de *P. putida* (PtsP y FruB) en la regulación por glucosa del promotor *Pu*. Como se observa en la Figura 21, tanto los mutantes nulos para estos genes, como el mutante doble *ptsP fruB*, presentan unos niveles de represión por glucosa similares al silvestre.

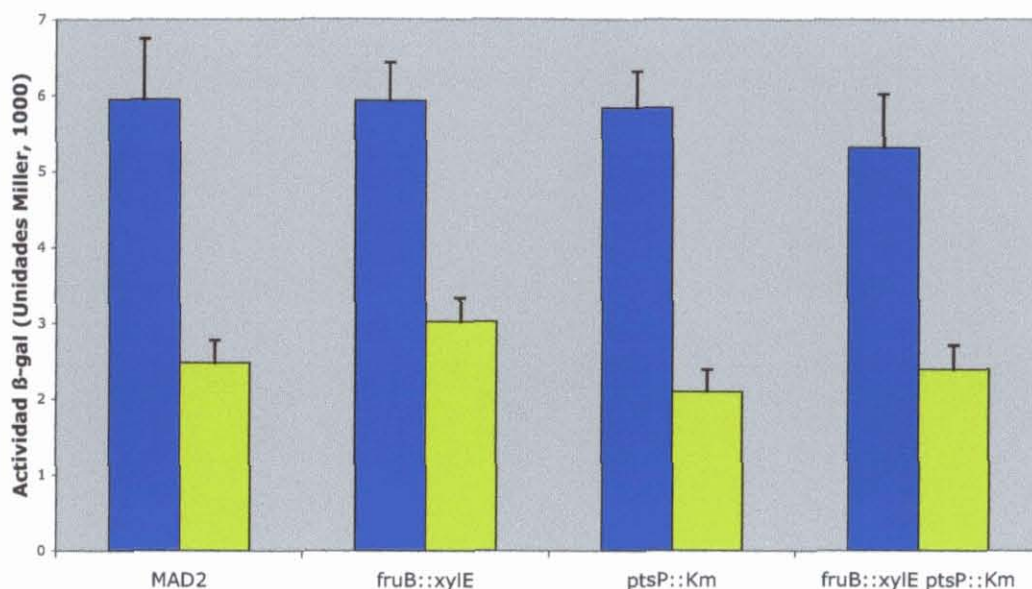


Figura 21. Represión por glucosa del promotor *Pu* en diferentes fondos genéticos en *P. putida*

Dado que la forma fosforilada de EIIA^{Ntr} es necesaria para la represión se concluye que otro tipo proteína, no PTS, es la encargada suministrar el fosfato a la cascada.

4.2.2 Metabolismo de azúcares en *P. putida*

Como se mencionó en la introducción no todas las fuentes alternativas de carbono reprimen *Pu*. Así mientras que la glucosa o el gluconato ejercen esta represión otros compuestos como la fructosa no lo hacen. Para entender estas diferencias nos planteamos analizar cuales son las capacidades que presenta *P. putida* para el metabolismo de los azúcares. Usando la información disponible en las bases de datos y en el genoma anotado, elaboramos un esquema (Fig. 22) de la capacidad de *P. putida* para metabolizar estos azúcares. En la Tabla 8 se presenta la anotación de las ORFs que componen el esquema.

Observamos que *P. putida* posee la capacidad de metabolizar fructosa tanto vía Entner-Doudoroff como Embden-Meyerhof. Formando fructosa 1,6 bisfosfato, por acción de la fosfofructoquinasa, puede después seguir ambas vías. Sin embargo la glucosa y el gluconato solo pueden ir vía Entner-Doudoroff ya que *P. putida* carece de una quinasa para fructosa 6-fosfato (Fig. 22).

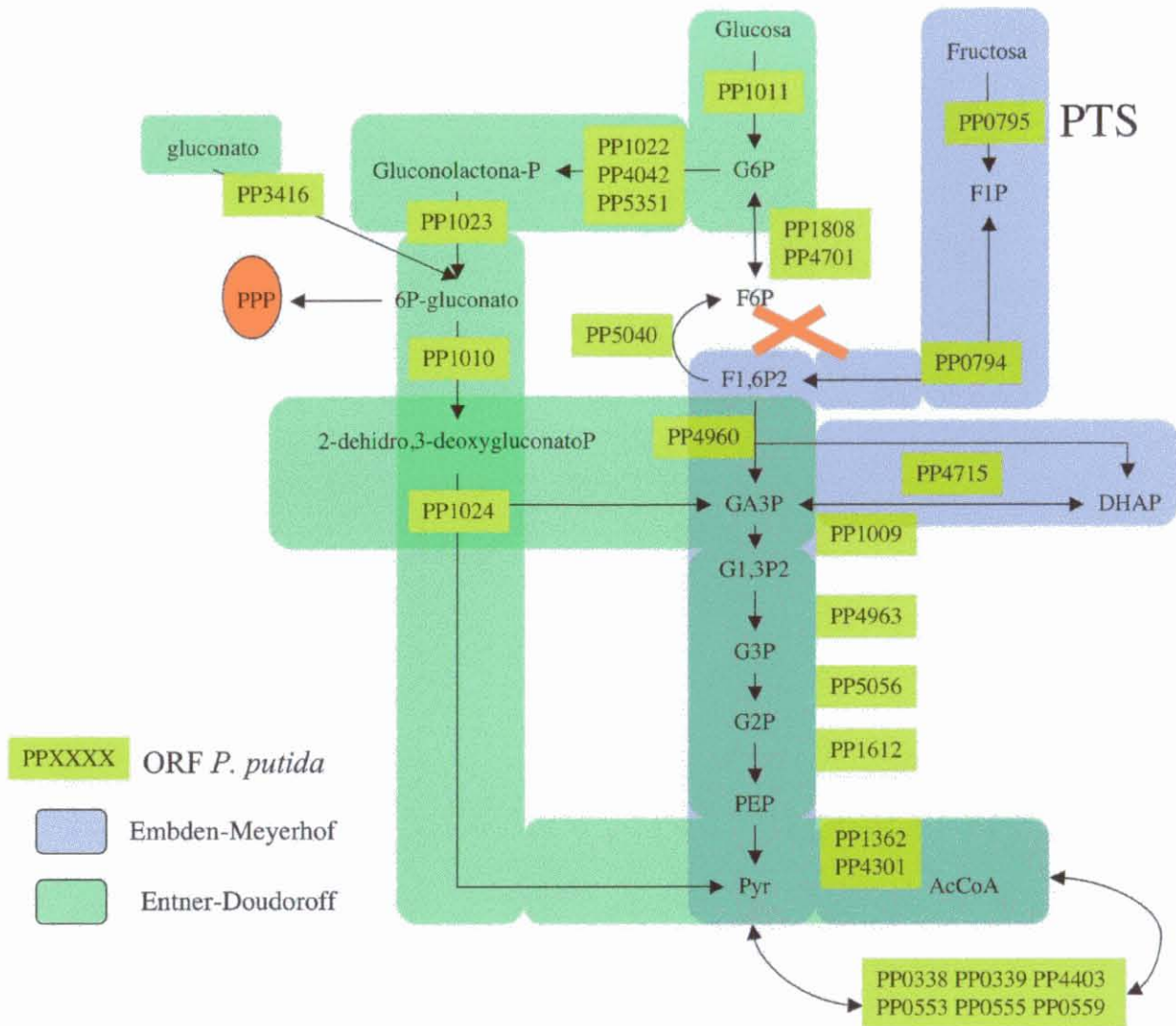


Figura 22. Esquema de las rutas presentes en *P. putida* para el metabolismo de glucosa, gluconato y fructosa. Con sombreados de distintos colores se marcan las rutas Embden-Meyerhof y Entner-Doudoroff. En recuadros amarillos aparece el numero de las bases de datos correspondientes a la enzimas que llevan a cabo las transformaciones; las flechas indican el sentido de las reacciones. PTS indica el paso en el que el sistema PTS de fructosa (*fruAB*) transporta y fosforila la fructosa extracelular. PPP en rojo indica la conexión con el ciclo de las pentosas fosfatos. Unas aspas rojas resaltan la ausencia de la fructosa 6-fosfato quinasa.

Aunque ambas rutas confluyen en los productos finales, el rendimiento en ATP y poder reductor generado son diferentes. Por lo que nos planteamos si las diferencias que presentaban la glucosa y el gluconato con la fructosa en la regulación del promotor *Pu* se derivaban estas diferencias en el rendimiento de sus respectivos metabolismos. En este punto nos planteamos que o bien es la aparición de un catabolito común a la glucosa y el gluconato o bien eran otras señales, como una variación del estatus energético las que disparan la represión. En este contexto analizamos el posible papel *cyoB* y *crc*, otros genes relacionados con la represión por fuente de carbono, para *cyoB* al menos el efecto global que produce esta mas

relacionado con una variación en el estatus energético que en la aparición de un metabolito (Dinamarca *et al.*, 2002).

Tabla 8. Anotación de los genes que codifican para las proteínas del metabolismo de la glucosa, gluconato y fructosa presentes en la Figura 22.

ORF	Gen	Función
PP0338	<i>aceF</i>	Piruvato deshidrogenasa
PP0339	<i>aceE</i>	piruvato deshidrogenasa, componente E1
PP0553	<i>acoC</i>	acetoina deshidrogenasa
PP0555	<i>acoA</i>	acetoina deshidrogenasa, subunidad alfa
PP0559	<i>accB</i>	acetil-CoA carboxilasa
PP0794	<i>fruK</i>	Fosfofructoquinasa
PP795	<i>fruA</i>	EIIBC PTS
PP1009	<i>gap1</i>	GA3P deshidrogenasa
PP1010	<i>edd</i>	Gluconato6P Dhasa
PP1011	<i>glk</i>	Glucoquinasa
PP1022	<i>zwf1</i>	G6P Dhasa
PP1023	<i>pgl</i>	Fosfogluconolactonasa
PP1024	<i>eda</i>	2-dehidro-3-deoxifosfogluconato aldolasa
PP1362	<i>pykA</i>	piruvato quinasa 2
PP1808	<i>pgi1</i>	Fosfohexosa isomerasa
PP3416	<i>gnk</i>	Gluconato quinasa
PP4042	<i>zwf2</i>	Gluconato6P Dhasa
PP4043	<i>gnd</i>	6-fosfogluconato deshidrogenasa
PP4301	<i>pykF</i>	piruvato quinasa 1
PP4701	<i>pgi2</i>	Fosfohexosa isomerasa
PP4702	<i>acsB</i>	Acetil CoA sintetasa
PP4715	<i>tpiA</i>	Triosa -P isomerasa
PP4960	<i>fda</i>	Fructosa 1,6 bisP aldolasa
PP4963	<i>pgk</i>	Fosfoglicerato quinasa
PP5040	<i>fbp</i>	Fructosa 1,6 bisP fosfatasa
PP5056	<i>pgm</i>	Fosfoglicerato mutasa
PP5351	<i>zwf3</i>	Gluconato6P Dhasa

4.2.3 *cyoB* y *crc* en la represión por glucosa del promotor *Pu*

cyoB codifica la ubiquitinol citocromo B oxidasa, y se le ha implicado en la represión catabólica de la ruta de degradación de alcanos codificada en el plásmido OCT de *P. putida* GPo1 (Dinamarca *et al.*, 2002) y en la ruta de degradación de fenol de *P. putida* (pPGH1) (Petruschka *et al.*, 2001). Por otra parte, *crc* fue descrito por primera vez en la represión que se ejerce en el transporte de manitol en presencia de succinato en *P. aeruginosa* (Wolff *et al.*, 1991). Aunque su mecanismo de actuación es desconocido, en un mutante nulo de *crc* el succinato no aparece como una fuente represora para la captación de manitol.

Decidimos pues evaluar el efecto de los mutantes nulos de estos genes en el fenómeno de represión por glucosa del promotor *Pu*. Como se observa en la Figura 23, el mutante *cyoB* presenta unos niveles de expresión similares al silvestre; sin embargo en el mutante *crc* aunque no llega a abolirse completamente la represión, se observa cierta reducción de esta.

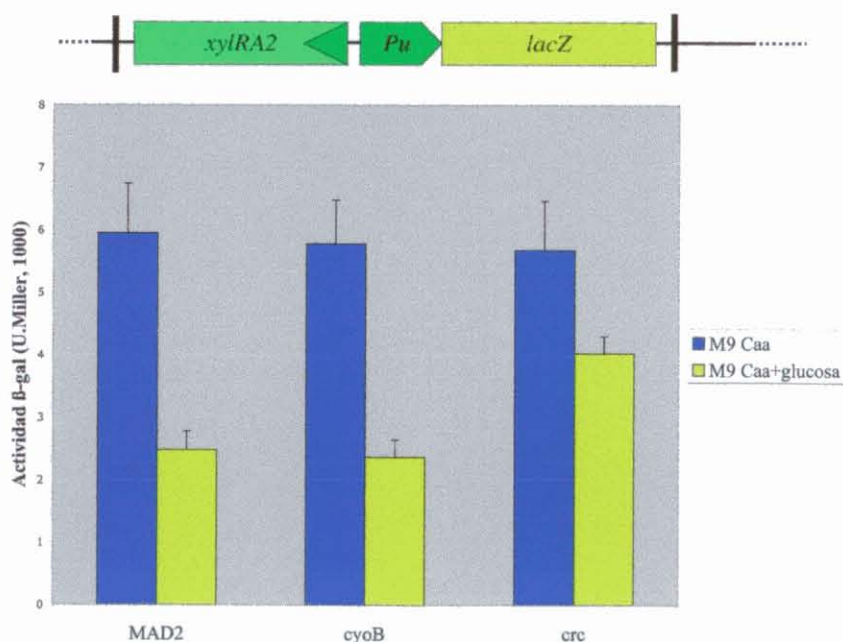


Figura 23. Represión por glucosa del promotor *Pu* en los fondos *cyoB* y *crc* de *P. putida* MAD2.

4.2.4 *eda* y *fda* en la represión por glucosa del promotor *Pu*

Para determinar si nos encontrábamos de verdad frente a un fenómeno de represión por catabolito decidimos analizar la expresión de *Pu* en presencia de glucosa o fructosa en cepas con el metabolismo de carbohidratos alterado. En este contexto se

realizaron los mutantes nulos para los genes *fda* y *eda*. *fda* codifica la fructosa 1,6 bisfosfato aldolasa, y *eda* la 2-ceto, 3-deoxi fosfogluconato aldolasa (Fig. 22), las aldolasas centrales de cada ruta. Con estos mutantes se pretende desviar el metabolismo de la glucosa y la fructosa; de esta manera si es un metabolito determinado el que provoca la señalización de la represión podríamos evitar que se produzca o generarlo en condiciones que normalmente no ocurre. Como se deduce de la Figura 22 un mutante en el gen *fda* no tiene mas alternativa que desviar el metabolismo de la fructosa hacia la ruta Entner-Doudoroff; esto supone recorrer prácticamente el mismo camino metabólico que la glucosa; como se observa en la Tabla 9 este mutante es capaz de crecer con fructosa como única fuente de carbono, indicando que esta rama tiene relevancia fisiológica.

Tabla 8. Esquema de la capacidad de crecimiento con distintas fuentes de carbono y energía de distintos fondos genéticos relevantes de *P. putida*. ++++ supone un 100 % de crecimiento tomando como referencia el crecimiento en placas con LB de la cepa *P. putida* MAD2. +++ 80 -75 %. ++ 75 - 50 %. + 50 - 1 %. - No crecimiento

CEPA	LB	MM+Caa	MM+GLU	MM+FRU
MAD2	++++	+++	+++	+++
<i>ptsN</i>	++++	+++	+++	+++
<i>ptsO</i>	++++	+++	+++	+++
<i>ptsP</i>	++++	+++	+++	+++
<i>fruB</i>	++++	+++	+++	-
<i>eda</i>	++++	+++	-	-
<i>fda</i>	++++	+++	+++	+++

Como se observa en la Figura 24 la interrupción del gen *fda* convierte a la fructosa en una fuente de carbono represora, mientras que los niveles de represión debidos a glucosa permanecen constantes.

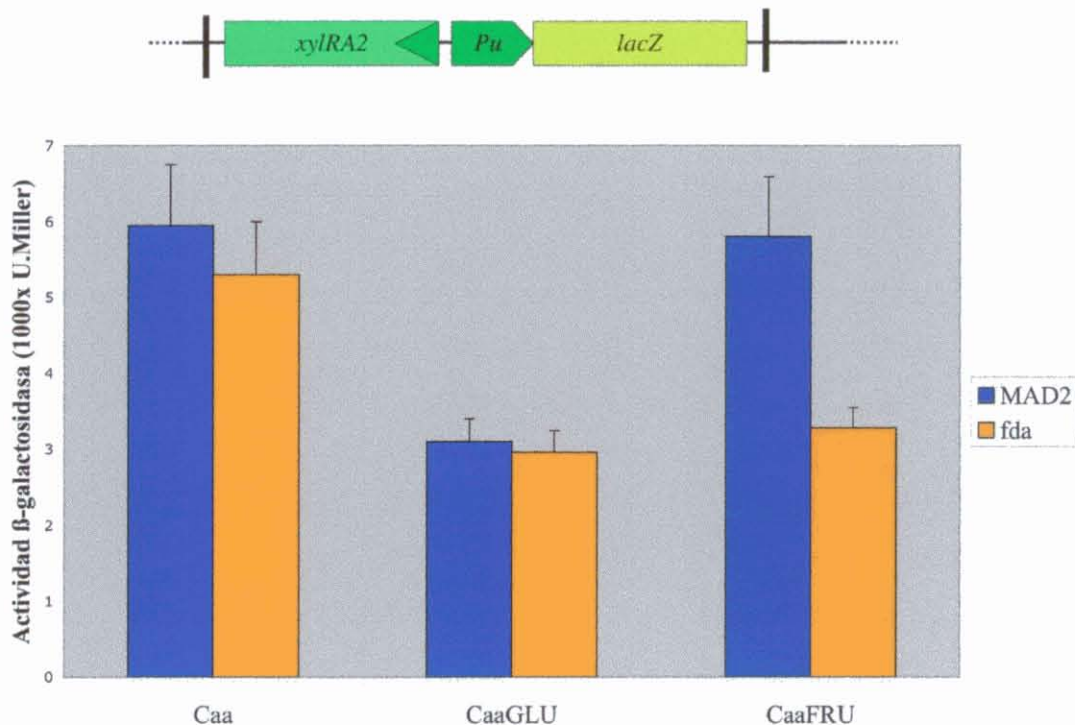


Figura 24. Represión por fuente de carbono del promotor *Pu* en el mutante *fda*.

Una mutación en el gen *eda* interrumpe la ruta ED en el 2,3 deoxiguconato 6 fosfato, lo que podría traducirse en una acumulación de los metabolitos intermedios, y aumentar la represión, sin embargo este mutante resultó sensible a la adición de glucosa por lo que no se pudieron discernir entre los efectos debido a la toxicidad y los de la glucosa en la expresión del promotor *Pu*. A la luz de todos estos datos se pone de manifiesto: (i) que la rama del metabolismo de la fructosa que se desvía hacia la ruta ED posee relevancia fisiológica, al permitir crecer al mutante *fda* en fructosa, (ii) que es un metabolito de la ruta Entner-Doudoroff el que dispara la represión por carbono del promotor *Pu*.

4.3 Efecto de diferentes sustratos de la ruta TOL *P. putida* pWW0

Los trabajos realizados sobre la expresión de la ruta TOL del plásmido pWW0 han establecido un esquema de regulación descrito en la Introducción; con una vertiente específica de respuesta a los sustratos *naturales* de la ruta, y otra global de respuesta al estatus metabólico celular y las fuentes de carbono presente. Este esquema se ha basado predominantemente en el análisis de la expresión de los cuatro promotores principales establecidos en la ruta, a menudo monitorizando con un gen reportero heterólogo, o con una actividad enzimática, operones de varias kilobases de longitud.

Esto ha permitido profundizar en el conocimiento del mecanismo de activación de la ruta, pero no permite visualizar el comportamiento de todos los genes de la misma, ni el metabolismo global de la célula. Con objeto de extender el conocimiento que se tiene del comportamiento de las unidades transcripcionales de la ruta a lo largo de todo el operón, y de visualizar al tiempo la ruta en conjunto así como el estatus celular decidimos diseñar un *array* de ADN que nos permitiera una perspectiva mas global de los circuitos de regulación de la ruta.

4.3.1 Inductores de la ruta *upper*: *m*-xileno y 3-metil-bencilalcohol

Para analizar desde un punto de vista mas general el efecto de la inducción de la ruta TOL a nivel de las cuatro unidades transcripcionales, y al mismo tiempo que efecto si lo había podía detectarse en el estatus celular realizamos la comparación entre la expresión de un cultivo crecido en succinato como única fuente de carbono y otro al que se le había añadido *m*-xileno. Con este fin empleamos el *array* de ADN descrito en Materiales y Métodos y en el Anexo 1. En esta comparación se observa que *P. putida* (pWW0) responde a *m*-xileno induciendo todas las unidades transcripcionales de la ruta TOL (Fig. 25), y de forma moderada algunos elementos de la respuesta a choque térmico. La ruta *upper* presenta una inducción homogénea a lo largo del operón de unas 30 veces y la ruta *meta* de entre 4 y 16 veces. La expresión del regulador XylS aumenta unas 15 veces, y la de XylR unas 3 veces.

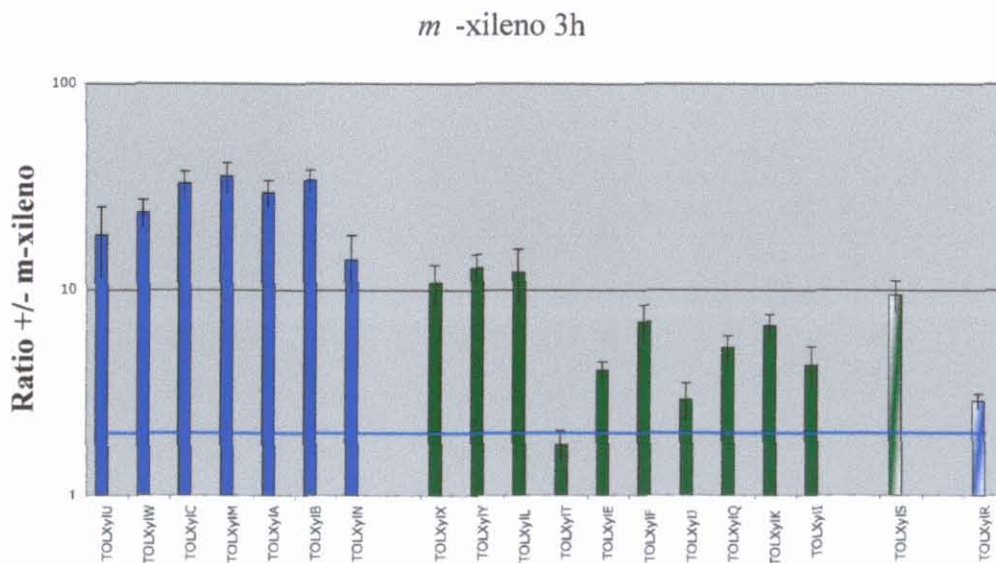


Figura 25. Inducción de la ruta TOL en presencia de *m*-xileno. Comparación de la cantidad de los transcritos correspondientes a los genes de la ruta TOL en presencia o ausencia de *m*-xileno. Los datos corresponden a la situación tras 3 horas de inducción. Una línea azul marca una inducción de 2 veces.

También observamos que se produce una inducción moderada, aunque significativa, de unas 2 veces de genes implicados en la respuesta a choque térmico y de genes implicados en la respuesta a privación de hierro (Fig. 26).

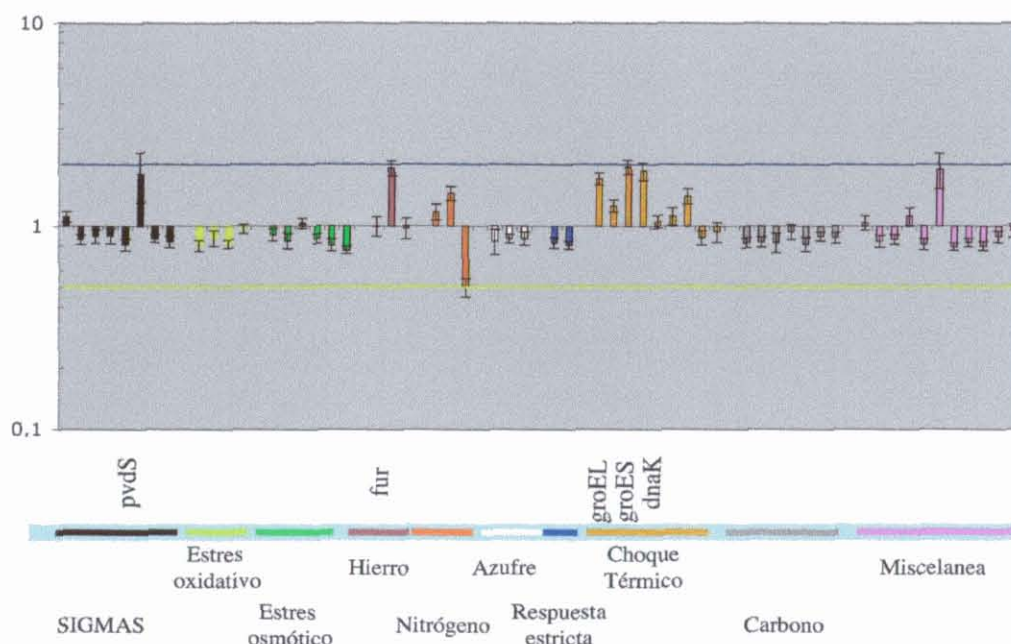


Figura 26. Efecto causado por la presencia de *m*-xileno. Una línea azul y otra amarilla marcan un aumento o disminución, respectivamente, de los niveles de transcrito en un factor de 2.

Para determinar si existen diferencias entre los efectos producidos por diferentes inductores de la ruta *upper* realizamos la comparación entre dos cultivos crecidos en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono al que le añadimos o bien *m*-xileno o bien 3-metil-bencilalcohol.

Como se observa en la Figura 27, el comportamiento de las distintas unidades transcripcionales no es igual. Mientras que la ruta *upper* y *xyIS* no presentan diferencias en la inducción, la inducción de la ruta *meta* causada por el 3-metil-bencilalcohol es mayor que la causada por *m*-xileno. También los niveles del transcrito de *xyIR* son mayores en presencia de 3MBA.

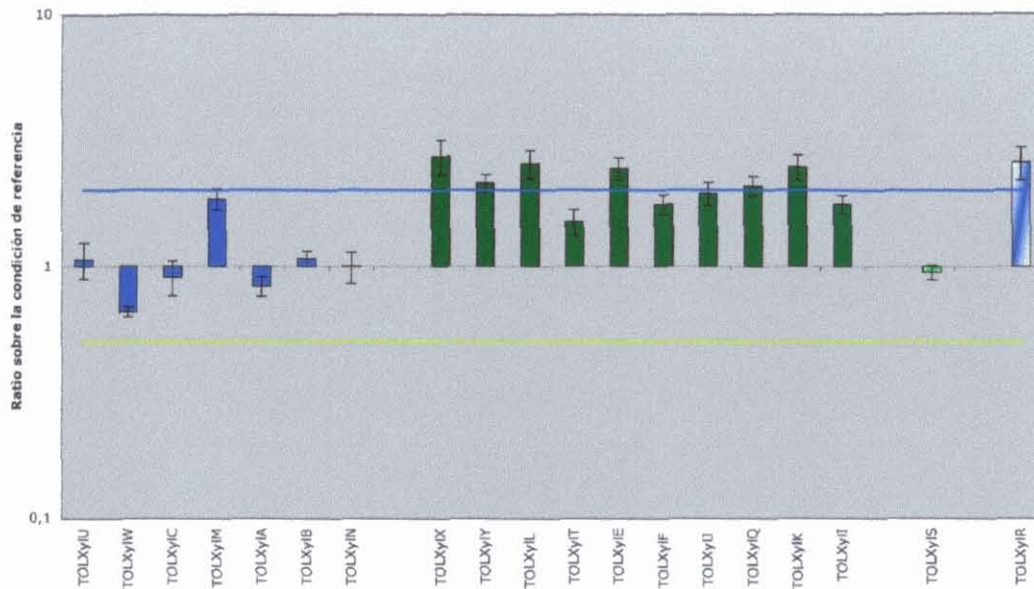


Figura 27. Comparación entre la expresión de la ruta TOL en presencia de *m*-xileno y 3MBA. Los datos corresponden a una inducción de 15 minutos. Se separaron dos subcultivos provenientes de un cultivo en M9+succinato a DO 600nm de 0.5, induciendo durante 15 minutos, uno con *m*-xileno y otro con 3MBA.

En la Figura 28 se observa la comparación del efecto causado a nivel general.

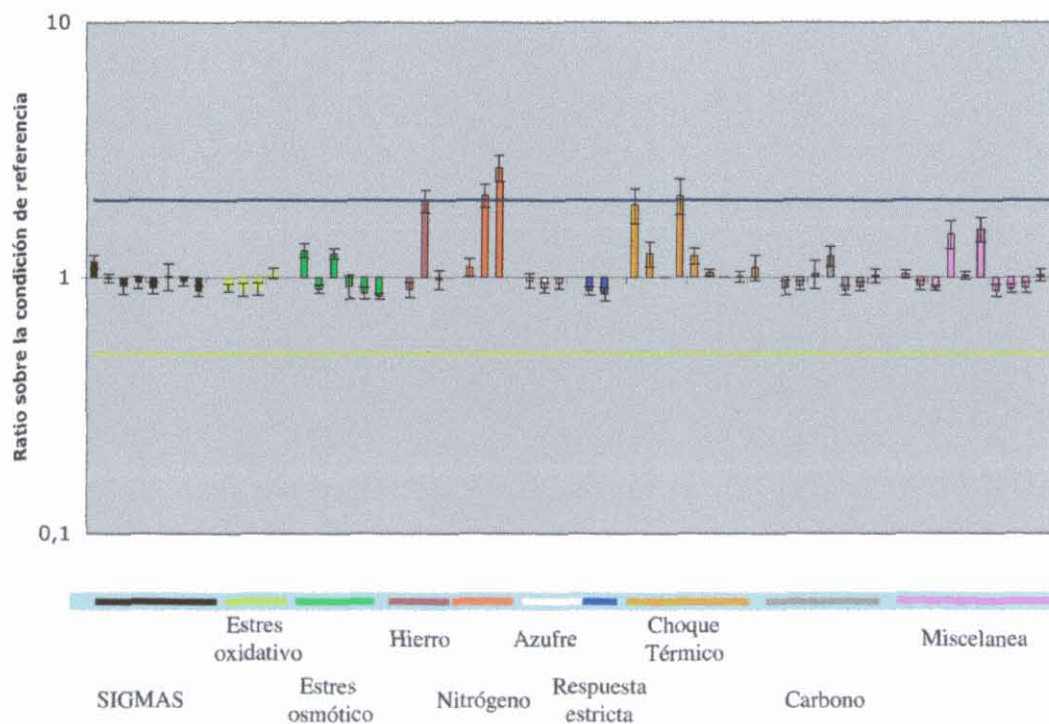


Figura 28. Comparación entre la expresión de los genes descriptors del estatus celular en presencia de *m*-xileno y 3MBA. Los datos corresponden a una inducción de 15 minutos. Se separaron dos subcultivos provenientes de un cultivo en M9+succinato a DO 600nm de 0.5, induciendo durante 15 minutos, uno con *m*-xileno y otro con 3MBA

El efecto que producen ambos inductores en los genes descriptores del estatus celular colocados en el *array* de ADN es prácticamente el mismo, detectándose una mayor inducción en 3-metil-bencilalcohol de *fur*, *dnaK*, *groEL*, y *glnA* y *gltB* (Fig. 28).

4.3.2 Inducción de la ruta *meta*

Para visualizar la inducción de la ruta *meta* realizamos la comparación entre un cultivo crecido con succinato como única fuente de carbono y energía y otro igual al que le añadimos 3-metilbenzoato. Como se observa en la Figura 29 la ruta *meta* responde a la presencia del substrato aumentando sus niveles de transcrito aunque a unos niveles menores que en presencia de *m*-xileno (Fig. 25 y 29); los niveles de *xylR* y *xylS* permanecen inalterados; el operón *upper* presenta un aumento de los segmentos correspondientes a los genes *xylC* y *xylM*. No se observan diferencias significativas en ninguno de los genes cromosómicos colocados en el *array* (datos no mostrados).

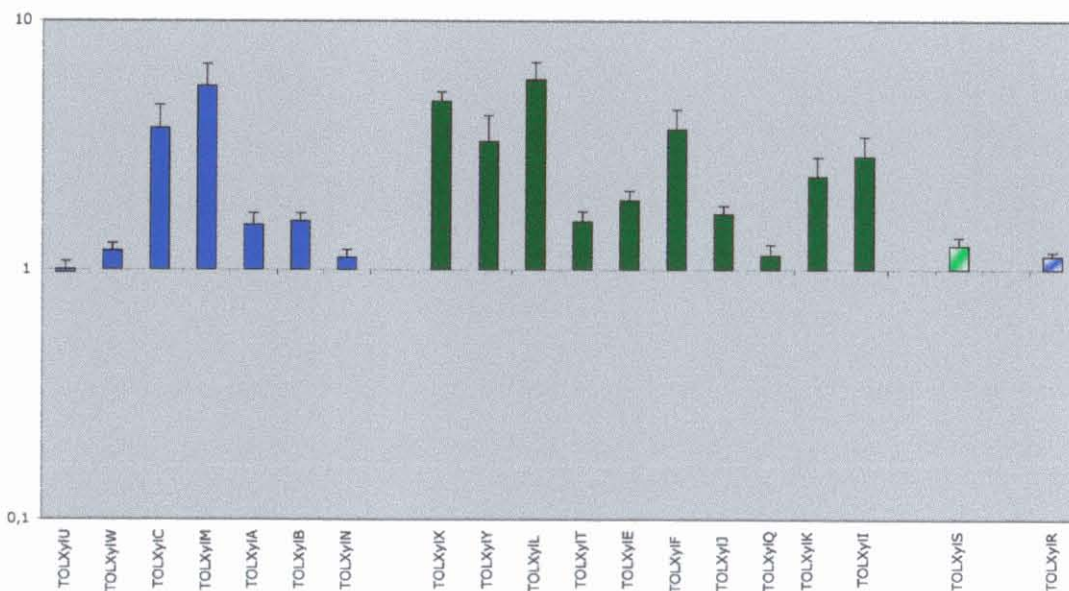


Figura 29. Comparación de los niveles de transcrito de los genes de la ruta TOL entre cultivos en presencia/ausencia de 3-metilbenzoato tras 15 minutos de exposición al efector.

4.3.3 Regulación cruzada de las ramas *upper* y *meta*

Para el proceso de completa inducción de la ruta TOL se ha descrito que la adición de un substrato activador de XylR produce la inducción de la ruta *upper*, y la sobreproducción de XylS. Esta última dispararía la inducción de la ruta *meta* para cuando, como consecuencia de la acción de la ruta *upper*, los substratos de XylS se produzcan; trabajos previos han demostrado que la mera sobreexpresión del regulador

XylS es suficiente para activar la transcripción desde el promotor *Pm* (Duetz *et al.*, 1994; Gallegos *et al.*, 1996; Inouye *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1987). Para visualizar las variaciones de los niveles de transcrito durante este proceso, y observarlo en su conjunto, realizamos un experimento a distintos tiempos de inducción. Al comparar los niveles de transcrito tras 15 minutos de inducción con *m*-xileno con los niveles a las 3 horas se observa que los niveles de la ruta *upper* y de *xylS* son ligeramente superiores o prácticamente iguales a las 3 horas; los niveles de transcrito de la ruta *meta* aumentan claramente a las 3 horas, pero no se detecta ese aumento a los 15 minutos (Fig. 30). Para discernir si el retraso en el aumento de los transcritos de la ruta *meta* era debido a la falta de substratos de XylS o al tiempo necesario para la acumulación de XylS realizamos una comparación de los niveles de transcrito provocados por el *o*-xileno, efector no metabolizable de XylR tras 3 horas de inducción (Fig. 31). Según Marqués (Marques *et al.*, 1999) el promotor *Pm* requiere la actuación de los factores sigma alternativos RpoH o RpoS).

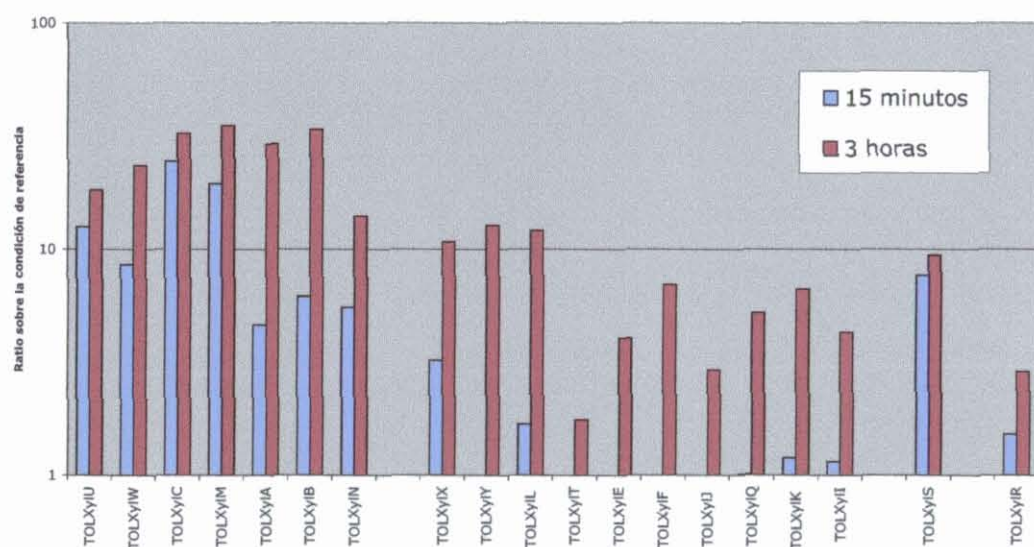


Figura 30. Comparación del aumento de los niveles de transcrito provocado por el *m*-xileno tras 15 minutos, barras azules, y 3 horas de inducción., barras granas. La línea azul marca una inducción de 2 veces.

La Figura 31 muestra como el *o*-xileno produce un aumento de *Pu* y *Ps* (~10 veces) pero no es capaz de producir una expresión significativa de la ruta *meta* incluso a tiempos largos

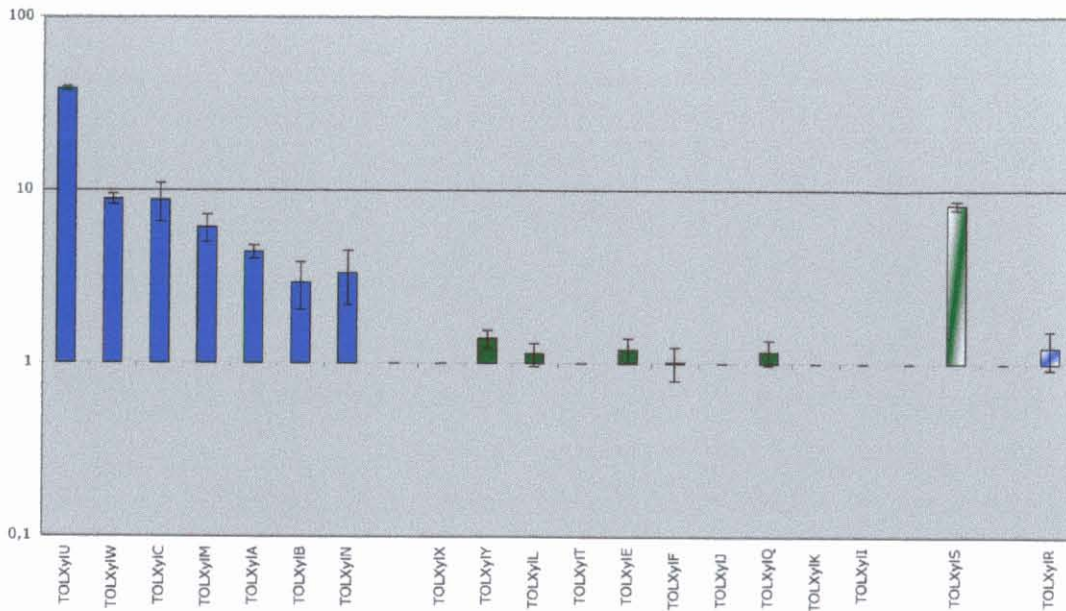


Figura 31. Comparación de los niveles de transcrito entre un cultivo de *P. putida* mt-2 en M9+Succinato y otro a las 3 horas de inducción con *o*-xileno.

Resultados congruentes con los observados en los experimentos de *arrays* con *o*-xileno (Fig. 31) se obtuvieron estimando la cantidad de Xyle que codifica para la catecol 2,3 dioxigenasa (Tabla 10), en el operón *meta*, bien por ensayo enzimático o por inmunodetección (Fig. 32).

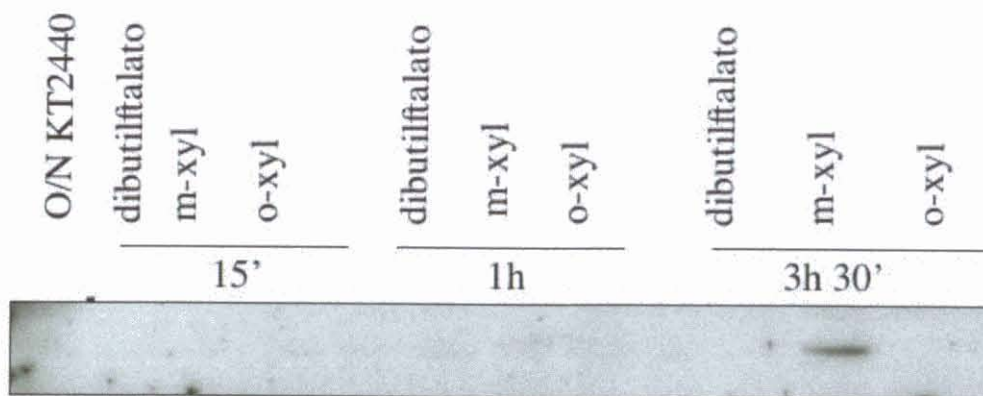


Figura 32. Inmunodetección de Xyle en la cepa *P. putida* mt-2 en presencia de *m*-xileno, *o*-xileno o dibutilftalato (solvente utilizado en la preparación de soluciones de *m*-, *o*-xileno) tras 15 minutos, 1 hora y 3 horas 30 minutos de la adición del compuesto correspondiente.

Tabla 10. Resumen de la estimación de la actividad catecol 2,3 dioxigenasa en distintas condiciones de cultivo. Las unidades relativas se calcularon, dividiendo la cantidad de producto generado, por la DO 600nm y el tiempo de duración de la reacción. El producto generado se calculó usando $46000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción molar.

Cultivo	DO 600 nm	Unidades Relativas
Dibutilftalato	1.3	0.2197
<i>m</i> -xileno	1.01	1.501
<i>o</i> -xileno	1.1	2.2705

4.4 Efecto de distintos tipos de estreses en la expresión de la ruta TOL

Las bacterias se ven sometidas en el medio ambiente a una gran variedad de condiciones y de estreses, a los que tienen que responder, y que pueden determinar sus capacidades metabólicas. Para analizar el posible efecto de diferentes tipos de estreses en las capacidades degradativas de *P. putida* (pWW0) abordamos con los *arrays* de ADN estos posibles efectos. La tecnología de los *arrays* nos permite monitorizar una serie de genes descriptores del estatus metabólico de la célula, y al mismo tiempo analizar el comportamiento de la ruta TOL en su conjunto frente a diversos estreses. Realizamos una serie de experimentos donde por un periodo de 15 minutos, sometimos a un cultivo en fase exponencial a un conjunto de alteraciones en las condiciones de cultivo, mientras una replica de este se mantuvo en las condiciones estándar de crecimiento (M9 + Succinato 10 mM, 30°C).

4.4.1 Efecto del estrés nutricional

Para evaluar el efecto de distintos tipos de estreses, decidimos someter cultivos a DO 600nm $\sim 0,5$ de *P. putida* mt-2 a diferentes alteraciones en las condiciones de cultivo. Por una lado se provocó la privación de distintos nutrientes (fuente de carbono, nitrógeno, hierro y oxígeno), y por otro se provocaron distintos tipos de daños celulares añadiendo sustancias tóxicas a concentraciones subletales al medio de cultivo. La falta de nutrientes es una de las señales más evidentes a las que un microorganismo tiene que enfrentarse; la disponibilidad de nutrientes en el medio ambiente se presenta de forma dispersa y transitoria, y es habitual que las bacterias se enfrenten a ciclos de privaciones para diferentes nutrientes (Varnam, 2000).

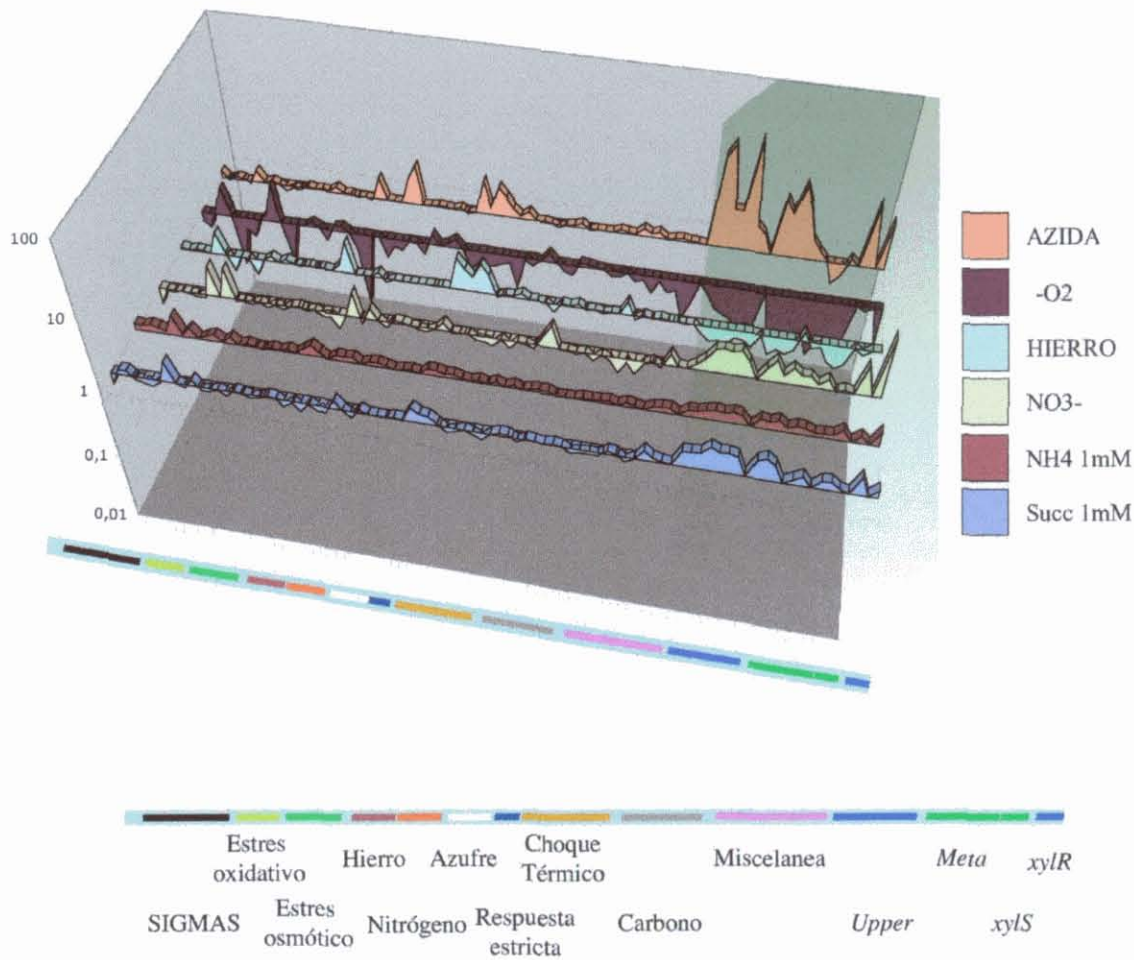


Figura 33. Resumen de los efectos en los niveles de transcripción de genes descriptores del estatus celular, y de las rutas TOL (señaladas por un sombreado), provocados por la privación de diferentes nutrientes, y por la adición de azida sódica (un inhibidor de la cadena de transporte de electrones)

En la Figura 33, se resumen los efectos de la privación de diferentes nutrientes en los niveles de transcrito de los genes colocados en el *array*. Por un lado vemos que una bajada en la concentración de las fuentes de carbono o nitrógeno, o bien la sustitución del amonio por nitrato como fuente de nitrógeno provoca una aumento en los niveles de transcrito de la rutas TOL. Este aumento al cambiar de fuente de nitrógeno se observa de forma mas evidente cuando monitorizamos la expresión del promotor *Pu* por ensayo de actividad β -galactosidasa usando la cepa *P. putida* MAD2 (Fig. 34).

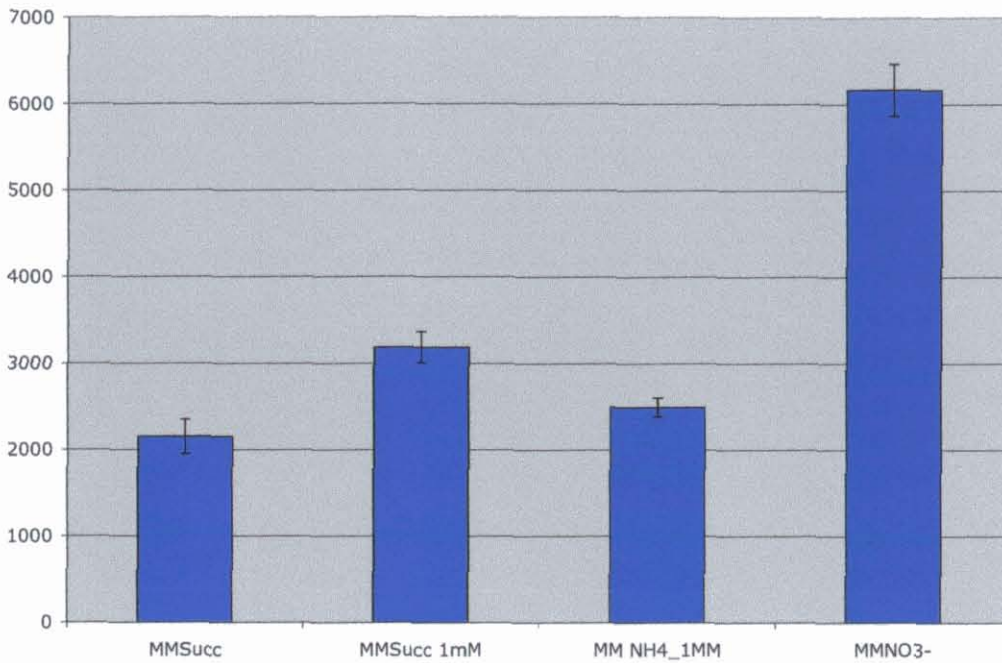


Figura 34. Ensayo de actividad del promotor *Pu* frente a distintos estreses provocados por el descenso de distintos nutrientes. Las barras representan la media de los valores, después de media hora del cambio de condiciones de cultivo, tres experimentos independientes. El medio de cultivo base usado fue M9+succinato 10 mM+Tritón X-100, 0.05%.

Por otro lado, disminuciones tanto en la concentración de hierro como la tensión de oxígeno, producen una inhibición de la ruta. La adición de azida sódica, para desestabilizar la cadena de transporte de electrones, produce un aumento de 5-10 veces de los transcritos de la ruta TOL. Este aumento no se manifiesta de igual manera para los distintos segmentos, así dentro del operón *meta*, el aumento se reduce a 2 veces para el segmento correspondiente a *xyIE* y no se detecta para los segmentos correspondientes a los genes *xyIFJQKI*.

4.4.2 Efecto del estrés ambiental

4.4.2.1 Estrés provocado por tóxicos

Como se ha comentado previamente, existen otro tipo de situaciones a las que las bacterias tienen que hacer frente en el medio ambiente, como cambios en la temperatura o la presencia de tóxicos que afectan a diversos procesos celulares. En este contexto realizamos experimentos para visualizar los efectos de la adición de

arsénico, mitomicina C y paracuat y los provocados por un cambio brusco de temperatura de 30 a 42 °C.

Como se muestra en la Figura 35, la adición de diferentes tóxicos provoca una variaciones en los niveles de transcrito de los genes descriptores de estreses colocados en el *array*; observamos una aumento en los niveles de las chaperonas de choque térmico, frente al choque térmico, de los transcritos de *recA* y *recN* frente al daño en ADN provocado por la mitomicina C. El paracuat produce una inducción de *catA*, una catalasa como respuesta al daño por estrés oxidativo, aunque la mayor inducción se produce en los transcritos correspondientes a los genes *ssuD* y *cysK*, genes relacionados con el metabolismo del azufre; el arsénico provoca una respuesta con elementos comunes con la provocada por la privación de hierro; aunque al regulador Fur también se le implicado en otros procesos no relacionado con el metabolismo del hierro; frente al arsénico también se observa una inhibición de *algU* y *sodB*. Estos dos genes son inhibidos por el arsénico, y activados por la microaerofilia; aunque la relación entre estas dos condiciones no es evidente, pone de manifiesto una posible coregulación de ambos genes.

Si analizamos el comportamiento de la ruta TOL en conjunto frente a estos estreses, (Fig. 35) observamos que responde al choque térmico y a la adición de paracuat, con una disminución de los niveles de mensajero, permanece inalterada frente al daño en ADN provocado por la mitomicina C, y aumenta los niveles frente a la adición de arsénico. El choque térmico implica generalmente la activación del factor sigma alternativo σ_{32} , lo que puede producir una caída de la expresión de la ruta por competición de sigmas (Jishage *et al.*, 2002; Laurie *et al.*, 2003); al necesitar la célula aumentar la proporción de núcleo de la polimerasa asociado al factor σ_{32} se produce una disminución de la proporción de polimerasa unida a otros factores σ , esto se traduciría en una caída de la expresión de algunos promotores entre ellos los de la ruta TOL bien directamente (operón *upper* y *xylS*) o bien indirectamente al descender los niveles moléculas inductoras y de XylS (operón *meta*); que otros genes presentes en el *array* no muestren este efecto es consecuencia, de que no todos los promotores sufren de igual modo la competición de sigmas; este control se ejerce a nivel de la iniciación de la transcripción, concretamente en el proceso de reconocimiento del promotor por

la holoenzima de polimerasa (núcleo de la polimerasa asociada a un factor σ). Esta etapa no resulta igual de determinante para los niveles de transcrito de todos los genes. Los genes escogidos resultan importantes en numerosos procesos, la célula no podría permitirse el efecto que sufre la ruta TOL, en genes como lo que codifican para factores sigmas, o reguladores de importantes procesos celulares.

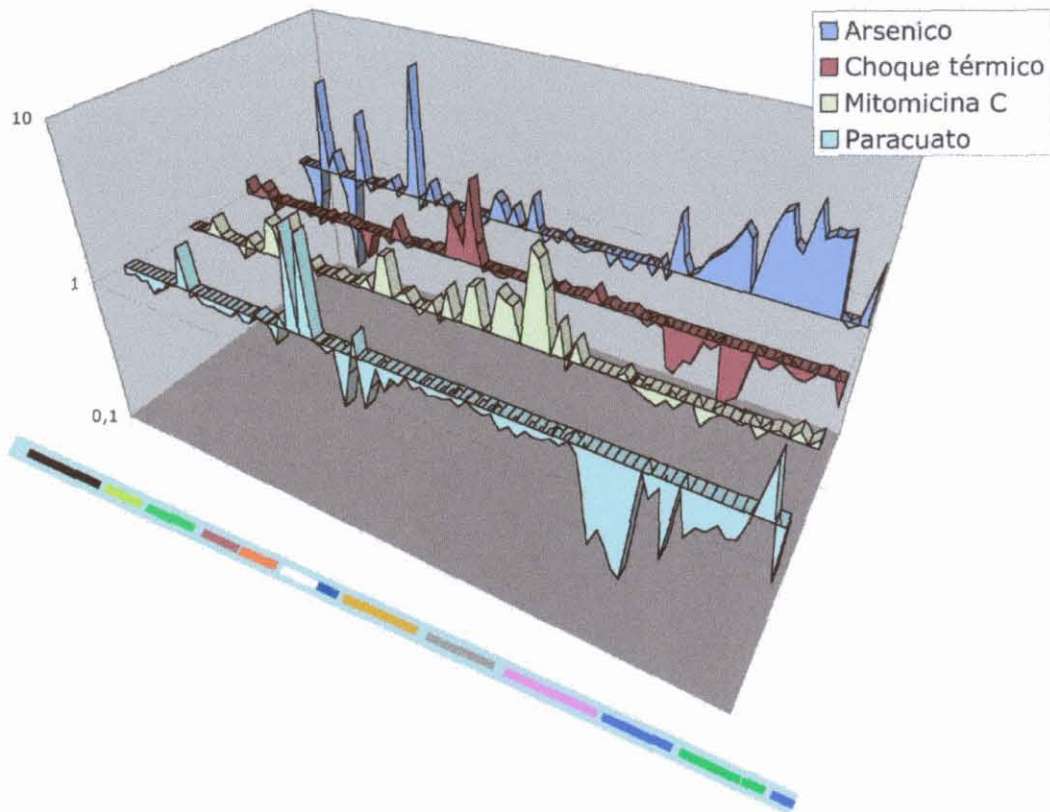


Figura 35. Efecto causado por diferentes estreses ambientales: arsénico, choque térmico, mitocina C y paracuato tras 15 minutos de exposición al estrés.

4.4.2.2 Un estresante natural: vertido de fuel

Como el abordaje de los *arrays* de ADN nos había permitido analizar la respuesta celular y de la ruta TOL frente a estresantes individuales que actuaban como señales ambientales. La disponibilidad de muestras de contaminantes reales nos llevó a plantearnos usar esta aproximación para visualizar el proceso de respuesta a un contaminante real, como era un vertido de fuel. La naturaleza compleja de este contaminante nos daba la oportunidad de visualizar los efectos que sobre las capacidades degradativas de *P. putida* mt-2 provocaba diversos estreses al mismo tiempo.

Para visualizar estos efectos, realizamos comparaciones de los niveles de transcrito de un cultivo al que se la ha añadido fuel frente a otro de referencia, a cuatro tiempos distintos desde la adición de fuel: 15 minutos, 1 hora, 3 y 4 horas (Anexo 2). Como se observa en la Figura 36 la célula responde a los 15 minutos aumentando los niveles de genes pertenecientes a todos los grupos de descriptores colocados en *array* (Fig. 36). Como en estos experimentos no se añadieron efectores para XylR o XylS, no se detectan mensajeros de ninguno de los operones catabólicos de la ruta TOL (datos no presentados).

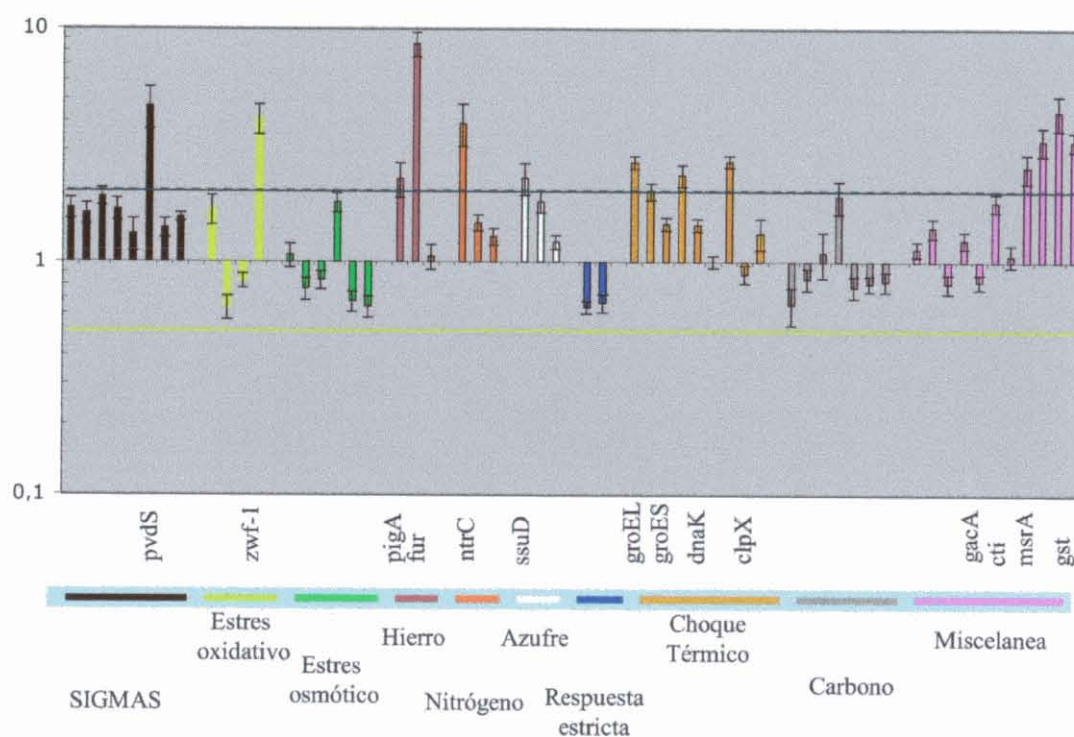


Figura 36. Ratio de los niveles de transcritos de los genes descriptores a los 15 minutos de la adición de fuel.

Tras 1 hora de la adición de fuel, se observa que son los mismos genes que tras 15 minutos presentaban cambios en los niveles de transcrito los que los presentan en este segundo punto, pero la magnitud de estos ha descendido por debajo de una inducción de 2 veces o desaparecido (Fig. 37). Tampoco se detectan cambios en los niveles de transcrito de la ruta TOL (datos no presentados).

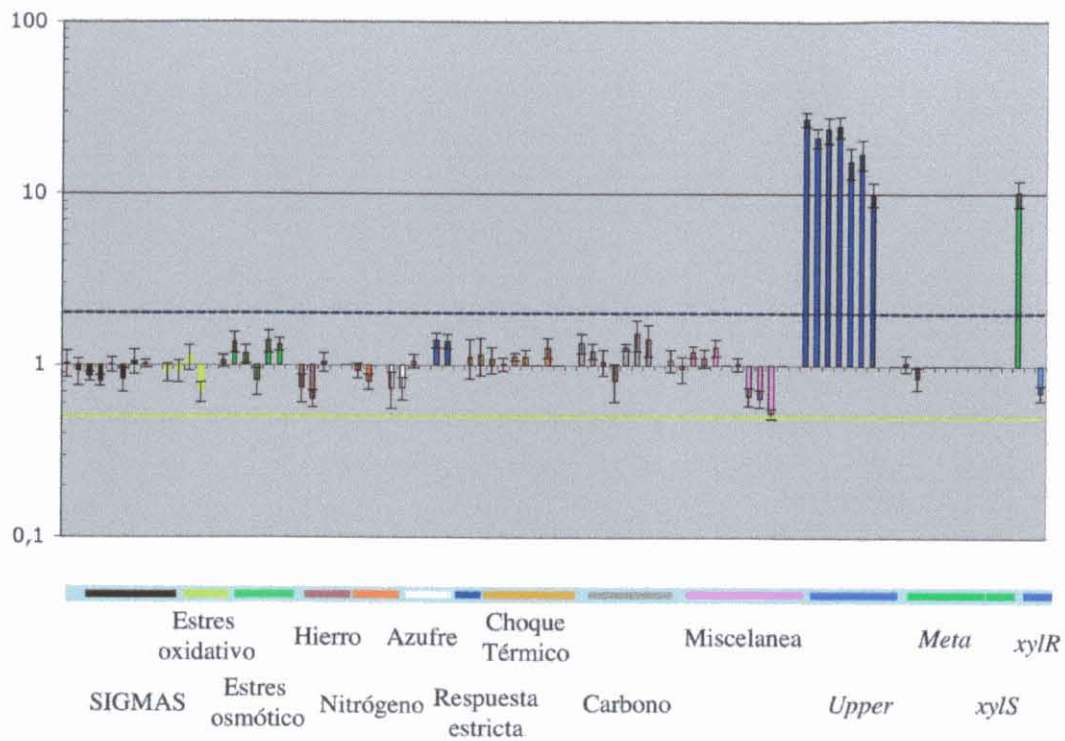


Figura 38. Ratio de los niveles de transcritos de los genes descriptores 3 horas después de la adición de fuel.

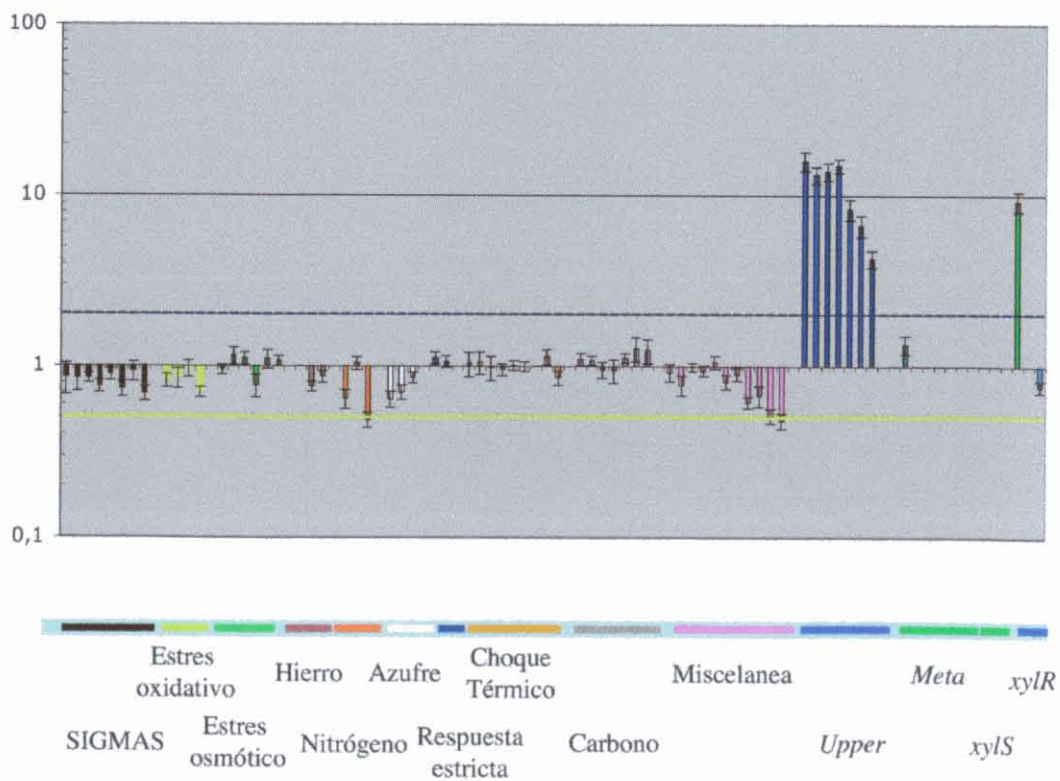


Figura 39. Ratio de los niveles de transcritos de los genes descriptores 4 hora después de la adición de fuel.

Nos planteamos si la falta de expresión de la ruta TOL en las primeras fases de respuesta al fuel se debía a una inhibición de la ruta ante el estrés creado por el contaminante, o bien a una falta de disponibilidad de moléculas efectoras de la ruta. Para responder a esta cuestión realizamos un ensayo donde monitorizamos la expresión del promotor *Pu* en la cepa *P. putida* MAD1 y una variante de esta que lleva el plásmido pWW0 (Fig. 40). En este ensayo se observa que tanto *P. putida* MAD1 como *P. putida* MAD1 (pWW0) son capaces de responder a *m*-xileno incluso en presencia de fuel. Lo que nos indica que la falta de expresión de la ruta durante las primeras fases, no es el resultado de una inhibición causada por la presencia del fuel. Cuando se analiza la respuesta a fuel se observa que hay discrepancias entre la inducción observada en la cepas *P. putida* MAD1, que no es capaz de disparar la expresión de *Pu* en respuesta fuel incluso tras varias horas después de la adición al medio de cultivo del contaminante, y la respuesta que se produce en la variante *P. putida* MAD1 (pWW0).

El aumento de los niveles de transcrito de la ruta TOL producido por la adición de fuel se restringe a la ruta *upper* y al promotor de *xylS*, siguiendo el patrón de respuesta de un efector gratuito de XylR (Fig. 31-32). Para comprobar que en estas condiciones la ruta *meta* se haya realmente silenciada se realizó la inmunodetección del producto del gen *xylE* en extractos de células expuestas a fuel en el que fue imposible detectar ninguna señal en los extractos solo con fuel (datos no mostrados).

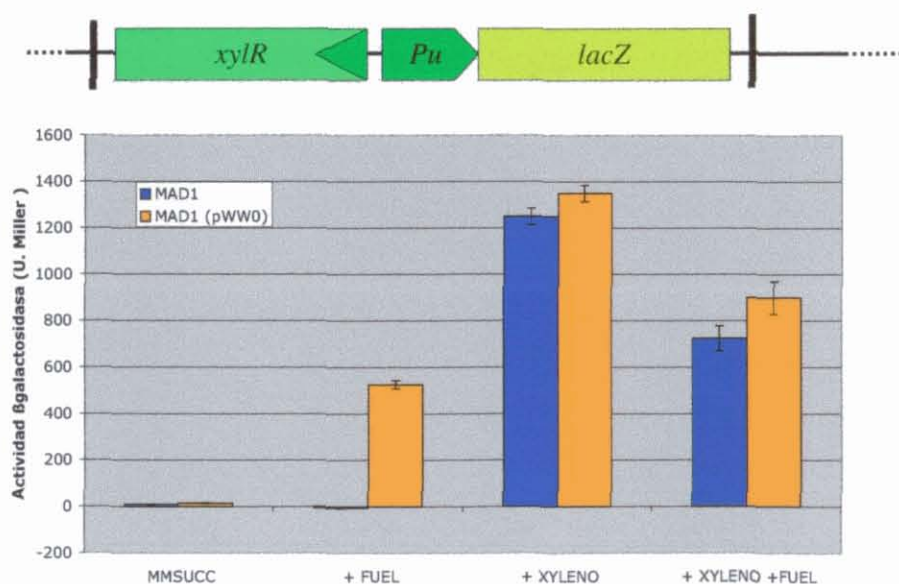


Figura 45. Inducción del promotor *Pu* tras 3 horas de la adición de *m*-xileno, fuel o ambos en las cepas *P. putida* MAD1 y *P. putida* MAD1 (pWW0).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 El sistema PTS en *Pseudomonas putida* KT2440

En el contexto presentado en la Introducción, nos marcamos dentro de los objetivos iniciales de este trabajo el analizar la composición y función de la cascada de fosfotransferasas que constituyen el sistema PTS en *P. putida* KT2440. La disponibilidad de la secuencia genómica durante el tiempo de desarrollo de este trabajo (Nelson *et al.*, 2002) nos ha permitido la búsqueda de todos los genes de esta familia presentes en el cromosoma. Del análisis de la secuencia se deduce claramente la existencia cinco genes de esta familia. Realizando búsquedas por BLAST identificamos 5 ORFs en *P. putida*: *ptsN* y *ptsO* (que ya habían sido descritas) *fruA*, *fruB* y *ptsP* (Tabla 5). Esto supone un sistema PTS reducido, si lo comparamos con otros organismos como *E. coli* que posee más de cuarenta genes PTS; sin embargo no es extraño para bacterias del grupo de las *Pseudomonas*, donde encontramos que *P. aeruginosa* posee cinco homólogos a los presentes en *P. putida* y dos genes PTS adicionales; *P. syringae* posee exactamente 5 genes homólogos a los de *P. putida* (www.tigr.com).

fruA y *fruB* y el metabolismo de la fructosa

FruA y FruB presentan una alta similitud de secuencia con proteínas EIIBC y EI, HPr y EIIA respectivamente (Fig. 17B y 17C). Ambas proteínas se encuentran agrupadas en el cromosoma (Fig. 18); entre *fruB* y *fruA*, se encuentra la ORF *fruK* que codifica para una quinasa de fructosa 1-fosfato. Corriente arriba y transcrita en sentido contrario se encuentra la ORF *fruR* que presenta similitud de secuencia con reguladores transcripcionales incluyendo un dominio de unión a ADN (Fig. 19). Para todas estas proteínas, en la búsqueda por BLAST se obtuvo una mayor similitud con proteínas implicadas en el metabolismo de la fructosa. Todos estos datos nos indicaban un papel claro en el metabolismo de la fructosa. En trabajos de los años 60 y 70 se había sugerido que la fructosa entraba en *Pseudomonas* vía PTS (Sawyer *et al.*, 1977). Para comprobar este papel decidimos realizar el mutante defectivo para FruB y observar su efecto en la capacidad usar fructosa como fuente de carbono y energía. Como se observa en la Tabla 9, este mutante es incapaz de crecer con fructosa, mientras que si lo hace con glucosa o casaminoácidos. Con este experimento

se confirma que *P. putida* incorpora la fructosa vía un sistema específico PTS. Este sistema se encuentra asociado en el cromosoma a la primera enzima necesaria para su posterior metabolismo, la quinasa de fructosa 1-fosfato. La fructosa 1-fosfato generada por la acción del sistema PTS sería sustrato de la acción de FruK que rendiría fructosa 1,6-bisfosfato para engarzar con el metabolismo de azúcares.

ptsP

En el caso de PtsP, se trata de una proteína de 759 aa, que posee una región (aa. 178-715) que presenta similitud de secuencia con proteínas del tipo EI (Fig. 17A). Estas proteínas son las responsables de la fosforilación de las HPr a partir del fosfato procedente del fosfoenolpiruvato (Fig. 2). PtsP posee una región amino-terminal que presenta un dominio GAF. Este dominio se encuentra en proteínas con muy diversas funciones en procariontes, eucariotes, y arqueas. Forma parte de fosfodiesterasas reguladas por GMPC, activadores transcripcionales como NifA o FlhA, adenilato ciclasas y otras proteínas transmisoras y receptoras de señales (Yew-Seng *et al.*, 2000). PtsP había sido descrito en otros organismos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter vinelandii*. En *E. coli* se le otorga un papel como nexo entre el metabolismo del carbono y el del nitrógeno conjuntamente con *ptsO* y *ptsN* (Rabus *et al.*, 1999) aunque no existen evidencias experimentales de que desempeñen esta función. Experimentos *in vitro* demuestran la capacidad que tienen de establecer una cadena de fosfotransferasas: PtsP, NPr y EIIA^{Ntr}, y una mayor afinidad entre ellas que por otras proteínas PTS en *E. coli*. En *A. vinelandii* se le ha relacionado con el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico, y en la síntesis de PHAs (Segura and Espin, 1998).

Dados estos fenotipos y que el contexto cromosómico no aporta más información (Tabla 7) decidimos evaluar si PtsP desempeñaba un papel en la síntesis de PHAs en *P. putida*. Como se muestra en la Figura 20 el mutante *ptsP* presenta una disminución de la capacidad de síntesis de PHAs con respecto al silvestre; esta disminución se revierte cuando se reduce 10 veces la concentración de fuente de nitrógeno. Esto avalaría la hipótesis sugerida (Rabus *et al.*, 1999) sobre el papel de *ptsP* como nexo entre el metabolismo de carbono y el de nitrógeno.

Por otro lado cuando sobreexpresamos *ptsP* desde un plásmido y bajo el control de un promotor inducible, logramos una sobreacumulación de PHAs independientemente del medio. Dado el fenotipo, *ptsP* podría ser utilizado para el diseño de las estrategias de producción de estos biopolímeros y aumentar los rendimientos actuales (Durner *et al.*, 2001; Kessler and Witholt, 2001; Zinn *et al.*, 2001). En el contexto de este trabajo no se ha determinado si otras proteínas PTS participan junto con PtsP en la regulación de la acumulación de PHAs; sería interesante determinar si la transferencia de fosfatos es necesaria para que PtsP desempeñe el papel que tiene, y profundizar si este está relacionado con el metabolismo del nitrógeno. Por otro lado no se tienen ninguna evidencia de que sea un efecto directo sobre la maquinaria de síntesis de PHAs ni si este efecto es a nivel transcripcional de la polimerasas de PHAs, o sobre la actividad de éstas.

5.2 La represión por fuente de carbono sobre el promotor *Pu*

5.2.1 Papel de PTS

Como se describe en la introducción de este trabajo *ptsN* y *ptsO* están involucrados en el fenómeno de represión por fuente de carbono que sufre el promotor *Pu* en presencia de glucosa o gluconato. Trabajos anteriores han demostrado que este control depende del estado de fosforilación de EIIA^{Ntr}. *ptsO* codifica una proteína tipo HPr, necesitamos pues una proteína EIIBC y una proteína EI para completar una cascada PTS canónica. Además se ha sugerido, que PtsP establece una cascada con NPr y EIIA^{Ntr}. Como se muestra en la Figura 21, ninguno de los EIs identificados en el genoma participa de este fenómeno de represión. Lo que pone de manifiesto la participación de proteínas de otra familia en la cadena de señalización desde la glucosa hasta EIIA^{Ntr}. Esto constituye una novedad en cuanto al funcionamiento de las proteínas PTS, mas aún teniendo en cuenta que el fosfato que pasa por el residuo H68 de EIIA^{Ntr} no lo introduce en la cascada una proteína EI. Por tanto alguna histidina quinasa cromosómica debe estar jugando este papel. No se han citado ejemplos fosfotransferencias entre proteínas PTS y otras proteínas. Y aunque se han descritos quinazas que fosforilan proteínas PTS, no lo hacen en el mismo residuo, sino en otros residuos con función reguladora, donde el fosfato no se incorpora a la cascada. Este comportamiento no canónico de las proteínas PTS de *P. putida* no es lo único anómalo del sistema PTS en este fenómeno de represión; en anteriores trabajos se

señalado que en el control por glucosa del promotor *Pu* el comportamiento de la cascada se aleja del funcionamiento estándar. Experimentos con mutaciones dirigidas del sitio de fosforilación de EIIA^{Ntr} sugieren que es la forma fosforilada de esta la encargada de disparar la represión. Dado que el doble mutante *ptsO ptsN* presenta un fenotipo idéntico al mutante simple *ptsN* se deduce un flujo de fosfato desde EIIA^{Ntr} hacia NPr, justo al contrario de lo descrito para el sistema PTS, donde es la proteína HPr la que transfiere el fosfato desde una tipo EI hasta una tipo EIIA (Fig. 3). Aquí nos encontramos un caso donde no existe EI, y el flujo de fosfato va en dirección contraria. Además los estudios sobre la señalización de la represión por glucosa en *E. coli* indican que la presencia de glucosa en el medio es señalizada por la forma no fosforilada del EIIA involucrado en ese caso.

Todo estos resultados nos presentan un panorama donde las enzimas PTS han sido reclutadas para funciones reguladoras pero no se ha conservado el esquema de funcionamiento del sistema PTS. *P. putida* ha conservado únicamente el esquema canónico de funcionamiento de las proteínas PTS para la captación de fructosa y se ha desprendido del resto de las proteínas PTS salvo PtsP, NPr y EIIA^{Ntr} a las que ha reclutado para funciones reguladoras alejadas de este esquema general de funcionamiento.

5.2.2 Metabolismo de azúcares: *fda*, *eda*, *cyoB* y *crc*

Compuestos como la glucosa y el gluconato son fuentes de carbono que provocan el fenómeno de la represión, otros como la fructosa no afectan a la expresión del promotor *Pu*; aunque la fructosa es el único azúcar que se transporta vía PTS y proteínas de esta familia participan de la señalización. Por experimentos hechos con α -metilglucosido, un análogo no metabolizable de la glucosa pero que si es transportado al citoplasma, se sabía que la transformación de la glucosa es necesaria para que se produzca la inhibición del promotor *Pu*. Con estos datos nos propusimos analizar las alternativas que *P. putida* KT2440 presenta para el metabolismo de la glucosa y la fructosa. Para ello, con el mismo abordaje empleado en la caracterización del sistema PTS buscamos los homólogos en la secuencia genómica de *P. putida* KT2440 de las enzimas para el metabolismo de glucosa, gluconato y fructosa. Como se describe en la Figura 22 y en la Tabla 8, *P. putida* tiene la capacidad de metabolizar la fructosa tanto por la ruta Embden-Meyerhoff (EM) como por la ruta

Entner-Doudoroff (ED). Sin embargo la glucosa y el gluconato tienen la ruta Entner-Doudoroff como única vía metabólica. Dados estos antecedentes, realizamos mutantes defectivos en cada una de las rutas. Al interrumpir el gen *eda*, que codifica para la 2-ceto, 3-deoxi, 6-fosfo gluconato aldolasa, la ruta Entner-Doudoroff queda bloqueada. El posible escape por la ruta de las pentosas fosfato no es suficiente para permitir el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono y energía (Tabla 9). En el mutante *fda* se impide el flujo de la fructosa hacia la ruta Embden-Meyerhof; en estas condiciones se obliga a usar la ruta Entner-Doudoroff para la fructosa, este flujo permite a el mutante *fda* crecer con fructosa como única fuente de carbono y energía (Tabla 9).

Cuando analizamos la expresión del promotor *Pu* se observa en este último mutante que la fructosa pasa a ser una fuente de carbono represora (Fig. 24). Lo que nos lleva a la conclusión de que un metabolito de la ruta Entner-Doudoroff, común al metabolismo de la glucosa, el gluconato y la fructosa en el mutante *fda*, es el responsable de disparar la represión del promotor *Pu*. Analizando el camino sigue cada uno de estos compuestos en su metabolización el 6-fosfogluconato y el 2-ceto, 3-deoxi 6 fosfogluconato aparecen como los únicos candidatos. Estamos ante un caso de represión por catabolito, no sorprende por tanto que la mutación en el gen *cyoB* no afecte a la represión del promotor *Pu* ya que esta proteína está más relacionada con un estatus energético general de la célula que con la presencia de un catabolito determinado (Fig. 23). Por otra parte, el que la represión por carbono esté señalizada por la acumulación de un catabolito de la ruta ED nos ofrece una explicación para el fenotipo parcialmente desreprimido del mutante *crc* en la represión del promotor *Pu* (Fig. 23). En trabajos anteriores se ha demostrado que el mutante *crc* en *P. aeruginosa* posee las actividades enzimáticas de la ruta Entner-Doudoroff sobreexpresadas, si suponemos que la función de Crc se ha conservado desde *P. aeruginosa* hasta *P. putida* y que en esta produce el mismo efecto, el alivio de la represión observada en el mutante *crc* podría deberse a una disminución en la concentración efectiva del catabolito en el citoplasma (Collier *et al.*, 2001).

A la luz de estos datos completaríamos el esquema del mecanismo de represión de *Pu* de la siguiente forma.

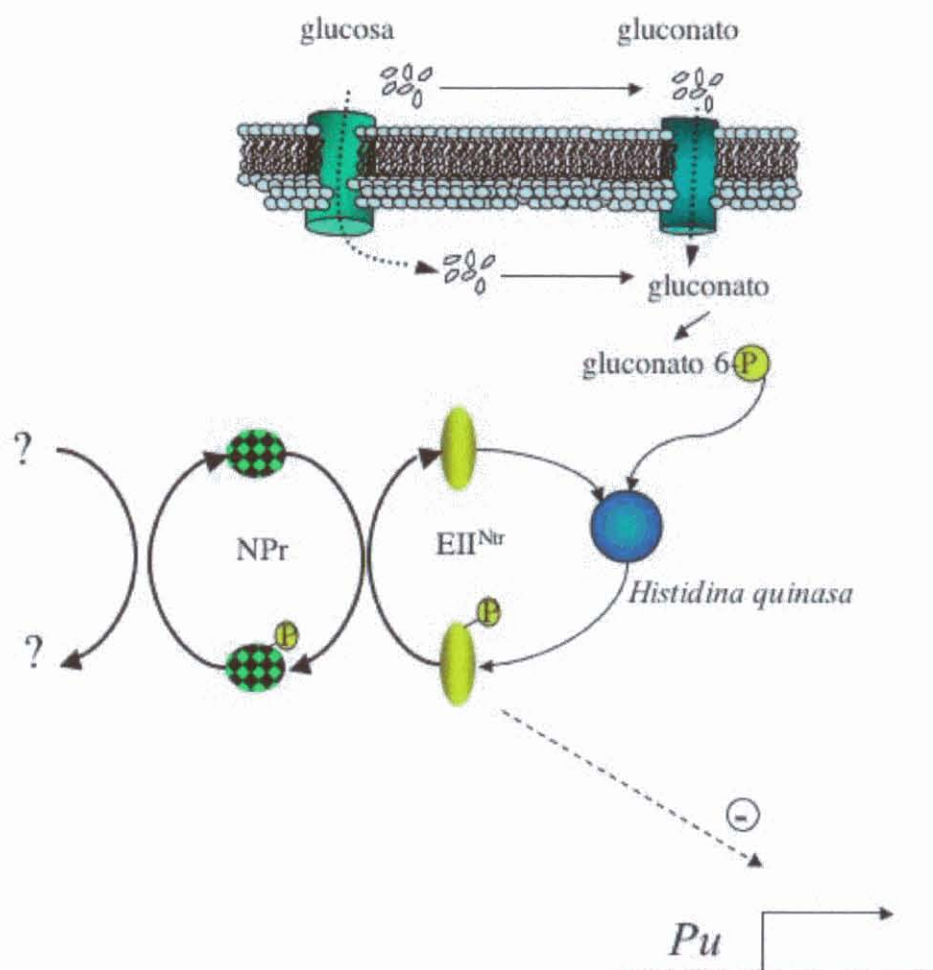


Figura 46. Propuesta de esquema de funcionamiento de la represión por glucosa del promotor *Pu*. El transporte y posterior metabolismo de la glucosa o el gluconato, se traduce en la acumulación de un catabolito (6-fosfogluconato) este provoca la activación de una histidina quinasa que fosforila a EIIANtr. Esta forma fosforilada dispara la represión del promotor *Pu*. Cuando la glucosa ha sido completamente metabolizada, NPr se encarga de desfosforilar EIIANtr y eliminar la represión.

5.3 Respuesta de *P. putida* (pWW0) a inductores de la ruta TOL

La ruta TOL ha sido objeto de numerosos estudios que han resultado en un conocimiento profundo del sistema, pero a menudo la respuesta de las unidades transcripcionales de la ruta se ha analizado una por una y monitorizando la expresión de los promotores fusionado a genes marcadores, o bien determinando una actividad codificada en el transcrito. La tecnología de *arrays* de ADN, nos ha permitido monitorizar todas las unidades transcripcionales de la ruta al tiempo, analizando los operones en todo su recorrido y pudiendo analizar al mismo tiempo el estatus celular.

5.3.1 Inducción de la ruta *upper*: *m*-xileno y 3 metil-bencilalcohol

Al añadir *m*-xileno al cultivo se observamos mediante la tecnología de *arrays* el patrón de respuesta esperado según trabajos anteriores; es decir la adición de *m*-xileno produce una respuesta rápida de aumentando los niveles de transcrito de la ruta *upper* y la sobreproducción de XylS (Fig. 30). A las 3 horas de inducción observamos una activación de la ruta *meta* (Fig. 25 y 30). Y solo los niveles de XylR sufren una variación mucho menor como ya se había descrito anteriormente (Duetz *et al.*, 1994). Aunque tanto el promotor *Ps* como *Pu* son dependientes de la activación de XylR, el grado de inducción del promotor *Pu* es mayor que el del promotor *Ps* (Fig. 25 y ss.); probablemente debido a que para desempeñar el papel de regulador, XylS, no sean necesarios niveles tan altos. Ya a los 15 minutos de la adición de *m*-xileno, se observa que la célula responde como en la respuesta a choque térmico aumentando los niveles de los transcrito de genes de respuesta a choque térmico (Figs. 26 y 28). También se produce un aumento de los niveles de transcrito de los genes *fur* y *pvdS*, relacionados con el metabolismo del hierro. En la literatura se ha descrito que los compuestos aromáticos como los que son sustrato de la ruta TOL disparan la respuesta de choque térmico. La inducción del factor sigma alternativo PvdS y del regulador Fur pone de manifiesto que se produce un aumento en los requerimientos de hierro por parte de la célula al añadir *m*-xileno.

Nos planteamos si esta respuesta era específica del *m*-xileno o era equiparable a la de otros efectores de la ruta *upper* como el 3-metil-bencilalcohol. La respuesta celular a ambas moléculas es muy similar. Como se observa en la Figura 27, no se aprecian grandes diferencias entre la inducción con *m*-xileno y 3-metil-bencilalcohol, no presentando diferencias ni los niveles del operón *upper* ni los de *xylS*. Solo se observa que el 3-metil-bencilalcohol provoca una mayor inducción de la ruta *meta*. Una probable explicación de esta diferencia podría ser que la conversión de *m*-xileno a 3-metil-bencilalcohol fuese un cuello de botella en la ruta *upper*, y lo que estamos viendo es el resultado de una mayor velocidad de acumulación de los efectores de XylS al inducir con 3-metil-bencilalcohol al saltarse este paso de la ruta *upper*. No se puede descartar un efecto debido al mayor choque térmico producido por el 3MBA (Fig. 28) y por tanto al ser el promotor *Pm* en parte dependiente de sigma 32 (Marques *et al.*, 1999), observamos un aumento de la activación de la ruta *meta*.

5.3.2 Inducción de la ruta *meta*

El efecto de la adición de un efector de XylS, como el 3-metilbenzoato, produce una activación de la ruta *meta* tan rápida como la provocada por el *m-xileno* sobre la ruta *upper* aunque los niveles de inducción del promotor *Pm* son mas bajos que los sufridos por *Pu* (Fig. 29 y 30). En la Figura 29 se observa una inducción de algunos segmentos del operón *upper*; dado que no se observa actividad del promotor *Pu* al monitorizar la actividad β -galactosidasa en la cepa *P. putida* MAD1, y no se observa una respuesta similar de *xylS*, no se trata de una actividad residual del 3-metilbenzoato como efector de XylR, sino parece que tal vez el 3-metilbenzoato, o algún metabolito posterior permitiese una estabilización de estos segmentos del operón *upper* (Barrick *et al.*, 2004; Nahvi *et al.*, 2002; Nahvi *et al.*, 2004; Winkler *et al.*, 2003; Winkler *et al.*, 2004). Este fenómeno de estabilidades diferenciales de segmentos del mismo operón parece ser mas importante en el operón *meta*, donde se observa una discontinuidad en las variaciones de los niveles de transcrito en respuesta a distintas señales a lo largo del operón. De este modo al inducir con *m-xileno*, la región comprendida por los genes *xylXYZL* presenta unos niveles de inducción homogéneos entre ellos, y mas altos que el resto del operón. Estos genes codifican un complejo enzimático (XylXYZ) y XylL que catalizan la primera conversión *meta* desde benzoatos a sus derivados catecólicos. La parte final del operón desde *xylQ* presenta también unos niveles de inducción homogéneos. Esto establece dos puntos inflexión que pueden ser observados de formas mas o menos evidentes en todos los experimento con *arrays* (Fig. 25 y ss.); esta observación es coherente con las evidencias de procesamiento del mensajero de la ruta *meta* y los sitios cortes por RNAasas propuestos por Marqués (Marques *et al.*, 1993). De este modo, la ruta tendría la capacidad de regular las cantidades relativas de las enzimas de la ruta, variando la estabilidad de los distintos segmentos del mensajero en función de los requerimientos específicos.

5.3.3 La cascada de regulación de *Pm*

El modelo vigente para la regulación de la ruta TOL en presencia de efectores de XylR sostiene que la sobreexpresión de XylS producida por estos es condición suficiente para la expresión de la ruta *meta* (Duetz *et al.*, 1994; Gallegos *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1987). Los experimentos de *arrays* a distintos tiempos con *m-xileno*, *o-xileno* y fuel nos indican que si bien la sobreproducción de XylS capacita a la célula

para responder a benzoatos permitiendo unos niveles mayores de expresión de la ruta *meta*, no parece que esta sea suficiente para disparar su expresión (Fig. 25, 29 y 30) en ausencia de efector; como puede verse en los ensayos con *o*-xileno y con vertido de fuel, se pueden mantener niveles altos de inducción de *xylS* durante horas sin que por ello sea detectable expresión de la ruta *meta* (Figs. 31, 32, 38 y 39. Tabla 10). La discrepancia entre estas observaciones con las realizadas en trabajos previos nos hace pensar en la existencia de otros factores en la activación de XylS; estos factores podrían estar presentes en la célula, o ser disparadas por el *o*-xileno, en las condiciones de cultivo usadas en otros trabajos o en sistemas heterólogos usados como *E. coli*. Aunque el factor σ_{32} y sigma S parecían buenos candidatos para esta función, al ser la transcripción desde el promotor *Pm* dependiente de estos, existen indicios que parecen descartarlos; por un lado tanto en los experimentos con fuel como con *o*-xileno en la comparación de niveles tras 3 horas de la adición de estos, el cultivo se encuentra en fase estacionaria y sigue sin detectarse una subida de los niveles de transcrito de *Pm*. Por otro lado se realizaron experimentos en los que se monitorizó la actividad catecol 2,3 dioxigenasa en cultivos expuestos a *o*-xileno y cantidades creciente de etanol, con objeto de sobreproducir XylS e inducir al tiempo una respuesta de choque térmico. En ningún caso se observó una inducción de la actividad catecol 2,3 dioxigenasa.

5.4 Respuesta de *P. putida* (pWW0) a estreses ambientales

5.4.1 El metabolismo y las condiciones ambientales

Como las condiciones ambientales a las que se enfrentan las bacterias en medio ambiente, y que constituyen a menudo un freno en las capacidades biodegradativas de las mismas, son de muy diversa naturaleza y dado que contábamos con una herramienta que nos permitía analizar el comportamiento de la ruta TOL y el estatus celular al mismo tiempo nos planteamos estudiar el comportamiento de la ruta TOL frente a un conjunto de condiciones de cultivo. Por un lado decidimos provocarle a la célula una escasez de nutrientes y por otro lado tratar de visualizar la respuesta frente a la adición de distintos tóxicos. Como se observa en las Figuras 33 y 34, la bajada en la concentración de nutrientes como la fuente de carbono, nitrógeno, o la adición de azida sódica, que provoca una inhibición de la cadena de transporte de electrones, produce un aumento de los transcritos de la ruta tanto *upper* como *meta* de TOL;

posiblemente la célula frente percibe estas agresiones como un descenso del estatus energético y trata de compensarlo aumentando los flujos a través de metabolismos alternativos. Esto puede ayudar a comprender la respuesta a la adición de azida o a la bajada en la concentración de succinato, pero no explica porque disminuciones en la disponibilidad de nitrógeno produce el mismo efecto. Puede ser que estemos observando una misma respuesta pero los mecanismos subyacentes, y el sentido sea distinto.

En el caso de la sustitución del amonio por nitrato como fuente de nitrógeno se observa una clara inducción de la ruta *upper* y de *xylS*, ambos promotores dependientes del factor sigma alternativo σ_{54} (Fig. 6; Ramos *et al.*, 1997). La competición de sigmas como mecanismo puede aportar una explicación a este fenómeno (Jishage *et al.*, 2002; Laurie *et al.*, 2003). La célula al verse obligada a utilizar el nitrato como fuente de nitrógeno debe usar una maquinaria cuya expresión es dependiente de σ_{54} ; lo cual es posible que este mediado por un aumento de la proporción de ARN polimerasa que se encuentra unido a este factor sigma, y provoque una sobreactivación gratuita de los promotores dependientes de σ_{54} activados.

5.4.2 Un contaminante complejo

Dado que los *arrays* nos habían permitido analizar la respuesta a señales simples, nos planteamos, ante la disponibilidad de muestras de un contaminante real, el usarlo para esbozar la respuesta de *P. putida* a un contaminante complejo como un vertido de fuel. Como se describe en resultados, la bacteria responde en un primer momento (15 minutos, Fig. 36) con un aumento de los niveles de genes relacionados con todos los grupos funcionales presentes en el *array*, y donde la expresión de la ruta TOL es indetectable; salvo la de los reguladores cuya expresión, por otro lado, no varió significativamente. Como se eligieron concentraciones subletales de vertido esta primera fase es seguida (1 hora, Fig. 37) de una etapa en la esta respuesta se suaviza, observándose como disminuyen la magnitud de las diferencias presentes a los 15 minutos. A las 3 horas (Fig. 38) los niveles de transcrito de los genes descriptores del estatus celular no presentan ya ninguna diferencia con los que tienen en el cultivo de referencia, lo que constituye un caso claro de adaptación a las nuevas condiciones de

cultivo. Es en esta etapa (3 horas) y en la siguiente (4 horas, Fig. 39) cuando la ruta TOL, que ha permanecido callada durante todo la curva de crecimiento, presenta un aumento de los niveles de transcrito del operón *upper* y de *xylS*, los segmentos dependientes de la activación directa por XylR. Para determinar porque no es hasta las 3 horas que se produce esta inducción nos planteamos dos hipótesis: (i) o bien el estrés que producido por la adición de fuel inhibe la activación, (ii) o bien no es hasta las tres horas que existe disponibilidad de una molécula efectora de XylR. Para dilucidar entre estas hipótesis se realizaron experimentos de inducción del promotor *Pu* en las cepas *P. putida* MAD1, y *P. putida* MAD1 (pWW0) y se monitorizó la respuesta a *m*-xileno, fuel o una combinación de ambos midiendo la actividad β -galactosidasa (Fig. 40). De este modo se observó que si añadimos *m*-xileno el aumento de la actividad de *Pu* es inmediata con independencia de la presencia de fuel; esto significa que la ausencia de inducción de la ruta *upper* hasta las 3 horas de la adición del fuel es debida a la falta de una molécula efectora de XylR. Esta molécula efectora se iría acumulando durante el crecimiento debido a la actividad metabólica de *P. putida*. Dado que en la estirpe *P. putida* MAD1 no se observa inducción de *Pu* a las tres horas de la adición de fuel, y si en *P. putida* MAD1 (pWW0) se deduce que para que se *P. putida* transforme el fuel de manera que se produzca un efector de XylR es necesario que esta lleve el plásmido pWW0.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. *Pseudomonas putida* KT2440, posee un sistema PTS reducido a 5 genes: *ptsN*, *ptsO*, *ptsP*, *fruA* y *fruB* que presentan los dominios correspondientes de proteínas EIIA, HPr, EI, EIIBC y una combinación de EIIA, HPr, EI respectivamente
2. Las proteínas PTS FruA y FruB, resultan esenciales para la utilización de la fructosa como única fuente carbono y energía; y no están implicadas en el transporte de glucosa, mientras que el mutante *ptsP* presenta una disminución de la capacidad de acumular PHAs
3. Ni *ptsP* ni *fruB* son necesarios para el control ejercido por la glucosa sobre el promotor *Pu* de la ruta *upper* de pWW0 y ha de ser una proteína no PTS la encargada de introducir el grupo fosfato en la cascada de señalización desde la glucosa hasta el promotor *Pu* mediante la acumulación de un metabolito de la ruta ED
4. *P. putida* posee la información de las enzimas que constituyen las rutas Embden-Meyerhof y Entner-Doudoroff para el metabolismo de azúcares; también posee las proteínas necesarias para conectar el metabolismo de la fructosa a cualquiera de estas rutas y las necesarias para conectar el catabolismo de la glucosa a la ruta Entner-Doudoroff
5. Un mutante *eda*, la aldolasa central de la ruta ED, no es capaz de crecer con glucosa, ni fructosa como única fuente de carbono y energía. Un mutante *fda*, la aldolasa central de la ruta EM, es capaz de crecer con fructosa como única fuente de carbono y energía
6. La adición de moléculas efectoras de XylR produce un aumento homogéneo de los niveles de todos los segmentos del operón *upper* y de *xylS*, y un aumento de los niveles del operón *meta* con distintos grados de inducción en

diferentes segmentos del operón. Esta respuesta de la ruta TOL presenta distintos patrones de inducción en función de la moléculas efectoras

7. Para mantener una expresión general del operón *meta*, no es suficiente con aumentar los niveles del regulador XylS
8. Un descenso en la disponibilidad de fuente de carbono o nitrógeno o una inhibición del transporte de electrones produce un aumento del conjunto de la ruta TOL
9. La adición de paracuato o un choque térmico produce una inhibición de la ruta TOL mientras que la adición de Mitomicina C produce una respuesta frente al daño en ADN que no afecta a los niveles de la ruta TOL. La adición de arsénico provoca un aumento de los niveles de la ruta TOL
10. La adición de un vertido de fuel, provoca una respuesta que afecta a muchos procesos celulares y que se va suavizando conforme la bacteria se ajusta a esta condición; este estado *estresado* no imposibilita a TOL su capacidad de responder a sus efectores aunque si parece reducirla.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliográficas

- Abril, M.A., Michan, C., Timmis, K.N., and Ramos, J.L. (1989) Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J Bacteriol* **171**: 6782-6790.
- Anderton, J.M., Tokarz, R., Thill, C.D., Kuhlow, C.J., Brooks, C.S., Akins, D.R., Katona, L.I., and Benach, J.L. (2004) Whole-genome DNA array analysis of the response of *Borrelia burgdorferi* to a bactericidal monoclonal antibody. *Infect Immun* **72**: 2035-2044.
- Arsene, F., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **55**: 3-9.
- Assinder, S.J., and Williams, P.A. (1990) The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv Microb Physiol* **31**: 1-69.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M., Frey, J., and Timmis, K.N. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.
- Barrick, J.E., Corbino, K.A., Winkler, W.C., Nahvi, A., Mandal, M., Collins, J., Lee, M., Roth, A., Sudarsan, N., Jona, I., Wickiser, J.K., and Breaker, R.R. (2004) New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6421-6426.
- Bartels, F., Fernandez, S., Holtel, A., Timmis, K.N., and de Lorenzo, V. (2001) The essential HupB and HupN proteins of *Pseudomonas putida* provide redundant and nonspecific DNA-bending functions. *J Biol Chem* **276**: 16641-16648.
- Bertoni, G., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1997) Genetic evidence of separate repressor and activator activities of the XylR regulator of the TOL plasmid, pWW0, of *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol* **23**: 1221-1227.
- Bertoni, G., Marques, S., and de Lorenzo, V. (1998) Activation of the toluene-responsive regulator XylR causes a transcriptional switch between sigma54 and sigma70 promoters at the divergent Pr/Ps region of the TOL plasmid. *Mol Microbiol* **27**: 651-659.

- Bestetti, G., and Galli, E. (1987) Characterization of a novel TOL-like plasmid from *Pseudomonas putida* involved in 1,2,4-trimethylbenzene degradation. *J Bacteriol* **169**: 1780-1783.
- Bongaerts, J., Kramer, M., Muller, U., Raeven, L., and Wubbolts, M. (2001) Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng* **3**: 289-300.
- Bonnemain, C., Raynaud, C., Reglier-Poupet, H., Dubail, I., Frehel, C., Lety, M.A., Berche, P., and Charbit, A. (2004) Differential roles of multiple signal peptidases in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **51**: 1251-1266.
- Brent, R., and Ptashne, M. (1981) Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 4204-4208.
- Bruckner, R., and Titgemeyer, F. (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 141-148.
- Buhler, B., Bollhalder, I., Hauer, B., Witholt, B., and Schmid, A. (2003) Chemical biotechnology for the specific oxyfunctionalization of hydrocarbons on a technical scale. *Biotechnol Bioeng* **82**: 833-842.
- Bukau, B. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* **9**: 671-680.
- Busby, S., and Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199-213.
- Carrier, T.A., and Keasling, J.D. (1997) Controlling messenger RNA stability in bacteria: strategies for engineering gene expression. *Biotechnol Prog* **13**: 699-708.
- Cases, I., de Lorenzo, V., and Perez-Martin, J. (1996) Involvement of sigma 54 in exponential silencing of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid *Pu* promoter. *Mol Microbiol* **19**: 7-17.
- Cases, I. (1998) Regulación fisiológica del promotor *Pu* del plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*. In *Biología Molecular* Madrid: Autónoma de Madrid, pp. 122.
- Cases, I., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1999) The IANtr (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the sigma54-dependent *Pu* promoter of the TOL plasmid. *J Biol Chem* **274**: 15562-15568.

- Cases, I., Velazquez, F., and de Lorenzo, V. (2001) Role of ptsO in carbon-mediated inhibition of the Pu promoter belonging to the pWW0 *Pseudomonas putida* plasmid. *J Bacteriol* **183**: 5128-5133.
- Casjens, S. (2003) Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* **49**: 277-300.
- Chalker, A.F., and Lunsford, R.D. (2002) Rational identification of new antibacterial drug targets that are essential for viability using a genomics-based approach. *Pharmacol Ther* **95**: 1-20.
- Chang, D., Wang, Z., Heringa, M.F., Wirthner, R., Witholt, B., and Li, Z. (2003) Highly enantioselective hydrolysis of alicyclic meso-epoxides with a bacterial epoxide hydrolase from *Sphingomonas* sp. HXN-200: simple syntheses of alicyclic vicinal trans-diols. *Chem Commun (Camb)*: 960-961.
- Chatterji, D., and Ojha, A.K. (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol* **4**: 160-165.
- Cole, S.T., and Buchrieser, C. (2001) Bacterial genomics. A plague o' both your hosts. *Nature* **413**: 467, 469-470.
- Collier, D.N., Hager, P.W., and Phibbs, P.V., Jr. (1996) Catabolite repression control in the Pseudomonads. *Res Microbiol* **147**: 551-561.
- Collier, D.N., Spence, C., Cox, M.J., and Phibbs, P.V. (2001) Isolation and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* pseudorevertants containing suppressors of the catabolite repression control-defective *crc-10* allele. *FEMS Microbiol Lett* **196**: 87-92.
- Craig, E.A., Weissman, J.S., and Horwich, A.L. (1994) Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* **78**: 365-372.
- Culham, D.E., Lasby, B., Marangoni, A.G., Milner, J.L., Steer, B.A., van Nues, R.W., and Wood, J.M. (1993) Isolation and sequencing of *Escherichia coli* gene *proP* reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. *J Mol Biol* **229**: 268-276.
- Cunliffe, H.E., Merriman, T.R., and Lamont, I.L. (1995) Cloning and characterization of *pvdS*, a gene required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: PvdS is probably an alternative sigma factor. *J Bacteriol* **177**: 2744-2750.

- de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Meth Enzymol* **235**: 386-405.
- Delic-Attree, I., Toussaint, B., and Vignais, P.M. (1995) Cloning and sequence analyses of the genes coding for the integration host factor (IHF) and HU proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **154**: 61-64.
- Demain, A.L., and Davies, J.E. (1999) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington: American Society for Microbiology.
- Diaz, E., and Prieto, M.A. (2000) Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 467-475.
- Dinamarca, M.A., Ruiz-Manzano, A., and Rojo, F. (2002) Inactivation of cytochrome o ubiquinol oxidase relieves catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J Bacteriol* **184**: 3785-3793.
- Donadio, S., Sosio, M., and Lancini, G. (2002) Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 377-380.
- Duetz, W.A., Marques, S., de Jong, C., Ramos, J.L., and van Andel, J.G. (1994) Inducibility of the TOL catabolic pathway in *Pseudomonas putida* (pWW0) growing on succinate in continuous culture: evidence of carbon catabolite repression control. *J Bacteriol* **176**: 2354-2361.
- Duetz, W.A., Marques, S., Wind, B., Ramos, J.L., and van Andel, J.G. (1996) Catabolite repression of the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* harboring pWW0 under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture. *Appl Environ Microbiol* **62**: 601-606.
- Durner, R., Zinn, M., Witholt, B., and Egli, T. (2001) Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in batch and chemostat culture with different carbon sources. *Biotechnol Bioeng* **72**: 278-288.
- Egan, S.M. (2002) Growing repertoire of AraC/XylS activators. *J Bacteriol* **184**: 5529-5532.
- Fraile, S., Roncal, F., Fernandez, L.A., and de Lorenzo, V. (2001) Monitoring intracellular levels of XylR in *Pseudomonas putida* with a single-chain antibody specific for aromatic-responsive enhancer-binding proteins. *J Bacteriol* **183**: 5571-5579.

- Fraley, C.D., Kim, J.H., McCann, M.P., and Matin, A. (1998) The *Escherichia coli* starvation gene *cstC* is involved in amino acid catabolism. *J Bacteriol* **180**: 4287-4290.
- Fritz, B., and Racznik, G.A. (2002) Bacterial genomics: potential for antimicrobial drug discovery. *BioDrugs* **16**: 331-337.
- Fukumori, F., and Saint, C.P. (1997) Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22(pTDN1). *J Bacteriol* **179**: 399-408.
- Gallegos, M.T., Marques, S., and Ramos, J.L. (1996) The TACAN4TGCA motif upstream from the -35 region in the sigma70-sigmaS-dependent Pm promoter of the TOL plasmid is the minimum DNA segment required for transcription stimulation by XylS regulators. *J Bacteriol* **178**: 6427-6434.
- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., and Ramos, J.L. (1997) Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 393-410.
- Gerischer, U. (2002) Specific and global regulation of genes associated with the degradation of aromatic compounds in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 111-121.
- Gonzalez, J.E., and Marketon, M.M. (2003) Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 574-592.
- Gosset, G., Zhang, Z., Nayyar, S., Cuevas, W.A., and Saier, M.H., Jr. (2004) Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 3516-3524.
- Greated, A., Lambertsen, L., Williams, P.A., and Thomas, C.M. (2002) Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **4**: 856-871.
- Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-466.
- Gruenewald, S., Mootz, H.D., Stehmeier, P., and Stachelhaus, T. (2004) In Vivo Production of Artificial Nonribosomal Peptide Products in the Heterologous Host *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3282-3291.
- Hassett, D.J., Woodruff, W.A., Wozniak, D.J., Vasil, M.L., Cohen, M.S., and Ohman, D.E. (1993) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* genes encoding manganese- and iron-cofactored superoxide

- dismutase: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. *J Bacteriol* **175**: 7658-7665.
- Hilbert, D.W., Chary, V.K., and Piggot, P.J. (2004) Contrasting effects of sigmaE on compartmentalization of sigmaF activity during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**: 1983-1990.
- Hollmann, F., Lin, P.C., Witholt, B., and Schmid, A. (2003) Stereospecific biocatalytic epoxidation: the first example of direct regeneration of a FAD-dependent monooxygenase for catalysis. *J Am Chem Soc* **125**: 8209-8217.
- Holtel, A., Marques, S., Mohler, I., Jakubzik, U., and Timmis, K.N. (1994) Carbon source-dependent inhibition of xyl operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *J Bacteriol* **176**: 1773-1776.
- Hu, Y., and Coates, A.R. (2001) Increased levels of sigJ mRNA in late stationary phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis* detected by DNA array hybridisation. *FEMS Microbiol Lett* **202**: 59-65.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Khöler, T., Rekik, M., and Harayama, S. (1990) Growth-phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0 catabolic genes. *J Bacteriol* **172**: 6651-6660.
- Inouye, S., Nakazawa, A., and Nakazawa, T. (1985) Determination of the transcription initiation site and identification of the protein product of the regulatory gene xylR for xyl operons on the TOL plasmid. *J Bacteriol* **163**: 863-869.
- Inouye, S., Nakazawa, A., and Nakazawa, T. (1987) Overproduction of the xylS gene product and activation of the xylDLEGF operon on the TOL plasmid. *J Bacteriol* **169**: 3587-3592.
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., and Nystrom, T. (2002) Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev* **16**: 1260-1270.
- Jones, R.M., Collier, L.S., Neidle, E.L., and Williams, P.A. (1999) areABC genes determine the catabolism of aryl esters in *Acinetobacter* sp. Strain ADP1. *J Bacteriol* **181**: 4568-4575.
- Kessler, B., and Witholt, B. (2001) Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J Biotechnol* **86**: 97-104.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., and Adhya, S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* **62**: 749-795.

- Kyla-Nikkila, K., Hujanen, M., Leisola, M., and Palva, A. (2000) Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3835-3841.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-687.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M.W., Falkenberg, P., McDougall, J., and Strom, A.R. (1991) DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1049-1064.
- Laurie, A.D., and Lloyd-Jones, G. (1999) The phn genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *J Bacteriol* **181**: 531-540.
- Laurie, A.D., Bernardo, L.M., Sze, C.C., Skarfstad, E., Szalewska-Palasz, A., Nystrom, T., and Shingler, V. (2003) The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. *J Biol Chem* **278**: 1494-1503.
- Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Defago, G., and Haas, D. (1992) Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1562-1566.
- Leroy, A., Vanzo, N.F., Sousa, S., Dreyfus, M., and Carpousis, A.J. (2002) Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol Microbiol* **45**: 1231-1243.
- Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K.H., and Wagner, M. (2002) Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5064-5081.
- Ma, J.F., Hager, P.W., Howell, M.L., Phibbs, P.V., and Hassett, D.J. (1998) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* zwf gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). *J Bacteriol* **180**: 1741-1749.
- Ma, J.F., Ochsner, U.A., Klotz, M.G., Nanayakkara, V.K., Howell, M.L., Johnson, Z., Posey, J.E., Vasil, M.L., Monaco, J.J., and Hassett, D.J. (1999) Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 3730-3742.

- Madhusudhan, K.T., McLaughlin, R., Komori, N., and Matsumoto, H. (2003) Identification of a major protein upon phosphate starvation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Basic Microbiol* **43**: 36-46.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (2003) *Brock Biology of Microorganisms, 10th E.*
- Manganelli, R., Proveddi, R., Rodrigue, S., Beaucher, J., Gaudreau, L., and Smith, I. (2004) Sigma factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **186**: 895-902.
- Marques, S., and Ramos, J.L. (1993) Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways. *Mol Microbiol* **9**: 923-929.
- Marques, S., Ramos, J.L., and Timmis, K.N. (1993) Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL meta fission pathway operon around the transcription initiation point, the xylTE and the xylFJ regions. *Biochim Biophys Acta* **1216**: 227-236.
- Marques, S., Holtel, A., Timmis, K.N., and Ramos, J.L. (1994) Transcriptional induction kinetics from the promoters of the catabolic pathways of TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* for metabolism of aromatics. *J Bacteriol* **176**: 2517-2524.
- Marques, S., Manzanera, M., Gonzalez-Perez, M.M., Gallegos, M.T., and Ramos, J.L. (1999) The XylS-dependent Pm promoter is transcribed in vivo by RNA polymerase with sigma 32 or sigma 38 depending on the growth phase. *Mol Microbiol* **31**: 1105-1113.
- Martin, D.W., Holloway, B.W., and Deretic, V. (1993a) Characterization of a locus determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus* sigma factor. *J Bacteriol* **175**: 1153-1164.
- Martin, D.W., Schurr, M.J., Mudd, M.H., and Deretic, V. (1993b) Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate-producing form: inactivation of mucB causes conversion to mucoidy. *Mol Microbiol* **9**: 497-506.
- McPhee, J.B., Lewenza, S., and Hancock, R.E. (2003) Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**: 205-217.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor.

- Mondello, F.J. (1989) Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J Bacteriol* **171**: 1725-1732.
- Morrissey, J.P., Walsh, U.F., O'Donnell, A., Moenne-Loccoz, Y., and O'Gara, F. (2002) Exploitation of genetically modified inoculants for industrial ecology applications. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 599-606.
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M.S., Zou, X., Brown, K.L., and Breaker, R.R. (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol* **9**: 1043.
- Nahvi, A., Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2004) Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **32**: 143-150.
- Neidhardt, F.C. (1987) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R.T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J.A., Timmis, K.N., Dusterhoft, A., Tumbler, B., and Fraser, C.M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799-808.
- Nies, D.H. (2004) Incidence and function of sigma factors in *Ralstonia metallidurans* and other bacteria. *Arch Microbiol* **181**: 255-268.
- Panke, S., Witholt, B., Schmid, A., and Wubbolts, M.G. (1998) Towards a biocatalyst for (S)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas* sp. strain VLB120. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2032-2043.
- Petruschka, L., Burchhardt, G., Muller, C., Weihe, C., and Herrmann, H. (2001) The cyo operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation. *Mol Genet Genomics* **266**: 199-206.

- Podbielski, A., and Kreikemeyer, B. (2004) Cell density--dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int J Infect Dis* **8**: 81-95.
- Polack, B., Dacheux, D., Delic-Attree, I., Toussaint, B., and Vignais, P.M. (1996) The *Pseudomonas aeruginosa* fumc and soda genes belong to an iron-responsive operon. *Biochem Biophys Res Commun* **226**: 555-560.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543-594.
- Powell, B.S., Court, D.L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M.H., Jr., and Reizer, J. (1995) Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the rpoN operon of *Escherichia coli*. Enzyme IANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant. *J Biol Chem* **270**: 4822-4839.
- Quadroni, M., Staudenmann, W., Kertesz, M., and James, P. (1996) Analysis of global responses by protein and peptide fingerprinting of proteins isolated by two-dimensional gel electrophoresis. Application to the sulfate-starvation response of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **239**: 773-781.
- Rabus, R., Reizer, J., Paulsen, I., and Saier, M.H., Jr. (1999) Enzyme I(Ntr) from *Escherichia coli*. A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr. *J Biol Chem* **274**: 26185-26191.
- Ramos, J.L., Mermod, N., and Timmis, K.N. (1987) Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding meta-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* **1**: 293-300.
- Ramos, J.L., Marques, S., and Timmis, K.N. (1997) Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu Rev Microbiol* **51**: 341-373.
- Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marques, S., Ramos-Gonzalez, M.I., Espinosa-Urgel, M., and Segura, A. (2001) Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Curr Opin Microbiol* **4**: 166-171.

- Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D.U., Strompl, C., Moore, E.R., and Timmis, K.N. (2002) Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 912-915.
- Regnier, P., and Arraiano, C.M. (2000) Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays* **22**: 235-244.
- Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., and Haas, D. (1997) The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* **24**: 309-319.
- Reitzer, L.J., and Magasanik, B. (1985) Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 1979-1983.
- Reizer, J., Reizer, A., Lagrou, M.J., Folger, K.R., Stover, C.K., and Saier, M.H., Jr. (1999) Novel phosphotransferase systems revealed by bacterial genome analysis: the complete repertoire of *pts* genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 289-293.
- Rostas, K., Morton, S.J., Picksley, S.M., and Lloyd, R.G. (1987) Nucleotide sequence and LexA regulation of the *Escherichia coli* *recN* gene. *Nucleic Acids Res* **15**: 5041-5049.
- Rudi, K., Katla, T., and Naterstad, K. (2003) Multi locus fingerprinting of *Listeria monocytogenes* by sequence-specific labeling of DNA probes combined with array hybridization. *FEMS Microbiol Lett* **220**: 9-14.
- Saier, M.H., Jr., and Reizer, J. (1994) The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol Microbiol* **13**: 755-764.
- Saikaly, P.E., and Oerther, D.B. (2004) Bacterial Competition in Activated Sludge: Theoretical Analysis of Varying Solids Retention Times on Diversity. *Microb Ecol.*
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor.
- Sampson, S.L., Rengarajan, J., and Rubin, E.J. (2003) Bacterial genomics and vaccine design. *Expert Rev Vaccines* **2**: 437-445.
- Sanseverino, J., Applegate, B.M., King, J.M., and Saylor, G.S. (1993) Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1931-1937.

- Sawyer, M.H., Baumann, L., Berman, S.M., Canovas, J.L., and Berman, R.H. (1977) Pathways of D-Fructose Catabolism in Species of *Pseudomonas*. *Arch Microbiol* **112**: 49-55.
- Schultz, J.E., and Matin, A. (1991) Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **218**: 129-140.
- Schweizer, H.P., and de Lorenzo, V. (2004) *Molecular Tools for genetic analysis of pseudomonads*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Segura, D., and Espin, G. (1998) Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli* ptsP affects poly-beta-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **180**: 4790-4798.
- Sherman, M., and Goldberg, A.L. (1992) Heat shock in *Escherichia coli* alters the protein-binding properties of the chaperonin groEL by inducing its phosphorylation. *Nature* **357**: 167-169.
- Shingler, V., Powlowski, J., and Marklund, U. (1992) Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J Bacteriol* **174**: 711-724.
- Shingler, V. (2004) *Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Spain, J.C., Nishino, S.F., Witholt, B., Tan, L.S., and Duetz, W.A. (2003) Production of 6-phenylacetylene picolinic acid from diphenylacetylene by a toluene-degrading *Acinetobacter* strain. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4037-4042.
- Starnbach, M.N., and Lory, S. (1992) The fliA (rpoF) gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an alternative sigma factor required for flagellin synthesis. *Mol Microbiol* **6**: 459-469.
- Stjepandic, D., Weinel, C., Hilbert, H., Koo, H.L., Diehl, F., Nelson, K.E., Tummeler, B., and Hoheisel, J.D. (2002) The genome structure of *Pseudomonas putida*: high-resolution mapping and microarray analysis. *Environ Microbiol* **4**: 819-823.
- Storz, G., Opdyke, J.A., and Zhang, A. (2004) Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* **7**: 140-144.
- Studholme, D.J., and Dixon, R. (2003) Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* **185**: 1757-1767.

- Suerbaum, S., Josenhans, C., Claus, H., and Frosch, M. (2002) Bacterial genomics: seven years on. *Trends Microbiol* **10**: 351-353.
- Tan, M.W., Rahme, L.G., Sternberg, J.A., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2408-2413.
- Tatsuta, T., Tomoyasu, T., Bukau, B., Kitagawa, M., Mori, H., Karata, K., and Ogura, T. (1998) Heat shock regulation in the *ftsH* null mutant of *Escherichia coli*: dissection of stability and activity control mechanisms of sigma32 in vivo. *Mol Microbiol* **30**: 583-593.
- Tchieu, J.H., Norris, V., Edwards, J.S., and Saier, M.H., Jr. (2001) The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 329-346.
- Timmis, K.N., Steffan, R.J., and Unterman, R. (1994) Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu Rev Microbiol* **48**: 525-557.
- Tomoyasu, T., Ogura, T., Tatsuta, T., and Bukau, B. (1998) Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **30**: 567-581.
- Trefault, N., De la Iglesia, R., Molina, A.M., Manzano, M., Ledger, T., Perez-Pantoja, D., Sanchez, M.A., Stuardo, M., and Gonzalez, B. (2004) Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ Microbiol*.
- Ueno-Nishio, S., Mango, S., Reitzer, L.J., and Magasanik, B. (1984) Identification and regulation of the *glnL* operator-promoter of the complex *glnALG* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **160**: 379-384.
- van Beilen, J.B., Eggink, G., Enequist, H., Bos, R., and Witholt, B. (1992) DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded *alkJKL* genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Mol Microbiol* **6**: 3121-3136.
- van Beilen, J.B., Duetz, W.A., Schmid, A., and Witholt, B. (2003) Practical issues in the application of oxygenases. *Trends Biotechnol* **21**: 170-177.
- van Beilen, J.B., Marin, M.M., Smits, T.H., Rothlisberger, M., Franchini, A.G., Witholt, B., and Rojo, F. (2004) Characterization of two alkane hydroxylase

- genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Environ Microbiol* **6**: 264-273.
- van der Meer, J.R., van Neerven, A.R., de Vries, E.J., de Vos, W.M., and Zehnder, A.J. (1991) Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1,2-dichloro-, 1,4-dichloro-, and 1,2,4-trichlorobenzene of *Pseudomonas* sp. strain P51. *J Bacteriol* **173**: 6-15.
- Varnam, A.H. (2000) *Environmental Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology
Manson Publishing.
- Venturi, V., Ottevanger, C., Bracke, M., and Weisbeek, P. (1995) Iron regulation of siderophore biosynthesis and transport in *Pseudomonas putida* WCS358: involvement of a transcriptional activator and of the Fur protein. *Mol Microbiol* **15**: 1081-1093.
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P., and O'Gara, F. (2001) *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 289-295.
- Weinel, C., Nelson, K.E., and Tumbler, B. (2002) Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environ Microbiol* **4**: 809-818.
- Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., and Greenberg, E.P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**: 860-864.
- Williams, M.D., Ouyang, T.X., and Flickinger, M.C. (1994) Starvation-induced expression of SspA and SspB: the effects of a null mutation in *sspA* on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation. *Mol Microbiol* **11**: 1029-1043.
- Willins, D.A., Ryan, C.W., Platko, J.V., and Calvo, J.M. (1991) Characterization of Lrp, and *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J Biol Chem* **266**: 10768-10774.
- Winkler, W.C., Nahvi, A., Sudarsan, N., Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2003) An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat Struct Biol* **10**: 701-707.

- Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A., and Breaker, R.R. (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* **428**: 281-286.
- Winzer, K., Hardie, K.R., and Williams, P. (2003) LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Adv Appl Microbiol* **53**: 291-396.
- Wolff, J.A., MacGregor, C.H., Eisenberg, R.C., and Phibbs, P.V., Jr. (1991) Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol* **173**: 4700-4706.
- Xu, H., and Hoover, T.R. (2001) Transcriptional regulation at a distance in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**: 138-144.
- Yamazaki, H., Takano, Y., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2003) amfR, an essential gene for aerial mycelium formation, is a member of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol* **50**: 1173-1187.
- Yew-Seng, J.H., Burden, L.M., and Hurley, J.H. (2000) Structure of GAF domain, a ubiquitous signaling motif and new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J* **19**: 5288-5299.
- Yuste, L., Canosa, I., and Rojo, F. (1998) Carbon-source-dependent expression of the PalkB promoter from the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *J Bacteriol* **180**: 5218-5226.
- Yuste, L., and Rojo, F. (2001) Role of the crc gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J Bacteriol* **183**: 6197-6206.
- Zhang, X., Chaney, M., Wigneshweraraj, S.R., Schumacher, J., Bordes, P., Cannon, W., and Buck, M. (2002) Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. *Mol Microbiol* **45**: 895-903.
- Zinn, M., Witholt, B., and Egli, T. (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliv Rev* **53**: 5-21.

ANEXOS

ANEXO 1

A continuación se detallan las secuencias de los oligonucleótidos usados en este trabajo.

Tabla 11. Secuencias de los oligonucleótidos durante este trabajo.

<i>PTSPR</i>	GCGGATCCGCCGGCCATCTCGCCGC
<i>PTSPL</i>	GTGAATTCGTCTGCTCGGTGTACCT
<i>5MTP</i>	CCGAATTCTCTGCCTCGGCTGCCACCC
<i>3MTP</i>	CGGGATCCCCCAGGTCGGCCAGTACC
<i>Fweda</i>	TGGCGTGGACAGTGAAATTCCG
<i>Reveda</i>	CCGTAAAGCTTACAACCTGTTTTTC
<i>Ffda2</i>	GGAATTCCGTCAACAACCTCGAGCAGACTGC
<i>Rfda2</i>	GAAGATCTGCGCCATCAGACGGCG
<i>Fwerc</i>	GGCATTCAAGGCTGCGG
<i>Reverc</i>	CGACGATCAGCGGTGC
<i>FwcyoB</i>	CGGGATCCACGAAGCAGGCAGCA
<i>RevcyoB</i>	CGGGATCCAGAACCAGAAGGAG

Diseño y construcción del *array* de ADN

Para poder tener una descripción del estatus fisiológico de las células se escogieron un conjunto de genes relacionados, bien en la literatura o por trabajos del laboratorio, con diferentes respuestas celulares a los cambios ambientales y nutricionales. Tratando de tener siempre varios genes relacionados con la misma señal, se buscaron *in silico* las secuencias de los homólogos a estos en el cromosoma de *P. putida* KT2440 (www.tigr.org).

Una vez obtenidas las regiones codificantes, se diseñaron cebadores para amplificar fragmentos de cada gen usados en la construcción del *array*. Los cebadores fueron diseñados automáticamente por un programa informático realizado por el Dr. Cases para la ocasión asegurando siempre una temperatura de hibridación mayor a 55 °C

(Cases I, datos sin publicar). Los genes se amplificaron por PCR a partir de preparaciones de ADN cromosómico, se comprobó la especificidad de la reacción por electroforesis en geles de agarosa, y se purificaron los productos resultantes.

A continuación se detallan las secuencias de los oligonucleótidos usados para amplificación de genes colocados en el *array* de ADN diseñado y utilizado en este trabajo.

NOMBRE	DIRECTO	REVERSO
<i>ahpC</i>	CCCTTCAACGCCACCG	GCCTACGAGGTCCAGC
<i>algU</i>	GCAGCTTGTCGAGCGC	ACAACGGCTGCAGGGC
<i>armG</i>	CCGGTGCAACGTGCCG	AGCGCGTTCGAAGCGG
<i>betA</i>	TCATCGTCGGTGCCGG	CACGCATCGGCTTGCC
<i>betB</i>	GGCCCGTTTTCGGAACG	CCGAGTTGTAGCCGCC
<i>catA</i>	CTCACCACCGCTAGCG	GCCTTTGCAATCCCTTCGC
<i>clpP</i>	GCTCTGACATCCAGGCC	CAGGAGGCCAGTTGCC
<i>clpX</i>	GACACCCGTAACGGCG	ATCAGGCGTCTGGCGC
<i>cspA</i>	CCGTGATACCGGCACC	CCACGTCTTCGGCCTG
<i>cstA</i>	ATTCCGTGGCTGGCGC	GAACGCCGGGCCCC
<i>cti</i>	GCGCCTTCCCCCTGCTCATC	GCTCGTACAGCCAGCGTCC
<i>cysK</i>	CGCAGACAACGCCAC	GCTGGGTTTCTGCTCG
<i>hupA</i>	ACCAGAACTCGCCGCC	CTTGGCTGGCTTGGCG
<i>hupN</i>	GATTGCCGACATCGCCG	GATGGCGTCGGTCAGC
<i>dnaJ</i>	GAGGTCCCTGGGTGTCG	GATCGCCGAAGAAGCGC
<i>dnaK</i>	CGGTATCGACCTGGGG	TCGAACTCGGCGTCAACC
<i>fliA</i>	GAACGCCAGCGGCTTC	TCAACGCGCCCGCCAT
<i>ftsH</i>	TCATCGCAGCTGTCTGG	GTGTTTACAGCCGCTGGG
<i>fur</i>	GCGCAAAGCCGGTCTC	CGCACGTACAGGACCAG
<i>zwf-1</i>	GGCCGCAATCAGTGTCG	TCCCCATAACCACGCC
<i>gacA</i>	GTTGGCCGACATCGACGGCC	GCGTCAACCATAACCGTGGCG
<i>glnA</i>	TGTCGAAGTCGGTTCAACTC	GCTCGTATTCCAGCGGG
<i>gltB</i>	CAGGTCTGTACCATCCCG	CGACGAGCCACGGCCC
<i>groEL</i>	TTGGTGATTCCGCTCGTAAG	TCATGCCGCCCATGCC
<i>groES</i>	CCTCTGCATGACCGCG	GCCTTCGACAACGGCG
<i>gstA</i>	GTTGAGCCTGCTGGGCCGGC	GCCGCGGGTGGCTGCTGAC
<i>hsp</i>	TCACGATACCCGCCCG	ATAGGCGCGCTCAGCG
<i>hupB</i>	GACGCTATCGCCGCATC	CGGCGTCTTTCAGGCC
<i>lexA</i>	CTGACGCCACGCCAAG	CAGCGGCGAATGACGC
<i>lrp</i>	CGACCGCAACATCCTGC	GCTCTCCTTCACCTCTTCC
<i>msrA</i>	GAACAAAACGTCATGCC	CAGTTACCTTGCAAGGCTGG
<i>mucA</i>	GGAATCGCTGTCCGCG	TTTCCAGGCTGGCGGC
<i>ntnC</i>	GGATCGTCGACGATGATCGC	GGATCACGTTTACGGCGGTGG
<i>phaC1</i>	GAGCTACAGCGGCAGG	TCAGGTGCGGCTTGCC
<i>phaC2</i>	TCGACAACGCTCCCCG	CGGGTCAGCACGTAGG
<i>phaZ</i>	CAGGACCGTCGAGCTG	TCACCCCCCGAGGCC
<i>pigA</i>	TCCCCCATGACCGACC	CTGGGTGAAGCGCTCG
<i>proP</i>	GCGTCCAGCCAATCGG	TTCGATGCGCGGGTGC
<i>proV</i>	ACGGTACGAGGGGAGC	GCCGATATGCGGCCGC

<i>proX</i>	TTCCTTTCCCGCGGGC	TTGGGCAGCCACCTGG
<i>ptsN</i>	ACCATCCTGACCCCG	CGTCCAGGACAACCTGG
<i>ptsO</i>	ATGCCC GCCCGCGAAA	GATCAGCTCGACCAGCG
<i>pvdE</i>	AAACCACGTGGCGCCG	GCAATCTGCGACGCGG
<i>pvdS</i>	ATGGCGGAACA ACTATCCAC	CTTCAGGCCTGGCGAC
<i>recA</i>	AGAAGCGCGCCTTGGC	AACCGGCGTCAGCGTC
<i>recN</i>	GCTGGTGCACCTGTCC	TCAGGCCTTGCCGCTC
<i>relA</i>	GAGAGTGCACCAGCCG	CACGCCAGTGGCGAGC
<i>rpoD</i>	GCGCAACAGCAGTCTCG	CGTCGAGGAAGGAGCG
<i>rpoH</i>	CCTGCCATATGCCCTGG	GGCAGCGATCAGTGCC
<i>rpoN</i>	GGGCCAGCAACTGACG	CGCTTGCGTTCGCTCG
<i>rpoS</i>	GTGCCGGAGTTTGACATCG	GACTCGCTGGACAGACC
<i>sodA</i>	GCCCCATACCTTGCCCTG	GGGCTTCAAGGTAACGACG
<i>sodB</i>	GAATTGCCGCCGCTGC	GCCTTCGAACTGCTCGG
<i>spoT</i>	AGCCTTGGCCGAACGG	CGGCGCTTGCCGCGC
<i>ssuD</i>	CTGGTTCCTCCCCACC	GGGCAGGATGTCGTTGG
<i>trkA</i>	TCATCCTCGGCGCAGG	GCCGACGTGGAACAGC
<i>vfr</i>	ATGGTTGCCTCCGCC	CTAGCGGGTACCGTGG
<i>xylA</i>	CTCTGGTTTATTTGTGCCGC	CGGTCCGCAAACACTAATTC
<i>xylB</i>	CAAAGCAGCAATAGTTCGCC	CCAATCCGGAGTACCGG
<i>xylC</i>	GCAGCCTATCTGGTACGG	GGGTAATTAGCTGGCTTCTC
<i>xylE</i>	GTAATGCGACCGGGCC	CAGGTCAGCACGGTCATG
<i>xylF</i>	CGCACCGCAGCAAAGC	GGAATGGAGGGGCGTCG
<i>xylG</i>	AGCGGTGAATTAGTCGGTTC	CAGCTCGGTGTAGAACTCC
<i>xylH</i>	CCTTGAAGGCCGCGAGC	TGCTGGCCAGTTCGCC
<i>xylI</i>	CGTACCCTCAACCGCG	TCAGACGAAGCGCGCG
<i>xylJ</i>	CGAACTCGGCGACGAG	GGCGATGCCGAAGTGG
<i>xylK</i>	GACCTTCAACCCCGGC	GTTGCTCCTTGCGGGC
<i>xylL</i>	CCAGGGCAAGGTTGCC	ACAGCTCTGGCAGCCG
<i>xylM</i>	GGACACGCTTCGTTATTACC	TGCTAGCCACCCGACC
<i>xylN</i>	GTAATTAGTGGTGCATCTTGG	GGCCAGGACGAAATTATCTTG
<i>xylQ</i>	GCGATCATAGGCCCAGG	CAGGCGTTCAGCAGCG
<i>xylR</i>	CCCAAGATGCAGCATGAGG	CGGCCATTGCTTTCACAG
<i>xylS</i>	GTCAGATCTTCGTCCACGC	TGACGCAGGGTGTCCG
<i>xylT</i>	CAGTGCCGGCTACGAG	GTTGTCAGGTTTGTTCGCC
<i>xylU</i>	TCAGATTGGTTGCTTTCGCC	GCAGCTGTGACTGCGG
<i>xylW</i>	AAGCAGGGCCAGGAGG	GCCATTGGGCTCAAACAGG
<i>xylX</i>	ATGCACCTGGGGCTCG	ACACGCCCTCCGCATG
<i>xylY</i>	CCTACGAAGCCGTGCG	CATCGATAACTTGGCGGATG
<i>xylZ</i>	CGAAGACGGCGTCACTC	CTAGGCGCTGGCGGGC

Los productos purificados de los genes escogidos fueron depositados en portamuestras de microscopios tratados especialmente para unir fragmentos de ADN, Superepoxyde Slides ArrayIt™. Este tipo de superficie permite la unión covalente por reacción de las aminas del ADN con los grupos epóxidos del portamuestras. En las

siguientes tablas se presentan los genes elegidos para monitorizar la respuesta a estos estreses.

Dado el papel central que desempeñan los factores sigmas en la transcripción de los genes, se eligieron 7 factores sigmas y un regulador de la actividad AlgU (Cunliffe *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1993a; Martin *et al.*, 1993b; Starnbach and Lory, 1992).

Factores sigmas

<i>rpoD</i>	$\sigma 70$
<i>rpoN</i>	$\sigma 54$
<i>rpoH</i>	$\sigma 32$
<i>algU</i>	Síntesis de alginato en <i>P. aeruginosa</i>
<i>mucA</i>	Modulador del factor σ AlgU
<i>pvdS</i>	σ del regulón de hierro
<i>fliA</i>	Síntesis del flagelo
<i>rpoS</i>	Fase estacionaria/Estrés

Como muchos de los compuestos tóxicos que se encuentran en los sitios altamente contaminado producen un estrés oxidativo, se decidió incluir en *array* genes que pudieran poner de manifiesto esta condición (Hasset *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1999; Polack *et al.*, 1996).

Estrés oxidativo

<i>sodA</i>	Superóxido dismutasa
<i>sodB</i>	Superóxido dismutasa
<i>cata</i>	Catalasa
<i>zwf-1</i>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

Tanto porque la adición de compuestos puede alterar la presión osmótica del medio, como porque los ambiente en los que *P. putida* se encuentra son muy diversos, genes

relacionados con la respuesta choque osmótico fueron colocados en el *array* (Culham *et al.*, 1993; Lamark *et al.*, 1991).

Estrés osmótico

<i>betA</i>	Colina deshidrogenasa
<i>betB</i>	Betaína aldehído deshidrogenasa
<i>trkA</i>	Transportador de potasio
<i>proP</i>	Componente del transportador de prolina/betaina
<i>proV</i>	Componente del transportador de prolina/betaina
<i>proX</i>	Proteína periplásmica de unión a prolina

El metabolismo del hierro ha sido objeto de estudio de numerosos trabajos, que han puesto manifiesto la importancia especial que tiene este elemento en el metabolismo bacteriano. Añadido a esto, la participación de *fur* en otros procesos, entre ellos de respuesta a estrés, nos decidió a incluir genes que pudieran reflejar unos requerimientos de este elemento en el *array* (Venturi *et al.*, 1995).

Hierro

<i>pigA</i>	Oxigenasa de grupo hemo
<i>fur</i>	Regulador de captación de hierro
<i>pvdE</i>	Sistema exportador de pioverdina

Como la disponibilidad de nutrientes determina en gran medida que tipo de metabolismo es el que va a llevar a cabo la bacteria, decidimos colocar en el *array* genes relacionados con la carencia de fuente de nitrógeno y azufre. Relacionado con procesos carenciales colocamos genes involucrados en el disparo de la respuesta estricta (Quadroni *et al.*, 1996; Reitzer and Magasanik, 1985; Ueno-Nishio *et al.*, 1984; Williams *et al.*, 1994).

Nitrógeno

<i>ntnC</i>	Proteína de regulación de nitrógeno (I)
<i>gltB</i>	Subunidad alfa de glutamato sintasa
<i>glnA</i>	Glutamina sintetasa

Azufre

Gen

<i>ssuD</i>	Sulfonato monoxigenasa.
<i>ahpC</i>	Alquil hidropéroxido reductasa
<i>cysK</i>	O-acetilserina sulfidrilasa A

Respuesta estricta

<i>spoT</i>	ppGppp pirofosforilasa
<i>sspA</i>	Proteína inducida por <i>starvation</i>

No solo porque las variaciones de temperatura en el medio ambiente sean algo general, sino también porque muchos de los genes que participan de esta respuesta participan también en la respuesta a otro tipo de agresiones a las que tienen que responder las bacterias, se colocaron estos en el *array* (Craig *et al.*, 1994; Sherman and Goldberg, 1992).

Choque térmico

<i>groEL</i>	Chaperona
<i>groES</i>	Chaperona
<i>fisH</i>	Proteasa
<i>dnaK</i>	Chaperona
<i>dnaJ</i>	Chaperona
<i>clpP</i>	Proteasa
<i>clpX</i>	Proteasa
<i>hsp</i>	Chaperona
<i>cspA</i>	Proteína de choque de frío

En la siguiente tabla se agrupan genes relacionados con el metabolismo de diversas maneras, así se colocan dos genes del sistema PTS de *P. putida* que han sido involucrados en la regulación de la ruta TOL; genes responsable de la síntesis y acumulación de PHAs, un tipo polímeros de reserva de carbono; y dos genes descritos

se inducen ante la falta de fuente de carbono en otros organismos (Fraley *et al.*, 1998; Schultz and Matin, 1991).

Miscelánea de Carbono

<i>ptsN</i>	EIIANtr
<i>ptsO</i>	Npr
<i>phaC1</i>	Polimerasa de PHA 1
<i>phaC2</i>	Polimerasa de PHA 2
<i>phaZ</i>	Depolimerasa de PHA
<i>armG</i>	Succinil-ornitin aminotransferasa
<i>cstA</i>	Proteína de hambre de carbono

En esta tabla se agrupan un conjunto de genes no relacionados con exclusivamente con ninguno de los grupos anteriores y con los que se pretende reflejar algunas respuestas a estrés o cambios globales del estatus celular. En este sentido, genes como *recA*, *recN* y *lexA*, median la respuesta al daño del ADN; las proteínas codificadas por los genes *hupABN*, participan en la modulación de la topología del ADN; *cti*, *msrA* y *gst*, responden a estreses desnaturalizantes en general. Finalmente se incluyeron *lrp* y *gacA* por aparecer relacionados en la transmisión de señales que disparan diversos procesos celulares (Bartels *et al.*, 2001; Brent and Ptashne, 1981; Delic-Attree *et al.*, 1995; Laville *et al.*, 1992; Reimmann *et al.*, 1997; Rostas *et al.*, 1987; Willins *et al.*, 1991).

Miscelánea

<i>recA</i>	Recombinasa A
<i>recN</i>	Proteína de reparación de daño a ADN
<i>lexA</i>	Regulador de la respuesta SOS
<i>hupB</i>	Proteína de unión a ADN
<i>hupA</i>	Proteína de unión a ADN
<i>hupN</i>	Proteína de unión a ADN
<i>lrp</i>	Proteína de respuesta a leucina
<i>gacA</i>	Regulador global

<i>cti</i>	<i>cis-trans</i> isomerasa de acidos grasos insaturados
<i>msrA</i>	Reductasa de metionina sulfoxido
<i>gst</i>	Glutación S-transferasa

Para monitorizar la expresión de la ruta TOL, se colocaron los siete genes que constituyen la ruta *upper*, así como el gen que codifica para su activador; y diez de los trece que forman la ruta *meta*, así como *xylS*, su activador.

Upper

<i>xylU</i>	----
<i>xylW</i>	Bencilalcohol deshidrogenasa
<i>xylC</i>	Benzaldéhidido deshidrogenasa
<i>xylM</i>	Subunidad 1 de xileno monooxigenasa
<i>xylA</i>	Xileno monooxigenasa, componente de transferencia de electrones
<i>xylB</i>	Bencilalcohol deshidrogenasa
<i>xylN</i>	----

XylR

Regulador transcripcional

Meta

<i>xylX</i>	Subunidad alfa de la Toluato 1,2-dioxigenasa
<i>xylY</i>	Subunidad beta de la Toluato 1,2-dioxigenasa
<i>xylL</i>	2-hidro-1,2-dihidroxi-benzoato dehidrogenasa
<i>xylT</i>	Ferredoxina
<i>xylE</i>	Catecol 2,3-dioxigenasa
<i>xylF</i>	2-hidroxiacetoaldehido hidrolasa
<i>xylJ</i>	2-hidroxiacetoaldehido hidrolasa

<i>xylQ</i>	Acetaldehído dehidrogenasa
<i>xylK</i>	4-hidroxi-2-oxoalerato aldolasa
<i>xylI</i>	4-oxalocrotonato decarboxilasa

xylS Regulador transcripcional

Como resultado de las ampliificaciones de logró representar en el *array* casi la totalidad de las unidades transcripcionales de la ruta TOL (Fig. 47)

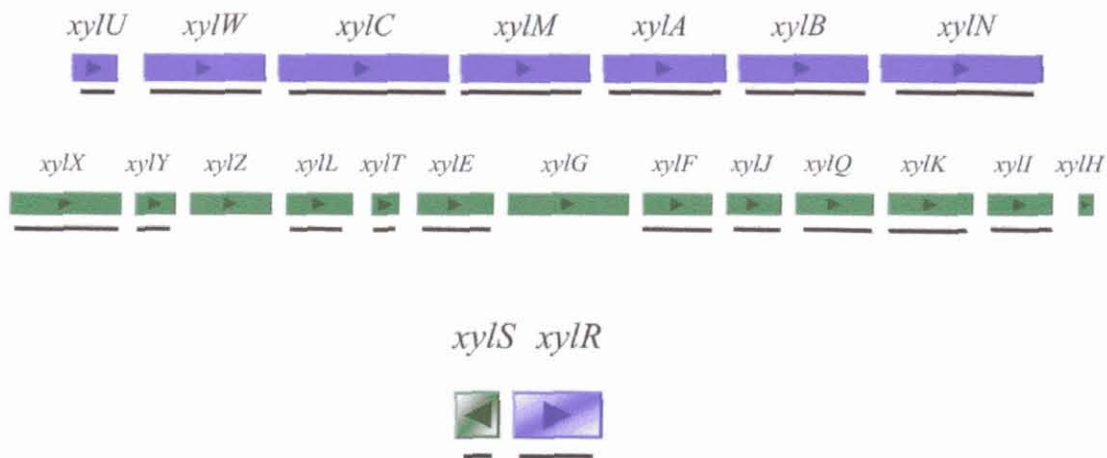


Figura 47. Esquema de los segmentos de los genes de la ruta TOL representados en el *array* por los productos PCR.

Previo al uso de los *arrays* se realizaron una pruebas que permitieran validar el uso de esta tecnología para los objetivos marcados. Se realizó un marcaje inespecífico de todos los puntos del *array*. Para ellos se realizó una hibridación con oligonucleótidos degenerados ya marcados (GIBCO, California, EEUU). Esto debería producir una imagen en el escáner donde se detectara señal en todos los puntos del *array*. Como se observa en la Figura 48, todos los puntos dieron señal mas o menos homogénea, lo que indica que no existen grandes diferencias entre las cantidades depositadas de cada gen.

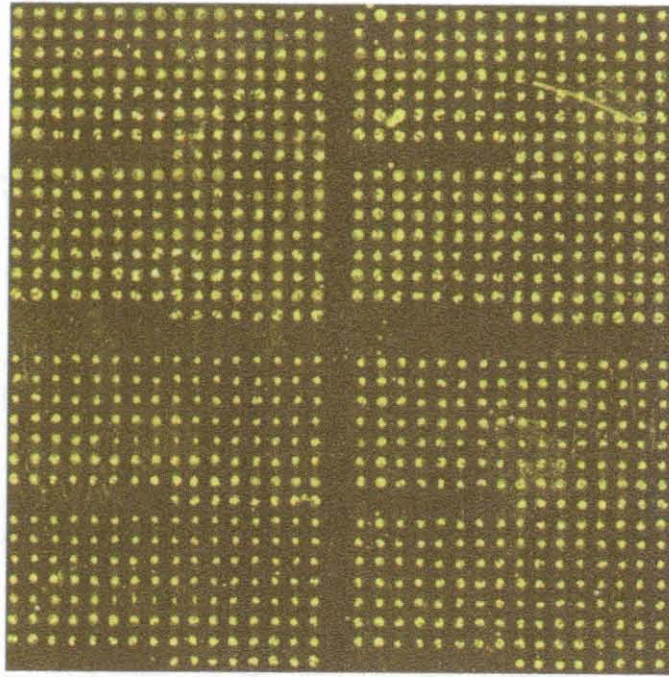


Figura 48. Lectura de la hibridación con oligonucleótidos degenerados del *array* construido en este trabajo.

Si seguimos el proceso de tratamiento de los datos seguidos en todos los experimentos y representamos las intensidades de fluorescencia emitidas por cada fluoróforo, se obtiene en este caso una agrupación de los puntos en una línea.

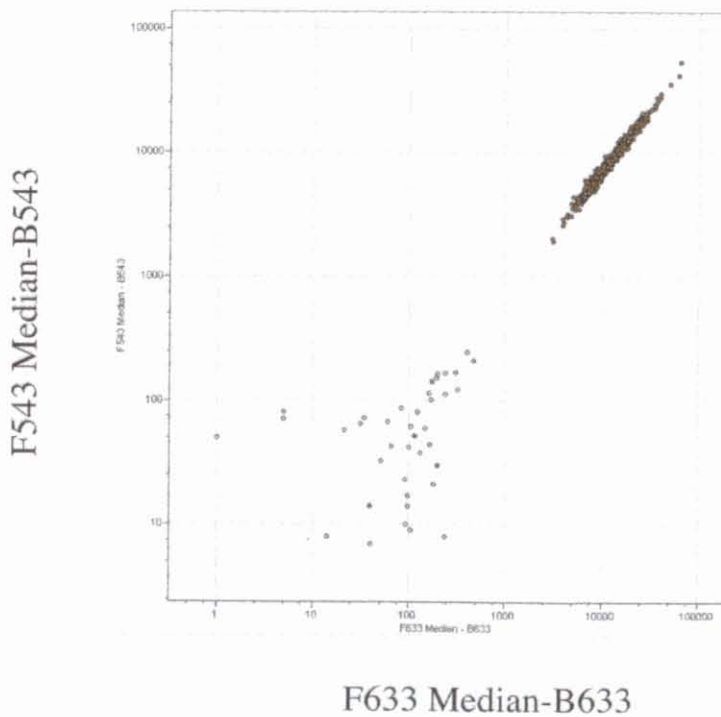


Figura 49. Representación de las intensidades de cada fluoróforo en la hibridación realizada con oligonucleótidos degenerados. En esta representación las intensidades provienen ambas de una marcaje con Cy3.

Se observa como todos los genes presentan una *ratio* entre las intensidades igual a uno, lo que corresponde a la situación de este experimento. En la parte inferior de la imagen aparecen puntos alejados de la diagonal de ratio uno, todos estos puntos corresponden a lugares vacíos en el *array*, son automáticamente descartados por el programa para el análisis; se observa que todos ellos presentan una suma de las intensidades de fluorescencia menor de 1000. Como se pone de manifiesto en la Figura 50 cuando realizamos comparaciones en las que si hay diferencias entre las condiciones de cultivo se observan imágenes en el escáner como la que se muestra a continuación.

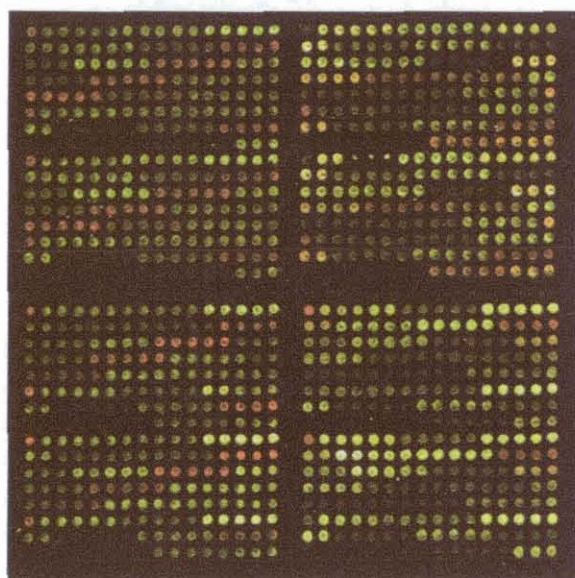
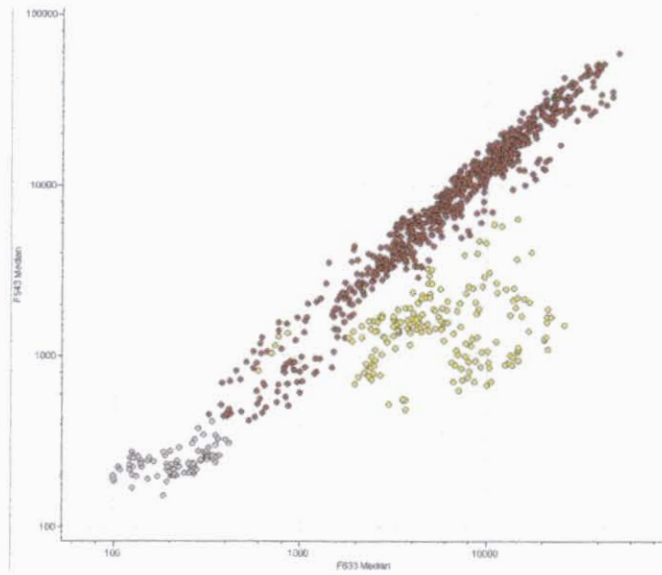


Figura 50. Imagen artificial generada por el escáner y que presenta en amarillo puntos con igual intensidad de fluorescencia debida a cada fluoróforo, y en rojo o verde cuando uno es emite mas fluorescencia que el otro.

En esta imagen que corresponde a una comparación entre un cultivo crecido con succinato como fuente de carbono y otro al que se le ha añadido *m*-xileno, aparecen puntos rojos, verdes, en distintas intensidades. Estos puntos también aparecen en la representación enfrentadas de las fluorescencia de forma diferencial, los amarillos se encuentran formando una línea central correspondiente a una ratio igual a 1, y los puntos rojos y verdes se colocan a uno y otro lado de esta, mas alejado cuanto mas se aleja su ratio de 1. En la Figura 51 se han marcado en amarillo los genes de la ruta TOL que se sabe son inducidos en esta condición.

F543 Median-B543



F633 Median-B633

Figura 51. Representación de las intensidades de fluorescencia emitidas por cada fluoróforo en una hibridación comparando un cultivo crecido en medio mínimo y succinato, con otro al que se le ha añadido *m*-xileno. En amarillo se marcan los puntos correspondientes a los genes de las rutas TOL.

ANEXO 2

Experimentos con vertido de fuel

Como la tecnología de los *arrays* de ADN nos habían posibilitado el visualizar el efecto de estreses individuales en *P. putida*, decidimos utilizar los *arrays* para esbozar la respuesta de *P. putida* a un estresante complejo. La disponibilidad de muestras procedentes del vertido del tanque petrolífero *Prestige* nos dio la oportunidad de observar como *P. putida* responde a un contaminante complejo natural.



Figura 52. A. Fotografía aérea mostrando el área del vertido. B. Fotografía del tanque petrolífero en el momento de la rotura.

Composición del fuel

Análisis sobre la composición del vertido han sido realizados por diferentes institutos y se encuentran disponibles en distintas direcciones *web* así como mas datos sobre el vertido:

www.le-cedre.fr/fr/prestige/fichiers/museum.pdf

www.ifremer.fr/envlit/prestige/prestige_fioulana.htm

www.accede.org/prestige/prestige-eng.htm

www.csicprestige.iim.csic.es/

Las muestras utilizadas en este estudio fueron tomadas en diciembre de 2002 en la costa gallega; se mantuvieron en botes cerrados herméticamente hasta su uso.

Para la realización de los experimentos se realizaron curvas de crecimiento de la cepa *P. putida* mt-2 con distintas concentraciones de fuel y se escogió una concentración subletal de este para los experimentos de *arrays*.

Para añadir el fuel se prepararon, el mismo día de su uso, emulsiones de vertido en sales M9 con Tritón X-100 al 0.05%. A 125 ml de estas sales se le añadieron 5 ml de vertido y se incubaron durante 3 horas a 37 °C y 250 r.p.m. (Fig. 53). De esta emulsión se tomaron 500 µl y se añadieron a 20 ml de cultivo.

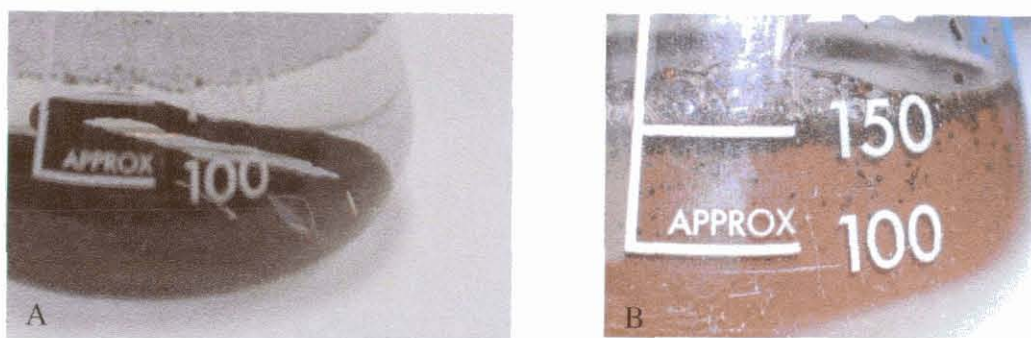


Figura 53. Fotografías de las sales M9 + Triton X-100 0.05 % y el vertido de fuel, antes (A) y después (B) de su emulsión.

Para la realización de los experimentos se creció un cultivo de *P. putida* mt-2 hasta DO 600nm aproximadamente 0,5. Este cultivo crecido se dividió en dos: a uno se le añadieron 500 µl de la emulsión de fuel y el otro permaneció como condición de referencia. Ambos cultivos se incubaron a 30 °C y se realizaron extracciones de ARN a los 15 minutos, 1 hora, 3 horas y 4 horas desde la adición de fuel (Fig. 54).

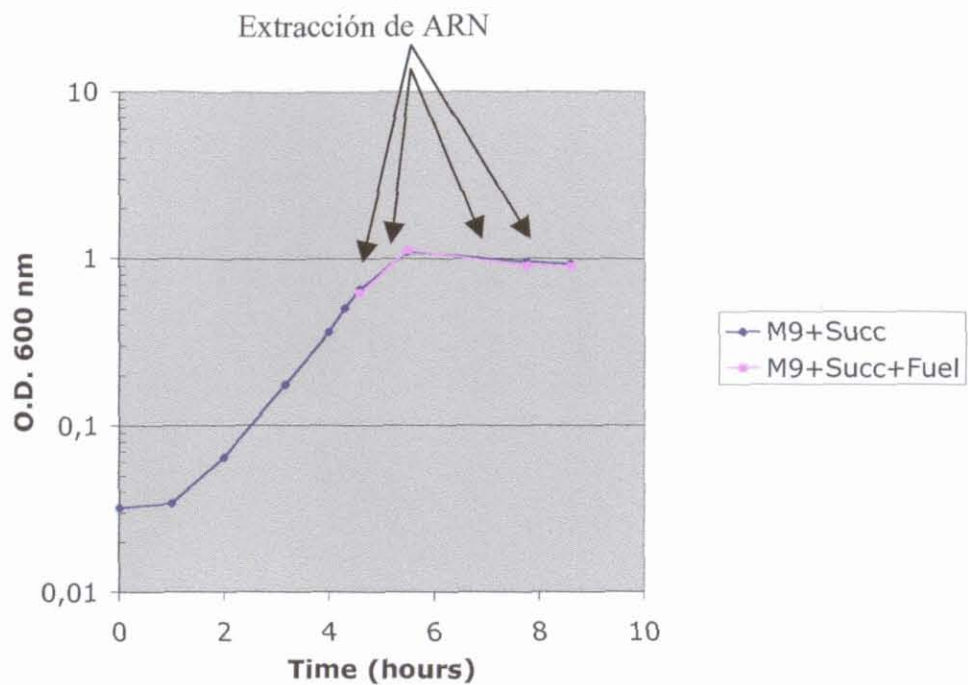


Figura 54. Curva de crecimiento durante los experimentos con vertidos de fuel. Se señalan los puntos de la curva donde se realizaron las extracciones de ARN total (15 minutos, 1 hora, 3 horas y 4 horas después de la adición de la emulsión de fuel).