

~~F. And. 24/112~~  
t 4/62

Facultad de Ciencias  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	613386906
Nº Copia	15494573

**CATABOLISMO DE LA PROLINA EN *P. putida* KT2440.  
CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE CONTENCIÓN  
BIOLÓGICA DEPENDIENTE DE PROLINA.**

Susana Vilchez Tornero

2000

CATABOLISMO DE LA PROLINA EN *P. putida* KT2440.  
CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA  
DEPENDIENTE DE PROLINA.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 17/10/00
ENTRADA NUM. 2258

Memoria que presenta la Licenciada en  
Ciencias Químicas Susana Vílchez Tornero  
para aspirar al Título de Doctor

Fdo. Susana Vílchez Tornero

Vº Bº

El director

Fdo.: D. Juan Luis Ramos Martín  
Doctor en Biología  
Investigador Científico del C.S.I.C.

Universidad de Granada  
2000

**Esta Tesis Doctoral ha sido realizada  
en la Unidad Estructural de Bioquímica y  
Biología Molecular y Celular de Plantas de  
la Estación Experimental de Zaidín  
(C.S.I.C.), Granada.**



## ÍNDICE

---

<b>ÍNDICE</b>	i
<b>ABREVIATURAS</b>	viii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	ix
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
1. Propiedades fisicoquímicas de la prolina	6
2. La biosíntesis de prolina	7
3. Funciones fisiológicas de la prolina	10
3.1. Papel estructural de la prolina	10
3.2. Papel osmoprotector de la prolina	14
3.2.1. Transporte de prolina al interior celular en respuesta al estrés osmótico.	17
3.2.2. Biosíntesis de prolina.	18
3.2.3. Represión de la ruta catabólica de la prolina en condiciones de estrés.	19
3.3. Papel de la prolina como fuente de carbono, nitrógeno y energía.	20
3.3.1. Estructura y regulación del operón del catabolismo de la prolina en enterobacterias.	21
3.3.2. Estructura y regulación del operón del catabolismo de la prolina en <i>Rhodobacter capsulatus</i> .	26
3.3.3. Estructura y regulación del operón del catabolismo de la prolina en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .	27
3.3.4. Estructura y regulación del operón del catabolismo de la prolina en <i>Sinorhizobium meliloti</i> .	28
4. Diseño de un sistema activo de contención biológica dependiente de prolina.	29
<b>OBJETIVOS</b>	35

---

**MATERIALES Y MÉTODOS**

1. CEPAS BACTERIANAS.	39
2. MEDIOS DE CULTIVO.	39
2.1. Medios ricos.	40
2.2. Medios mínimos.	40
2.3. Antibióticos.	41
2.4. Metales pesados.	41
2.5. Condiciones de cultivo.	41
3. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.	41
4. PLÁSMIDOS.	41
5. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO.	
5.1. Método “Qiapreps”.	49
5.2. Método de la lisis alcalina.	49
6. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL.	50
7. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS.	50
7.1. Transferencia por conjugación.	50
7.2. Transformación mediante choque térmico.	51
7.3. Transformación por electroporación.	51
8. TÉCNICAS COMUNES DE MANIPULACIÓN DE ADN Y ARN.	52
8.1. Determinación de la concentración de ADN y ARN.	52
8.2. Restricción de ADN.	52
8.3. Defosforilación de ADN con fosfatasa alcalina.	53
8.4. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa.	53
8.4.1. Electroforésis de ADN.	53
8.4.2. Electroforésis de ARN.	54
8.5. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.	54
8.6. Ligación de ADN.	55
9. SECUENCIACIÓN DE ADN.	55
10. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.	56
11. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN EN CADENA CON ADN POLIMERASA TERMORRESISTENTE (PCR).	57
12. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE CEBADOR.	59

12.1. Extracción de ARN.	59
12.2. Marcaje de cebadores.	60
12.3. Reacción de extensión.	61
12.4. Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis.	61
13. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA DE NILÓN CARGADA POSITIVAMENTE POR EL MÉTODO DE “SOUTHERN BLOT” E HIBRIDACIÓN.	62
13.1. Transferencia de ADN por capilaridad.	63
13.2. Marcaje no radiactivo de ADN lineal.	63
13.3. Prehibridación e hibridación.	64
13.4. Reacción inmunológica.	64
14. MUTAGÉNESIS.	65
14.1. Mutagénesis por transposición.	65
14.2. Mutagénesis al azar <i>in vitro</i> .	66
15. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA.	66
16. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLINA DESHIDROGENASA.	67
17. OBTENCIÓN DE EXUDADOS RADICULARES.	68

## RESULTADOS

<b>CAPÍTULO I. Aislamiento, clonación y secuenciación del operón del catabolismo de la prolina en <i>P. putida</i> KT2440.</b>	73
1. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 en prolina.	73
2. Aislamiento del operón del catabolismo de la prolina en <i>P. putida</i> KT2440.	75
3. Subclonación y secuenciación de los fragmentos <i>Pst</i> I procedentes del cósmido pCRR831.	76
3.1. Análisis del inserto del plásmido pLCR12.	76
3.2. Análisis del inserto del plásmido pLCR4.	82
3.3. Construcción, secuenciación y análisis del plásmido pSLH4.	82
4. Análisis del operón del catabolismo de la prolina en <i>P. putida</i> KT2440.	84

4.1. Análisis de la proteína PutA de <i>P. putida</i> KT2440.	86
4.2. Análisis de la proteína PutP de <i>P. putida</i> KT2440.	91
<b>CAPÍTULO II. Estudio de la expresión de los genes del operón del catabolismo de la prolina en <i>P. putida</i> KT2440.</b>	<b>95</b>
1. Caracterización de la expresión del operón del catabolismo de la prolina mediante determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa en fusiones transcripcionales con el gen 'lacZ.	95
1.1. Construcción de las fusiones transcripcionales de los promotores de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> con el gen reportero <i>lacZ</i> .	95
1.2. Estudio de la expresión de los promotores <i>PputA</i> y <i>PputP</i> en medios con y sin prolina a lo largo del tiempo.	96
1.3. Estudio de la inducción de los promotores <i>PputA</i> y <i>PputP</i> con distintas concentraciones de prolina.	98
1.4. Expresión de los promotores <i>PputA</i> y <i>PputP</i> en presencia de glutamato.	99
2. Caracterización de la expresión del operón del catabolismo de la prolina mediante determinación de los niveles de ARN mensajero.	101
2.1. Estudio de la inducción pro prolina de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> de <i>P. putida</i> KT2440 y determinación del origen de transcripción de los mismos.	101
2.2. Expresión de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> de <i>P. putida</i> KT2440 en distintos medios de cultivo.	103
2.3. Análisis de la expresión de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> en células cultivadas con distintas concentraciones de prolina mediante extensión reversa a partir de cebador.	105
2.4. Análisis de la participación de distintos factores transcripcionales en la expresión de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> .	106
<b>CAPÍTULO III. Obtención y caracterización de mutantes de <i>P. putida</i> KT2440 deficientes en el catabolismo de la prolina.</b>	<b>111</b>
1. Obtención de mutantes en el catabolismo de la prolina.	111
1.1. Mutagénesis de <i>P. putida</i> KT2440 con mini-Tn5	111

---

1.2. Selección de mutantes espontáneos resistentes a 3,4 dehidro D,L- prolina, un análogo tóxico de la prolina.	112
2. Caracterización de los mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina de <i>P. putida</i> KT2440.	113
2.1. Crecimiento de los mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 en medio mínimo.	113
2.2. Estudios de complementación de los mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 con el cósmido pCRR831.	117
2.3. Medida de la actividad prolina deshidrogenasa en la cepa silvestre <i>P. putida</i> KT2440 y en los mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216.	119
2.3.1. Medida de la actividad prolina deshidrogenasa en <i>P. putida</i> KT2440.	119
2.3.2. Medida de la actividad prolina deshidrogenasa en los mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 y en los clones S14D2 (pCRR831) y PRO-21 (pCRR831).	120
2.4. Expresión de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> en los mutantes de <i>P. putida</i> KT2440 deficientes en el catabolismo de la prolina.	121
3. Localización de las mutaciones que afectan al catabolismo de la prolina en los mutantes de <i>P. putida</i> .	123
3.3. Localización de la mutación que afecta a los mutantes obtenidos por mutagénesis al azar con el transposón mini-Tn5 <i>luxABK</i> m.	123
3.3.1. Determinación de la localización del miniTn5 mediante hibridación.	123
3.3.2. Localización de la inserción del miniTn5 mediante secuenciación de las regiones adyacentes.	126
3.3.2.1. Clonación de la región de ADN adyacente al minitransposón miniTn5 <i>luxABK</i> m en distintos mutantes de <i>P. putida</i> KT2440.	126
3.3.2.2. Secuenciación y análisis del ADN flanqueante al miniTn5 en cada uno de los mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina.	128

---

3.1.2.2.1. Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante S14D2.	128
3.1.2.2.2. Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante S15D3.	129
3.1.2.2.3. Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante S14D11.	129
3.1.2.2.4. Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante S16D2.	130
3.4. Localización de la mutación en los mutantes resistentes a la 3,4 dehidroprolina.	131
3.2.1. Localización de la mutación en el mutante CRR216.	131
3.2.2. Localización de la mutación en el mutante PRO-21.	132
<b>CAPÍTULO IV. Primeras aproximaciones en la construcción de una cepa de <i>P. putida</i> KT2440 portadora de un sistema activo de contención biológica dependiente de prolina.</b>	135
1. Estudio de la expresión de los genes <i>put</i> en los exudados de la raíz de plantas de maíz.	135
2. Construcción de un sistema activo de contención biológica en <i>P. putida</i> KT2440.	137
2.1. Construcción de una cepa de <i>P. putida</i> portadora del elemento regulador del sistema de contención.	137
2.1.1. Construcción de las fusiones transcripcionales $P_{putA}::lacI$ y $P_{putP}::lacI$ .	137
2.1.2. Clonación del elemento regulador en un vector de transferencia.	139
2.1.3. Construcción de una cepa de <i>P. putida</i> portadora del elemento regulador del sistema de contención dependiente de prolina.	142
2.2. Expresión del gen <i>lacI</i> en presencia y ausencia de prolina.	143
2.3. Construcción de una cepa de <i>P. putida</i> KT2440 portadora del sistema de contención biológica dependiente de prolina.	144
3. Mejora del sistema activo de contención biológica.	145
3.1. Modificación de la región de ADN comprendido entre	

los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> .	145
3.1.1. Obtención de regiones promotoras-reguladoras mutantes con niveles basales de expresión menores que la silvestre.	145
3.1.2. Construcción de un nuevo sistema de contención biológica con un elemento regulador basado en la fusión $P_{put44}::lacI$ .	149
3.1.2.1. Construcción de la fusión $P_{put44}::lacI$ .	149
3.1.2.2. Clonación de la fusión $P_{put44}::lacI$ en un vector de transferencia y construcción de una cepa de <i>P. putida</i> portadora en el cromosoma de dicha fusión.	149
3.1.2.3. Construcción de una cepa suicida basada en el elemento regulador $P_{put44}::lacI$ .	150
3.2. Estudio del efecto del aumento de la dosis de la proteína PutA en la expresión de los promotores $P_{put}$ .	150

## DISCUSIÓN

1. El operón del catabolismo de la prolina en <i>P. putida</i> es similar en estructura y función al de enterobacterias.	156
2. Los promotores de los genes <i>put</i> se localizan en la región de ADN existente entre el gen <i>putA</i> y el <i>putP</i> .	158
3. Los genes del operón <i>put</i> de <i>P. putida</i> son inducibles por prolina.	159
4. La proteína PutA de <i>P. putida</i> posee un papel regulador de la expresión del operón <i>put</i> .	161
5. La función enzimática y reguladora de la proteína PutA son dos funciones independientes.	162
6. El factor $\sigma^{54}$ interviene de forma indirecta en la transcripción de los genes <i>put</i> .	163
7. El operón del catabolismo de la prolina podría estar integrado en un mecanismo de regulación superior.	164
8. Construcciones preliminares en el desarrollo de un sistema activo de contención biológica dependiente de prolina.	171
<b>CONCLUSIONES</b>	175
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	179

## ABREVIATURAS

<b>Ap</b>	ampicilina
<b>Cm</b>	cloramfenicol
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNasa</b>	desoxirribonucleasa
<b>dNTPs</b>	desoxinucleótidos
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetracético
<b>IPTG</b>	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>kb</b>	kilobases
<b>Km</b>	kanamicina
<b>K<sub>m</sub></b>	constante de Michaelis-Menten
<b>MCS</b>	sitio de clonación múltiple
<b>Medio LB</b>	medio Luria-Bertani
<b>Nal</b>	ácido nalidíxico
<b>pb</b>	pares de bases
<b>p/v</b>	peso/volumen
<b>Rif</b>	rifampicina
<b>RNasa</b>	ribonucleasa
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico
<b>Sm</b>	estreptomicina
<b>Tc</b>	tetraciclina
<b>Tel</b>	telurito potásico
<b>Tris</b>	tris(hidroximetil)aminometano
<b>U</b>	unidades enzimáticas
<b>v/v</b>	volumen/volumen
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equilibrio de los distintos estados de ionización de la prolina en función del pH del medio.	6
Figura 2. Disposición espacial de los grupos en las dos formas enantioméricas de la prolina.	7
Figura 3. Ruta biosintética de la prolina en bacterias y plantas.	9
Figura 4A). Conformación <i>trans</i> y <i>cis</i> de los C $\alpha$ en un enlace peptídico.	11
Figura 4B). Conformación <i>trans</i> y <i>cis</i> de los C $\alpha$ en un enlace peptídico en el que entra a formar parte la prolina.	12
Figura 5. Representación de un giro $\beta$ en el que participa un residuo de prolina y de glicina.	13
Figura 6. Ruta catabólica de la prolina hasta glutamato.	20
Figura 7. Organización genética y regulación del operón del catabolismo de la prolina en enterobacterias.	22
Figura 8. Organización genética del operón del catabolismo de la prolina en <i>R. capsulatus</i> .	26
Figura 9. Organización genética y regulación del operón del catabolismo de la prolina en <i>A. tumefaciens</i> y <i>B. japonicum</i> .	27
Figura 10. Organización genética y regulación del operón del catabolismo de la prolina en <i>S. meliloti</i> .	28
Figura 11. Funcionamiento de un sistema de contención biológica dependiente de prolina.	30
Figura 12. Plásmido pUC18.	43
Figura 13. Cósmido pLAFR3.	43
Figura 14. Plásmidos de la serie pUT.	46
Figura 15. Plásmido pPC6.	48
Figura 16. Plásmido pMCC31.	48
Figura 17. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 en distintos medios con prolina.	74

<b>Figura 18.</b> Localización de los genes <i>put</i> de <i>P. putida</i> en el cósmido pCRR831 mediante hibridación con una sonda de <i>S. typhimurium</i> .	75-76
<b>Figura 19.</b> Esquema del plásmido pLCR12.	77
<b>Figura 20.</b> Esquema del plásmido pCRL4.	77
<b>Figura 21.</b> Secuencia del operón del catabolismo de la prolina de <i>P. putida</i> KT2440.	78-81
<b>Figura 22.</b> Localización de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> en pCRR831 dentro de un fragmento <i>HindIII</i> .	83
<b>Figura 23.</b> Mapa del plásmido pSLH4.	84
<b>Figura 24.</b> Alineamiento múltiple de proteínas Prolina deshidrogenasa/pirrolidina 5'carboxitato deshidrogenasa de distintos organismos.	88-90
<b>Figura 25.</b> Alineamiento múltiple de proteínas prolina permeasa de distintos organismos.	91-92
<b>Figura 26.</b> Perfil de hidropatía de la proteína PutP de <i>P. putida</i> KT2440.	93
<b>Figura 27.</b> Predicción de la estructura secundaria de la proteína PutP.	94
<b>Figura 28.</b> Crecimiento y actividad $\beta$ -galactosidasa de cepas de <i>P. putida</i> con los plásmidos pMIS5 y pMIS12.	97-98
<b>Figura 29.</b> Expresión de los promotores <i>PputA</i> y <i>PputP</i> con distintas concentraciones de prolina.	99
<b>Figura 30.</b> Papel inductor del glutamato sobre el operón del catabolismo de la prolina.	100
<b>Figura 31.</b> Determinación de los puntos de inicio de la transcripción de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> de <i>P. putida</i> KT2440 y estudio de la inducción en medios con prolina.	102
<b>Figura 32.</b> Representación de los inicios de transcripción y regiones promotoras de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> de <i>P. putida</i> KT2440.	103

---

Figura 33. Expresión de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> en distintos medios tras inducción con prolina.	104
Figura 34. Expresión de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> en medios con distinta concentración de prolina.	106
Figura 35. Análisis de la influencia del factor $\sigma^{38}$ en la transcripción de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> de <i>P. putida</i> .	107
Figura 36. Análisis de la influencia del factor $\sigma^{54}$ y las proteínas IHF y PtsN en la transcripción de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> de <i>P. putida</i> .	108
Figura 37. Estructura de la prolina y su análogo tóxico la 3,4-dehidroprolina.	112
Figura 38. Crecimiento de distintas cepas de <i>P. putida</i> en medio M9 con 20 mM de glucosa y en medio M8 con 20 mM de prolina.	115-116
Figura 39. Crecimiento de distintas cepas de <i>P. putida</i> en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato y M9 con 20 mM de glutamato.	116
Figura 40. Crecimiento de distintas cepas de <i>P. putida</i> en medio mínimo M8 con 20 mM de prolina.	118
Figura 41. Actividad prolina deshidrogenasa en células de <i>P. putida</i> KT2440.	120
Figura 42. Expresión de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> en los mutantes de <i>P. putida</i> deficientes en el catabolismo de la prolina.	122
Figura 43. Hibridación de ADN cromosómico de cepas de <i>P. putida</i> usando como sonda el gen <i>putA</i> de <i>P. putida</i> .	124
Figura 44. Hibridación de ADN cromosómico de cepas de <i>P. putida</i> usando como sonda el mini-Tn5KmluxAB.	125
Figura 45. Hibridación de ADN cromosómico de cepas de <i>P. putida</i> usando como sonda el gen <i>putP</i> de <i>P. putida</i> .	125

---

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.	39
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.	42
Tabla 3. Cebadores usados para la secuenciación de fragmentos de ADN.	56
Tabla 4. Direcciones de Internet de los programas usados en esta tesis.	57
Tabla 5. Cebadores usados para la amplificación de fragmentos de ADN.	58
Tabla 6. Oligonucleótidos usados para la extensión reversa a partir de cebador.	61
Tabla 7. Identidad de la proteína PutA de <i>P. putida</i> con la de otros organismos.	85
Tabla 8. Identidad de la proteína PutP de <i>P. putida</i> con la de otros organismos.	85
Tabla 9. Cuantificación de la expresión de los genes <i>putA</i> y <i>putP</i> en medios M9 con prolina y una fuente de carbono adicional.	105
Tabla 10. Actividad prolina deshidrogenasa de distintas cepas de <i>P. putida</i> KT2440 cultivadas en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato y 20 mM de prolina.	121
Tabla 11. Proteínas similares a la codificada por la secuencia de ADN flanqueante al miniTn5 en el mutante S14D11.	129
Tabla 12. Proteínas similares a la codificada por el ADN flanqueante al miniTn5 en el mutante S16D2.	130



## INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias del suelo pertenecientes al género *Pseudomonas* se caracterizan por su elevada versatilidad metabólica y una serie de características que las hacen atractivas para numerosas aplicaciones medioambientales y usos agrícolas (Ramos *et al.*, 1994). Estos microorganismos colonizan la superficie de la raíz de plantas (Molina *et al.*, 2000; Rodríguez-Herva *et al.*, 1999) y el suelo que rodea a la raíz, nicho ecológico conocido como rizosfera, en una asociación mutualista en la cual las bacterias obtienen nutrientes fácilmente utilizables de los exudados de las raíces de plantas (Lynch *et al.*, 1990a). En algunos casos estas asociaciones pueden promover el crecimiento de plantas e incluso ejercer un control contra ciertos patógenos (Lugtenberg *et al.*, 1999). Dentro del género *Pseudomonas* también se han descrito microorganismos que son patógenos oportunistas de animales como por ejemplo *P. aeruginosa*, así como patógenos de plantas como cepas de la especie *P. syringae* (Galli *et al.*, 1992). Muchas de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* capaces de degradar una amplia gama de compuestos naturales y xenobioticos, alguno de los cuales son tóxicos para la mayoría de los seres vivos y contaminante del medio ambiente.

La cepa *Pseudomonas putida* KT2440, objeto de nuestro estudio, deriva de la cepa *P. putida* mt-2, una cepa aislada del suelo por su capacidad para utilizar 3-metilbenzoato como fuente de carbono (Nakazawa *et al.*, 1973) debido a la presencia del llamado plásmido TOL pWW0 (Worsey *et al.*, 1975). *P. putida* KT2440 es un derivado de la cepa mt-2 curado del plásmido pWW0 y deficiente en el mecanismo de restricción de ADN exógeno (Franklin *et al.*, 1981), lo que hace que esta cepa sea ampliamente utilizada para la expansión de rutas catabólicas con fines degradativos (Ramos *et al.*, 1994) y como hospedador en la clonación y expresión de genes heterólogos para su utilización en procesos de biotransformación de compuestos químicos con valor añadido (Delgado *et al.*, 1992; Kraak *et al.*, 1997; Kellerhals *et al.*, 1999) o de interés farmacológico (Tan *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1997).

*P. putida* KT2440 puede colonizar la rizosfera de plantas a alta densidad celular lo que hace que esta cepa sea un candidato adecuado para la rizorremediación (Molina

*et al.*, 2000), esto es, la degradación de compuestos de naturaleza tóxica mediante el uso de microorganismos asociados a las raíces de plantas, o para el empleo del control biológico mediante de la expresión de proteínas con actividad insecticida. Numerosos son los trabajos de investigación que proponen la combinación del potencial metabólico de ciertas bacterias bien sean naturales o construidas mediante ingeniería genética, y el efecto beneficioso de la rizosfera de la planta en el crecimiento de las bacterias (Kloepper *et al.*, 1980), lo que conlleva en muchas ocasiones la liberación de microorganismos manipulados genéticamente (OMGs).

La liberación de OMGs al medio ambiente ha generado serias preocupaciones tanto en la opinión pública general, como en la comunidad científica, debido a los escasos conocimientos que se poseen sobre el comportamiento de los mismos en hábitats naturales y a la incapacidad de predecir su comportamiento en distintos ecosistemas (Ramos *et al.*, 1995; Tiedje *et al.*, 1989). En nuestro grupo de investigación se han desarrollado sistemas activos de contención biológica que controlan la supervivencia de los OMGs en situaciones muy concretas (Contreras *et al.*, 1991; Ronchel *et al.*, 1995). Estos sistemas se basan en el control de una función letal para la célula, como puede ser una proteína con función de porina o una nucleasa, por medio de un elemento sensor que reconoce señales físicas o químicas existentes en el medio ambiente, en este caso concreto la presencia/ausencia de un alquilbenzoato (Molin *et al.*, 1993).

La construcción de una cepa portadora de un sistema de contención cuya supervivencia respondiera a señales procedentes de las raíces de plantas sería de gran utilidad en procesos de rizadorremediación o en procesos de control biológico de forma que evitaría la dispersión del organismo más allá de la acción de la raíz de la planta y se aseguraría la eliminación del OMG cuando la planta muriese. De este planteamiento surgió la idea de la construcción de una cepa de *P. putida* capaz de sobrevivir en las inmediaciones de las raíces de una planta modelo como es *Zea mais* e incapaz de vivir en ausencia de la misma.

Al suelo que se encuentra bajo la influencia de la raíz se conoce con el nombre de rizosfera (Vancura *et al.*, 1988). La rizosfera es un medio dinámico en cuanto a

composición que difiere del resto del suelo tanto en propiedades químicas como físicas (Bowen *et al.*, 2000). Su tamaño depende de la difusión de los compuestos liberados de la raíz, de las características de difusión del suelo y del estado hídrico del mismo, entre otros parámetros y suele extenderse sólo unos pocos milímetros de la superficie de la raíz de la planta (Bowen *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1996). La naturaleza de los compuestos orgánicos liberados desde las raíces de las plantas hacia el suelo ha sido objeto de estudio por muchos autores (Rovira *et al.*, 1969; 1971; 1973; Lynch *et al.*, 1990a; 1990b) distinguiéndose varios orígenes del material orgánico que rodea a las raíces, a saber: 1.) Exudados. Se conoce como exudados a compuestos de bajo peso molecular que difunden a través de los espacios intercelulares y las zonas de unión entre las células intactas de la epidermis de las raíces. La colonización de los microorganismos tiende a producirse preferencialmente a lo largo de estas uniones debido a la acumulación de compuestos orgánicos en estas zonas (Foster *et al.*, 1983; Bowen *et al.*, 1979); 2.) Secreciones. Se trata de compuestos de bajo y alto peso molecular que son liberados como resultado de los procesos metabólicos de las células de la raíz de la planta. En la práctica es muy difícil de diferenciar entre secreciones y exudados y 3.) Lisados. Se trata del conjunto de compuestos liberados a partir de células viejas o muertas de las raíces.

En algunas especies de plantas la pérdida de carbono fijado mediante cualquiera de las formas anteriormente citadas representan más del 25% del carbono fijado por la planta (Whipps 1990). La composición de la materia orgánica procedente de la planta es muy compleja. En la revisión que hacen Curl y colaboradores (1986) sobre los compuestos encontrados en las inmediaciones de las raíces se describe la existencia de azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos y esteroides, factores de crecimiento, nucleótidos, flavonas y enzimas. La naturaleza de estos compuestos y su cantidad varía de unas plantas a otras, e incluso dentro de una misma planta puede variar dependiendo de las condiciones medioambientales en las que se encuentre y del estado de crecimiento de la misma (Schawab *et al.*, 1983).

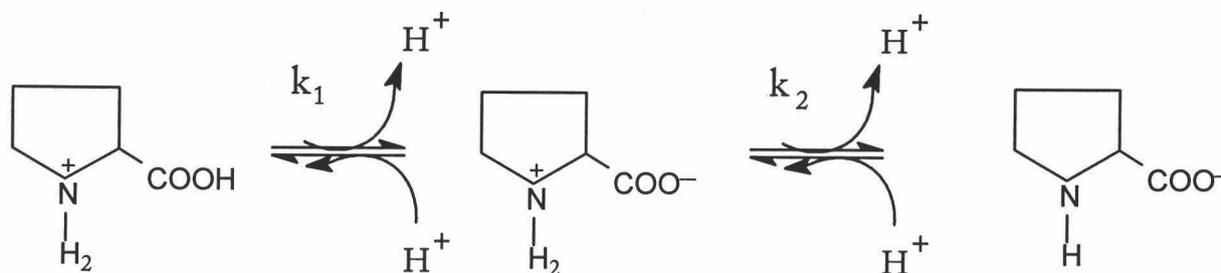
Los aminoácidos constituyen una fracción importante de los compuestos de bajo peso molecular liberados por las raíces llegando a significar el 60-85% del total en la especie *Brassica napus* (Sundin *et al.*, 1990; Svenningsson *et al.*, 1990). Representan la

mayor entrada de carbono y nitrógeno orgánico soluble en la rizosfera por lo que puede decirse que son los principales responsables de la inducción de la quimiostásis de la microbiota del suelo a la raíz (Misaghi, 1982). De entre todos ellos, la prolina se encuentra de forma abundante en la rizosfera (Vancura, 1969, 1988) y junto a la histidina es uno de los pocos aminoácidos utilizados eficientemente como fuente de carbono y de nitrógeno por *P. putida* KT2440 (Ramos C. datos no publicados). Por estas razones la prolina fue la señal química procedente de la raíz elegida para la construcción del sistema de contención biológica en *P. putida*.

En la introducción de esta Tesis Doctoral se hace una breve revisión de las propiedades de este compuesto, de su papel en la naturaleza, al mismo tiempo que se hace un diseño teórico del sistema activo de contención biológica dependiente de exudados de raíz.

### 1. Propiedades fisicoquímicas de la prolina.

La prolina o ácido 2-pirrolidincarboxílico es un sólido cristalino incoloro con un alto punto de fusión en torno a los 220-222°C que presenta dos grupos polares que le confieren una alta solubilidad en agua (162 g/100 mL a 25°C). Se considera un compuesto anfótero ya que su molécula presenta una función ácida (grupo carboxilo) y una función básica (grupo imino) las cuales poseen distinto grado de ionización dependiendo del pH del medio (**Figura 1**).

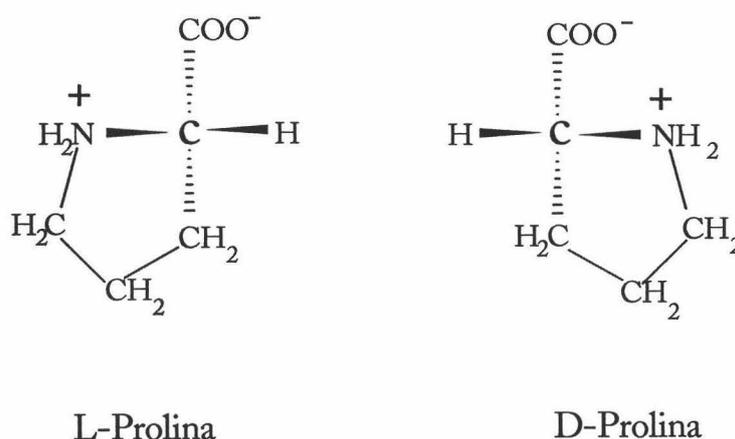


**Figura 1.** Equilibrio de los distintos estados de ionización de la prolina en función del pH del medio.

Los valores de los pKa de las constantes de los equilibrios anteriormente mostrados son de 1,95 para el grupo ácido y 10,64 para el grupo básico. Cuando la

prolina se encuentra en solución acuosa a pH en torno a 7 la forma predominante es la forma en la que los dos grupos se encuentran ionizados, por lo que la prolina se puede considerar como un ion dipolar o zwitterión a este pH.

El carbono situado en posición  $\alpha$  con respecto al grupo carbonilo se encuentra unido a cuatro grupos funcionales distintos por lo que es un átomo quiral lo que hace que existan dos formas enantioméricas de la prolina, la L-prolina y la D-prolina aunque sólo la forma L se encuentra en la naturaleza (**Figura 2**).



**Figura 2.** Disposición espacial de los grupos en las dos formas enantioméricas de la prolina.

## 2. La biosíntesis de la prolina.

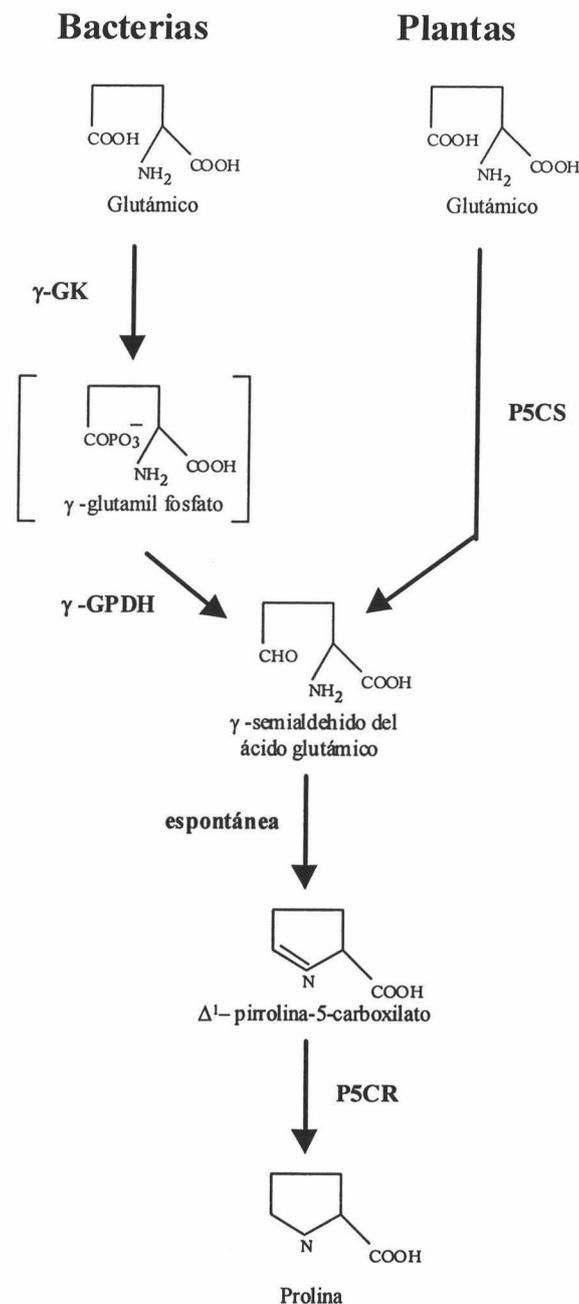
La prolina se enmarca desde el punto de vista biosintético dentro de la llamada familia del glutamato. Todos los aminoácidos pertenecientes a este grupo obtienen sus esqueletos carbonados a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato producido en el ciclo de Krebs. La biosíntesis de la prolina a partir de glutamato en *Escherichia coli* transcurre a través de cuatro etapas (Leisinger 1987) (**Figura 3**):

1. En la primera etapa de la biosíntesis de prolina la enzima  $\gamma$ -glutamil kinasa ( $\gamma$ -GK) cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP al grupo  $\gamma$ -carboxilato del glutamato generando el  $\gamma$ -glutamilfosfato.
2. El grupo fosfato del  $\gamma$ -glutamilfosfato se reemplaza por un anión hidruro en una etapa reductora catalizada por la  $\gamma$ -glutamilfosfato deshidrogenasa o reductasa ( $\gamma$ -GPDH) dependiente de NADPH generándose el  $\gamma$ -semialdehído del ácido glutámico.
3. El  $\gamma$ -semialdehído del ácido glutámico se cicla de forma no enzimática perdiendo una molécula de agua para formar la  $\Delta^1$ -pirrolina-5'-carboxilato.
4. La  $\Delta^1$ -pirrolina-5'-carboxilato reductasa (P5CR) dependiente de NADPH reduce la  $\Delta^1$ -pirrolina-5'-carboxilato hasta prolina.

El intermediario  $\gamma$ -glutamilfosfato producto de la acción de la  $\gamma$ -GK y sustrato la enzima GPDH no ha sido nunca aislado, probablemente debido a su alta inestabilidad por lo que se propone que en *E. coli* las dos enzimas forman un complejo enzimático convirtiendo el glutamato en su semialdehído por la acción conjunta de las dos enzimas (Baich, 1971; Gramper *et al.*, 1974; Hayzer *et al.*, 1978).

La enzima  $\gamma$ -GK está codificada por el gen *proB*, la  $\gamma$ -GPDH está codificada por el gen *proA* y la P5CR está codificada por el gen *proC* (Hayzer *et al.*, 1980). Los genes *proA* y *proB* se encuentran adyacentes en el genoma de *E. coli* en el minuto 5,6 del cromosoma, mientras que el gen *proC* se encuentra separado de *proA* y *proB* localizándose en el minuto 8,7 (Banchmann *et al.*, 1976). Los genes *proB* y *proA* forman un operón cuya dirección de la transcripción se produce desde el gen *proB* al *proA* (Deutch *et al.*, 1984). Aunque la ruta biosintética de la prolina es una de las más simples si se compara con las rutas biosintéticas del resto de los aminoácidos su regulación está muy poco estudiada. A nivel enzimático el único mecanismo de regulación que se conoce es que la primera enzima de la ruta, la  $\gamma$ -GK, la cual está sujeta a retroinhibición por prolina (Mahan *et al.*, 1983; Massarelli *et al.*, 2000). En

cuanto al control transcripcional no se conoce mucho y parece ser que los genes *proBA* y *proC* se expresan constitutivamente e independientemente de la cantidad de prolina que exista en el medio (Condamine *et al.*, 1971; Hayzer *et al.*, 1980; Brandy *et al.*, 1988).



**Figura 3. Ruta biosintética de la prolina en bacterias y plantas.** Se indican las enzimas que participan en la ruta biosintética donde  $\gamma$ -GK es la  $\gamma$ -glutamil kinasa,  $\gamma$ -GPDH es la  $\gamma$ -glutamilfosfato deshidrogenasa, P5CS es la  $\Delta^1$ -pirrolina-5'-carboxilato reductasa y P5CR la  $\Delta^1$ -pirrolina-5'-carboxilato sintetasa.

En *Pseudomonas aeruginosa* se han purificado las enzimas  $\gamma$ -GK (Krishna *et al.*, 1979a) y  $\gamma$ -GPDH (Krishna *et al.*, 1979b) por lo que la ruta biosintética de la prolina en *Pseudomonas* parece ser similar a la de *E. coli* al igual que ocurre en otros microorganismos (Datta *et al.*, 1987; Fons *et al.*, 1987; Baumberg *et al.*, 1993; Limauro *et al.*, 1996).

En plantas la biosíntesis de prolina se produce también a partir del glutamato gracias a la  $\Delta^1$ - pirrolina-5'-carboxilato sintetasa (P5CS), la cual transforma el glutamato en  $\gamma$ -semialdehído del ácido glutámico en un único paso enzimático (**Figura 3**). Mediante ensayos de complementación de esta enzima en mutantes de *E. coli* se ha comprobado que la P5CS posee las actividades  $\gamma$ -GK y  $\gamma$ -GPDH (Hu *et al.*, 1992). La P5CS también está sujeta a retroinhibición por prolina aunque la  $\gamma$ -GK de *E. coli* es 30 veces más sensible a la inhibición por producto (Hu *et al.*, 1992).

### **3. Funciones fisiológicas de la prolina.**

En la bibliografía se pueden encontrar tres funciones esenciales de la prolina en organismos. Por un lado es uno de los 20 aminoácidos que forman parte de la estructura primaria de las proteínas por lo que representa uno de los pilares estructurales de la vida. En segundo lugar la prolina, gracias a sus propiedades fisico-químicas, desempeña un papel esencial en el mecanismo de adaptación que los organismos han desarrollado frente a condiciones adversas para la vida como es el estrés osmótico. En tercer lugar, debido a su composición química, la prolina es frecuentemente utilizada por numerosos organismos como fuente de carbono, nitrógeno y energía. En este apartado se pretende hacer una breve descripción de la importancia de este aminoácido para los seres vivos.

#### **3.1. Papel estructural de la prolina.**

Aunque la prolina forma parte de las proteínas su estructura química difiere radicalmente de la de los demás aminoácidos debido a que su cadena lateral está unida covalentemente al nitrógeno que forma parte del enlace peptídico en las proteínas. Debido a este enlace con el nitrógeno, la prolina es químicamente un iminoácido (-N-) y

no un aminoácido ( $-\text{NH}_2$ ). La unión de la cadena lateral al nitrógeno impide que esta posición exista el hidrógeno amídico el cual juega un papel esencial en el establecimiento de puentes de H para la formación de estructuras secundarias en las proteínas. Aunque la prolina no es reactiva químicamente, su cadena lateral de cinco eslabones, un anillo de pirrolidina, restringe la simetría del esqueleto de la cadena de proteína que la contiene, dando lugar a cambios bruscos en la dirección de la cadena polipeptídica.

El enlace peptídico presente en las proteínas posee un carácter parcial de doble enlace lo que hace que esté impedida la libre rotación del enlace C-N. Una consecuencia de esta rigidez es que los seis átomos que participan en el enlace peptídico ( $\text{C}\alpha_1$ , C, O, N, H y  $\text{C}\alpha_2$ ) están obligados a permanecer en el mismo plano existiendo dos posibles configuraciones del enlace peptídico, la configuración *cis* y la *trans* (Figura 4A). En las configuraciones *cis* los átomos de  $\text{C}\alpha$  se encuentran más próximos entre sí por lo que los impedimentos estéricos de las cadenas laterales son mayores que en la conformación *trans* haciendo que la conformación *cis* sea menos favorable y por tanto más frecuente que la *trans*. Sin embargo debido a su estructura la prolina presenta una alta probabilidad de adoptar la conformación *cis* dentro del enlace peptídico si se compara con el resto de los aminoácidos ya que los impedimentos estéricos son menores (Ramachandran *et al.*, 1976) (Figura 4B).

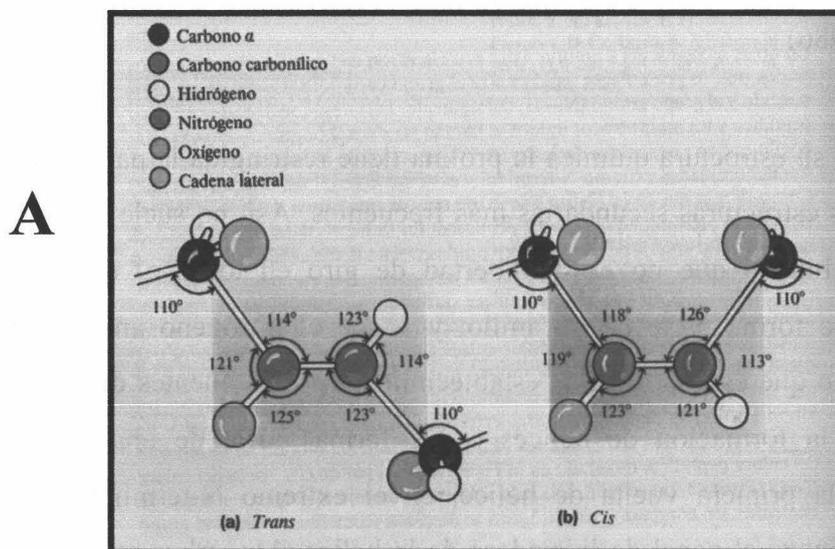
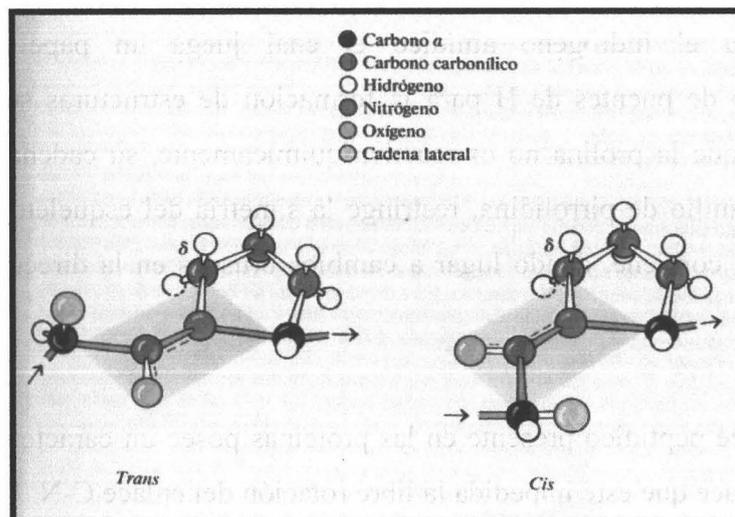


Figura 4 A) Conformación *trans* y *cis* de los  $\text{C}\alpha$  en un enlace peptídico.

B

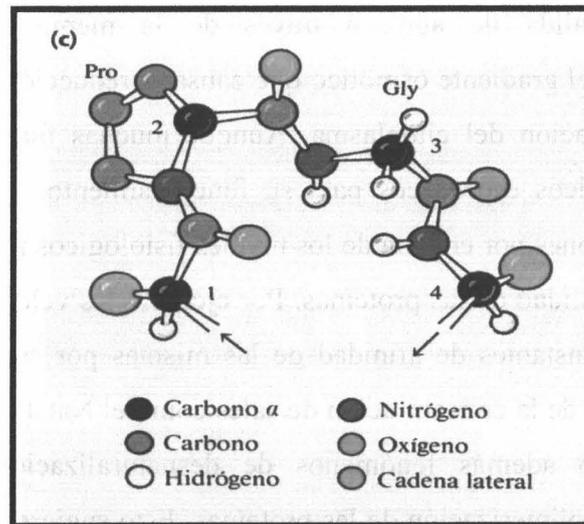


**Figura 4B) Conformación *trans* y *cis* de los C $\alpha$  en un enlace peptídico en el que entra a formar parte la prolina.** (Figuras adaptadas de Bioquímica volumen I, Rawn. 1989).

La energía de isomerización *cis-trans* de la prolina es muy inferior a la del resto de los aminoácidos lo que hace que sea posible encontrar un residuo de prolina con un equilibrio entre las dos conformaciones. Se ha sugerido que la isomerización *cis-trans* de la prolina está activamente involucrada en la función de algunas proteínas de membrana como son las bombas de sodio ya que se ha observado que dicha isomerización está acoplada a la translocación del ion Na<sup>+</sup> a través de la membrana. (Brandl *et al.*, 1986)

Debido a su estructura química la prolina tiene restringida la participación en la formación de las estructuras secundarias más frecuentes. Así, no suele formar parte de las hélices  $\alpha$  debido a que no existe libertad de giro en torno al enlace carbononitrógeno ya que forma parte de un anillo, y a que el nitrógeno amídico no posee hidrógenos por lo que es imposible el establecimiento de los puentes de hidrógeno tan esenciales para la formación de hélices  $\alpha$ . De formar parte de una hélice  $\alpha$  suele encontrarse en la primera vuelta de hélice, en el extremo N-terminal, en segunda posición donde juega el papel de iniciadora de la hélice (McArthur *et al.*, 1991). Este iminoácido se encuentra más frecuentemente formando parte de la llamada lámina  $\beta$  plegada o lámina  $\beta$  aunque tiende a distorsionar las láminas con aparición de

acodamientos. Donde sí juega un papel esencial debido a su estructura química es en los llamados giros  $\beta$  de las proteínas globulares (**Figura 5**) ya presenta una estructura idónea para producir un giro o cambio de dirección en la cadena peptídica.



**Figura 5. Representación de un giro  $\beta$  en el que participa un residuo de prolina y de glicina.** (Figura adaptada de Bioquímica volumen I, Rawn. 1989).

Cuando varios residuos de prolina se encuentran consecutivos o cercanos en la secuencia primaria de una proteína, la región de poliprolina adopta una conformación que se conoce con el nombre de hélice PP II. Este tipo de hélice posee tres residuos por vuelta a diferencia de los 3,6 que aparecen en una hélice  $\alpha$ . La hélice PP II es una estructura muy poco frecuente donde los residuos de prolina forman una franja hidrofóbica alrededor de la superficie de la hélice mientras que los carbonos carbonílicos presentan una franja rica en electrones ideal para la formación de puentes de hidrogeno. Por tanto, las hélices PP II presentan una accesibilidad elevada a superficies hidrofóbicas y a sitios donde pueden formarse puentes de hidrógeno. La relativa alta rigidez de las hélices PP II produce una pérdida de entropía conformacional en estas estructuras lo que hace que sean más favorables las interacciones y uniones de estas estructuras que de otras. Por esta razón se ha propuesto que estas estructuras ricas en prolina juegan un papel muy importante en las interacciones proteína-proteína tanto en procariontas como en eucariotas (Kay *et al.*, 2000).

### 3.2. Papel osmoprotector de la prolina.

La exposición de los organismos a ambientes con alta osmolaridad (medios con alta concentración de solutos, principalmente sales, o medios con bajo nivel hídrico) produce una rápida salida de agua a través de la membrana semipermeable citoplasmática a favor del gradiente osmótico que causa la reducción de la turgencia de la célula y la deshidratación del citoplasma. Aunque muchas funciones bioquímicas requieren iones inorgánicos específicos para su funcionamiento, el incremento de la concentración de estos iones por encima de los niveles fisiológicos produce una drástica alteración de la funcionalidad de las proteínas. Por ejemplo las velocidades de reacción de las enzimas y las constantes de afinidad de las mismas por sus substratos se ven alteradas por el aumento de la concentración de sales como el NaCl y el KCl (Yancey *et al.*, 1982) apareciendo además fenómenos de desnaturalización, de agregación-disgregación o incluso polimerización de las proteínas. Esto sugiere que un aumento de la concentración de sales en el interior celular durante el tiempo que dure el estrés osmótico podría repercutir seriamente en las funciones metabólicas del organismo además del mantenimiento de los potenciales de membrana óptimos para el buen funcionamiento celular.

Los microorganismos responden activamente a las variaciones de osmolaridad de su hábitat (Galinski *et al.*, 1994; Csonka *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1996) en un proceso que se conoce como osmorregulación u osmoadaptación y cuyo objetivo es mantener la turgencia y el volumen de la célula dentro de unos niveles aceptables para la fisiología celular y proteger al organismo de los efectos letales de la deshidratación. (Record *et al.*, 1998a,b). Los organismos vivos no poseen mecanismos de transporte activo de agua por lo que la turgencia de las células en condiciones de estrés osmótico se mantiene mediante el acúmulo de determinadas sustancias las cuales se les conoce con el nombre de agentes osmoprotectores.

Se han identificado dos estrategias básicas de adaptación de los microorganismos a medios con alta osmolaridad. Una de ellas consiste en la acumulación de altas concentraciones de iones en el interior celular, estrategia que es seguida por arqueobacterias halófilas y bacterias halotolerantes; mientras que la otra

estrategia, seguida además por multitud de organismos, es la acumulación de determinados compuestos de bajo peso molecular en el citoplasma de las células.

Las halobacterias son el ejemplo más llamativo de organismo sometido a estrés osmótico. Estos organismos están adaptados a vivir en ambientes donde las concentraciones de sales alcanzan los niveles de saturación. El mecanismo que estos microorganismos han adoptado para vivir en ambientes tan inhóspitos para la vida es la acumulación de iones  $K^+$  en el interior celular. A modo de ejemplo podríamos citar que se han identificado en algunas especies de *Halobacterium* concentraciones 7 molar de ion  $K^+$  en el interior de su citoplasma (Lanyi, 1974). Para soportar esta alta concentración de iones las proteínas de las halobacterias han experimentado a lo largo de la evolución una sustitución masiva de los aminoácidos que forman parte de sus proteínas enriqueciéndolas en residuos de aspartato y glutámico y residuos de débil carácter hidrofóbico. (Lanyi 1974). Estas sustituciones posibilitan a las proteínas halófilas a tener conformaciones y funciones apropiadas en medios con alta concentración de iones. Por este motivo las halobacterias están confinadas solamente a aquellos ambientes en los que siempre existe una salinidad elevada.

Pero la mayoría de los organismos viven en hábitats donde las condiciones de humedad y salinidad no son tan extremas por lo que se han desarrollado mecanismos de adaptación al estrés osmótico menos drásticos que el mecanismo adoptado por las halobacterias que proporcionan protección sólo cuando las condiciones lo requieran. El acúmulo de los llamados solutos compatibles en el interior celular es el mecanismo de adaptación que la mayoría de los organismos han adoptado en respuesta al estrés osmótico. La acumulación de estos compuestos evita la modificación de miles de proteínas para evitar la fluctuación de concentraciones salinas en el interior celular, necesitándose únicamente la regulación de unos pocos genes implicados en la síntesis o degradación de los solutos compatibles. El término de soluto compatible fue introducido por Brown y colaboradores para designar a todos aquellos compuestos que son acumulados en los organismos en respuesta a un aumento del estrés osmótico (Brown *et al.*, 1972; Brown *et al.*, 1976). La característica principal de estos compuestos es que la acumulación en el interior celular es inocua para la función de las proteínas. La mayoría de los solutos compatibles son compuestos de bajo peso molecular entre los que se

encuentran compuestos con alto número de grupos alcohol como el glicerol, la sacarosa y la trehalosa, aminoácidos libres y sus derivados como la taurina y la  $\beta$ -alanina y las metilaminas como la betaína y sarcosina. Lo más curioso es que son relativamente pocos los compuestos que poseen estas propiedades por lo que se encuentran en multitud de organismos muy distanciados filogenéticamente.

Dentro de los solutos compatibles los aminoácidos y sus derivados son los predominantes en multitud de organismos como las bacterias tolerantes a sales, plantas halófitas e invertebrados marinos. Dentro de los aminoácidos y sus derivados la glicina, alanina, prolina, taurina y  $\beta$ -alanina son los más importantes. No todos los aminoácidos tienen este papel osmoprotector. Como ejemplo cabría citar que la  $K_m$  para el fosfoenolpiruvato de la piruvato kinasa de *Pachygrapsus crassipes* no se ve afectada bajo concentraciones 1M de prolina en el medio mientras que es fuertemente perturbada por la presencia en el medio de arginina o lisina (Clark *et al.*, 1968). Este hecho viene dado porque la prolina se presenta a pH fisiológico como un zwitterión mientras que la arginina presenta una carga positiva en su molécula. El que un aminoácido sea o no un soluto compatible depende por tanto de su naturaleza química y propiedades físicas.

La explicación más simple para el funcionamiento de un osmoprotector es que la acumulación de ellos en el citoplasma permite aumentar la fuerza osmótica del interior celular para igualar la del medio circundante y evitar así la pérdida de agua. Pero muchos autores sugieren que los compuestos osmoprotectores influyen directamente sobre la estructura proteica de forma que sean funcionales en condiciones de estrés. Durante el estrés osmótico las proteínas aparecen literalmente “bañadas” en los solutos compatibles acumulados pudiendo alcanzar concentraciones por encima de 1M. La protección que los solutos compatibles proporcionan al mantenimiento de la estructura proteica creando un “microambiente” protector alrededor de la proteína es lo que hace que las proteínas puedan seguir desempeñando su función en condiciones de estrés (Yancey *et al.*, 1982).

El papel osmoprotector de la prolina fue demostrado por primera vez por Christian y colaboradores en *Salmonella oranienburg* (Christian 1955a, 1955b) y

posteriormente ha sido estudiado por numerosos autores en distintos organismos. Eubacterias, protozoos, invertebrados marinos y muchas plantas acumulan prolina como osmoprotector (McCue *et al.*, 1992; Delauney *et al.*, 1990) por lo que este compuesto se considera como uno de los solutos compatibles más ampliamente distribuidos. La acumulación de prolina en el interior celular es el resultado del establecimiento de tres mecanismos independientes o simultáneos bien caracterizados en bacterias y plantas. Un primer mecanismo consiste en la captación de prolina del exterior mediante un sistema de transporte, un segundo mecanismo es el aumento de la biosíntesis de prolina y un tercer mecanismo es la disminución de la degradación de la prolina en el interior celular. A continuación se detalla cada uno de ellos.

### **3.2.1. Transporte de prolina al interior celular en respuesta al estrés osmótico.**

La adición de prolina exógena al medio de cultivo en concentraciones del orden de micro a milimolar confiere un considerable grado de tolerancia osmótica permitiendo a organismos como *E. coli* o *S. typhimurium* crecer en medios hipertónicos con concentraciones de NaCl 1M.

El paso de la prolina a través de la membrana externa hasta el periplasma se produce en enterobacterias por difusión pasiva a través de las porinas no específicas OmpC y OmpF cuyos genes estructurales están regulados por la osmolaridad del medio de forma que la síntesis de OmpC predomina en medios hipertónicos mientras que la producción de OmpF predomina en medios hipotónicos (Pratt *et al.*, 1996).

Dos transportadores, ProP y ProU, son los responsables de la captación de prolina a través de la membrana interna de numerosas bacterias entéricas en situaciones de estrés osmótico. Inicialmente se identificaron como específicos de prolina pero estudios posteriores muestran que transportan al interior celular un amplio espectro de osmoprotectores con igual afinidad que la prolina entre los que se pueden destacar la trimetilglicina y la dimetilprolina (Csonka *et al.*, 1996). ProP es un transportador monocomponente acoplado al simporte de cationes en medios de alta osmolaridad. La activación de su funcionalidad se debe tanto al aumento de expresión del gen *proP*

como al aumento de la actividad de la proteína ProP la cual actúa como sensora de la osmolaridad del medio (Culham *et al.*, 1993). ProU es un miembro de la superfamilia de transportadores ABC. ProU es un complejo enzimático formado por una ATPasa asociada a la membrana (ProV), una proteína integral de membrana (ProW) y una proteína periplásmica de unión al sustrato (ProX). La prolina es transportada por este sistema con muy baja eficiencia pero un derivado de este aminoácido, la prolina betaína o dimetilprolina es transportada eficientemente a través de la membrana citoplasmática. Este segundo transportador también es inducible por estrés osmótico a nivel del aumento de expresión de los genes del operón *proVWX* gracias a una variación en la topología del ADN de la zona promotora.

### 3.2.2. Biosíntesis de prolina en respuesta a estrés osmótico.

Numerosos estudios han mostrado que el acúmulo de prolina mediante la activación de las rutas biosintéticas de la prolina proporciona un mecanismo importante de adaptación de los organismos a ambientes de elevado estrés osmótico (Mahan *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1985; Whatmore *et al.*, 1990). Así se ha descrito un mutante de *S. typhimurium* que superproduce prolina el cual presenta una tolerancia a estrés salino superior a la cepa silvestre (Csonka 1981). Los niveles basales de prolina en algunos organismos aumentan en condiciones de alta salinidad desde niveles basales del orden de 10-20 mM hasta concentraciones 1 M (Kempf *et al.*, 1998) como consecuencia de una activación de las rutas biosintéticas.

Se sabe que en enterobacterias la primera respuesta a una situación de estrés osmótico es la activación de sistemas de captación de iones  $K^+$  (Bosseemeyer *et al.*, 1989) con objeto de igualar la presión osmótica del interior celular con la del exterior. Como consecuencia del aumento de iones  $K^+$  se estimula la síntesis de glutamato como consecuencia de la contracción del  $K^+$  (Measures 1975). Como se mencionó anteriormente el glutamato es el precursor inmediato de la prolina por lo que el aumento de los niveles de glutamato provoca la biosíntesis de prolina (Csonka 1988). Mutantes que tienen una mutación en la  $\gamma$ -glutamil kinasa que hacen esta proteína menos sensible a la retroinhibición por prolina presentan una mejor adaptación al estrés osmótico lo que quiere decir que la

activación de la biosíntesis de prolina en bacterias debe estar regulada a este nivel (Smith 1985).

Las plantas también acumulan prolina mediante el aumento de la biosíntesis y lo hacen no sólo cuando crecen en condiciones de alta salinidad sino en condiciones de estrés hídrico (Yancey *et al.*, 1982; Csonka *et al.*, 1989; Delauney *et al.*, 1990). Como se comentó anteriormente, la ruta biosintética de prolina en plantas se diferencia de la de bacterias en que la transformación de glutámico a  $\gamma$ -semialdehído del ácido glutámico está catalizada por una única enzima, la  $\Delta^1$ -pirrolina-5'-carboxilato sintetasa (P5CS), que presenta las actividades  $\gamma$ -glutamil kinasa y  $\gamma$ -glutamilfosfato deshidrogenasa de enterobacterias. A diferencia de enterobacterias la acumulación de prolina en plantas durante el estrés osmótico está regulada a nivel transcripcional. Se ha observado que los niveles de ARNm del gen que codifica para la P5CS aumentan cuando la planta se encuentra bajo condiciones de estrés osmótico mientras que disminuyen cuando la planta vuelve a condiciones no estresantes (Yoshida *et al.*, 1997). Sin embargo la expresión del gen que codifica para la P5CR, la segunda enzima en la biosíntesis de prolina en plantas, no se modifica apreciablemente en condiciones de estrés (Yoshida *et al.*, 1995) lo que implica que la regulación de la ruta biosintética se produce a nivel del gen que codifica para la P5CS.

### **3.2.3. Represión de la ruta catabólica de la prolina en condiciones de estrés.**

Como se describirá más adelante la prolina es metabolizada hasta glutamato mediante la acción de dos actividades enzimáticas, la prolina deshidrogenasa y la pirrolina-5'-carboxilato deshidrogenasa. Existen numerosos estudios en los que se demuestra que en condiciones de estrés osmótico la ruta degradativa de la prolina queda inactivada con objeto de evitar la degradación de la prolina acumulada en la célula, evitándose así que la célula entre en un ciclo fútil de acumulación-degradación bajo condiciones de estrés (Stewart *et al.*, 1977; Chang *et al.*, 1998). En organismos como *S. typhimurium* la inhibición de la ruta catabólica se produce a nivel de la actividad de la enzima prolina deshidrogenasa (Ekena *et al.*, 1990). Por el contrario estudios recientes realizados en plantas muestran que la inhibición de la ruta catabólica de la prolina se produce a nivel transcripcional (Verbruggen *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1997) de forma

que la expresión del gen que codifica para la prolina deshidrogenasa de plantas experimenta un marcado descenso en su expresión tanto en condiciones de estrés provocado por el aumento de solutos en el medio (Verbruggen *et al.*, 1996) como por el estrés hídrico (Yoshida *et al.*, 1997). Cuando las condiciones de estrés cesan, la prolina acumulada en las plantas es catabolizada hasta glutamato gracias a la activación del gen que codifica para la prolina deshidrogenasa. Se ha sugerido que la oxidación de la prolina proporciona el poder reductor, la fuente de nitrógeno y la energía necesaria para la recuperación de las células tras las condiciones de estrés (Verbruggen *et al.*, 1996).

### 3.3. Papel de la prolina como fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Debido a su composición química, la prolina puede ser utilizada por las células como una fuente de carbono, nitrógeno y/o energía. Al igual que la ruta biosintética de la prolina, la ruta degradativa está bastante conservada en los organismos y fundamentalmente consiste en la oxidación de la prolina hasta su transformación en glutamato. Dicha transformación transcurre a través de la formación de la pirrolina 5' carboxilato, compuesto de naturaleza inestable (Melz *et al.*, 1976) que se encuentra en equilibrio con el semialdehído del ácido glutámico (Figura 6).

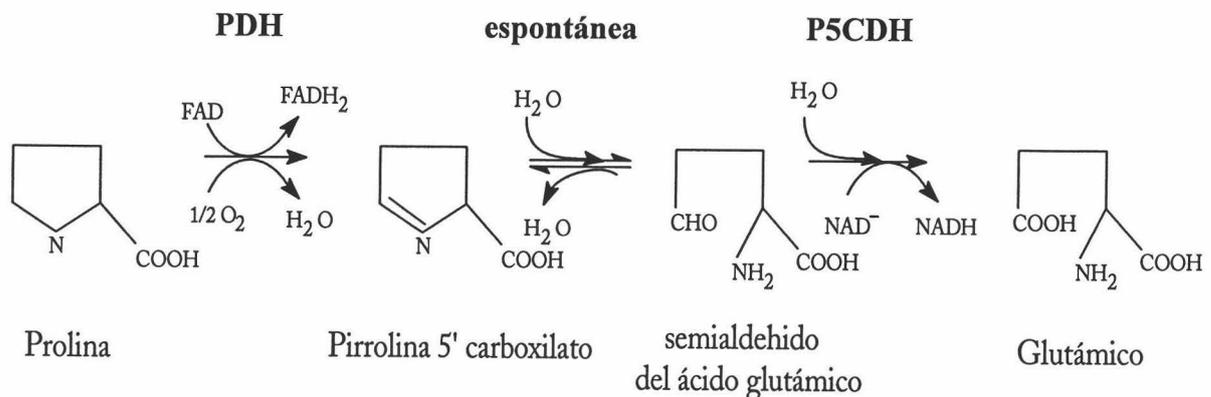


Figura 6. Ruta catabólica de la prolina hasta glutamato.

La primera reacción de la ruta catabólica está catalizada por la actividad enzimática prolina deshidrogenasa (PDH) la cual tiene como cofactor al FAD que se

encuentra fuertemente unido a la proteína (Menzel *et al* 1981b). La segunda reacción no es de naturaleza enzimática sino un equilibrio químico entre la pirrolina 5' carboxilato y el semialdéhido del ácido glutámico. La tercera reacción está catalizada por la actividad enzimática pirrolina 5' carboxilato deshidrogenasa (P5CDH) que es dependiente de NAD(P)<sup>+</sup> (Menzel *et al.*, 1981a; Brown *et al.*, 1992). Estudios recientes en *S. typhimurium* han demostrado que las dos actividades enzimáticas de la proteína PutA están perfectamente acopladas produciéndose una a continuación de la otra de forma que el intermediario P5C sintetizado pasa desde el centro activo de la PDH al centro activo de la P5CDH minimizando al máximo el riesgo de pérdida del intermediario inestable (Surber *et al.*, 1998).

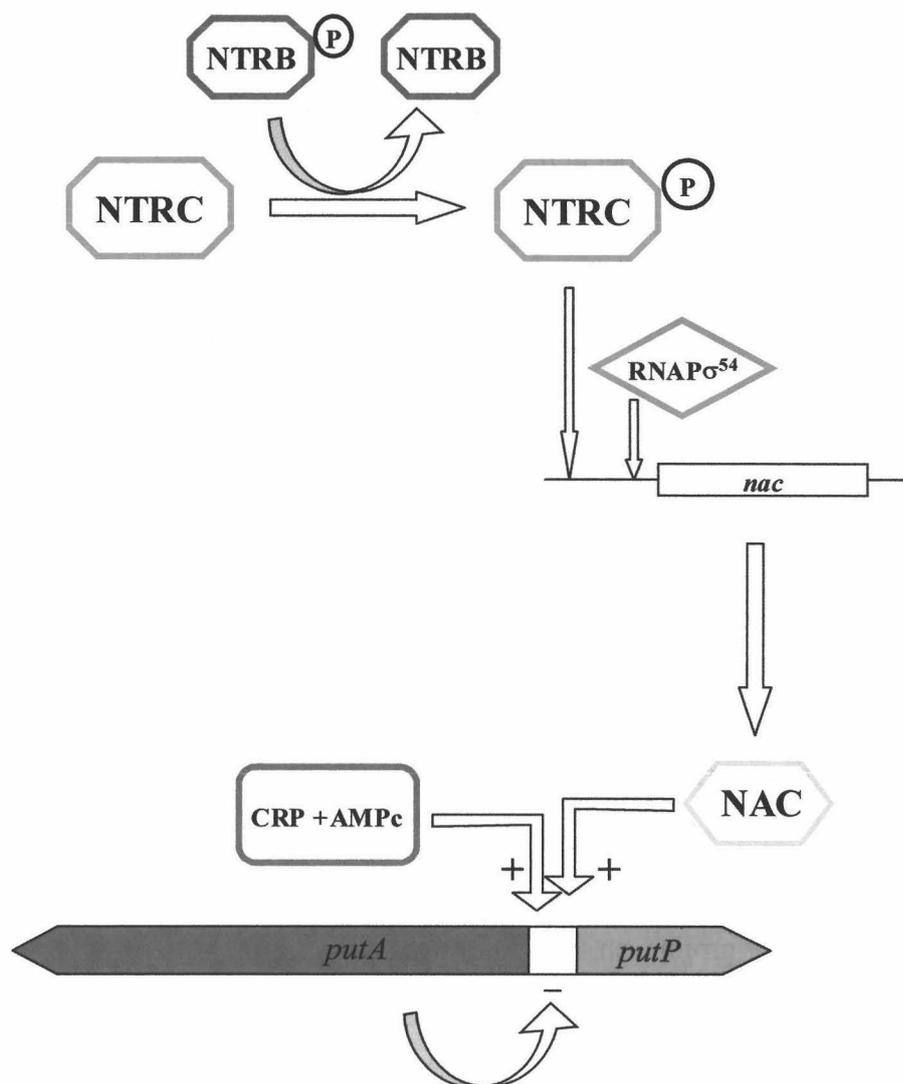
Las actividades enzimáticas anteriormente citadas responsables del catabolismo de la prolina son comunes a todos los organismos estudiados hasta el momento pero existe una diferencia fundamental entre eucariotas y procariotas y es que en eucariotas las actividades PDH y P5CDH están codificadas por dos genes distintos (Krywichi *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1987), mientras que en procariotas ambas actividades se encuentran codificados por el mismo gen (Maloy 1987; Menzel *et al.*, 1981a; Keuntje *et al.*, 1995; Straub *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1996; Jiménez-Zurdo *et al.*, 1997). Pese a que las actividades enzimáticas y la ruta catabólica están muy conservadas en los organismos la organización genética y la regulación de la expresión de los genes implicados es muy variada (Soto *et al.*, 2000).

Dado que uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es el estudio del catabolismo de la prolina en *Pseudomonas putida* se hará un breve repaso por la organización génica y regulación de la ruta catabólica de la prolina en aquellos microorganismos en los que se ha estudiado.

### **3.3.1. Estructura y regulación del operón del catabolismo de la prolina en enterobacterias.**

De todos los operones responsables del catabolismo de la prolina descritos en la bibliografía el de enterobacterias es el más estudiado. En *E. coli*, *S. typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae* el gen *putA* que codifica para la enzima bifuncional PutA que

posee las actividades PDH y P5CDH forma parte de un operón junto con el gen *putP* el cual codifica para una proteína de membrana interna cuya función es el transporte de prolina desde el espacio periplásmico al citoplasma (Motojima *et al.*, 1978; Mogi *et al.*, 1986). Los genes *putA* y *putP* se transcriben divergentemente a partir de la región de ADN situada entre ambos en donde se localizan las correspondientes regiones promotoras (Hahn *et al.*, 1986; Nakao *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1991) (Figura 7).



**Figura 7. Organización genética y regulación del operón del catabolismo de la prolina en enterobacterias.** Con el signo negativo se indica la represión que ejercen la proteína PutA en ausencia de prolina mientras que con signo positivo se indica la activación que producen la proteínas NAC y CRP en la expresión de *putA* y *putP* en presencia de prolina.

La expresión de los genes *putA* y *putP* está regulada por la presencia en el medio de prolina a través de la proteína PutA (Menzel *et al.*, 1981a; Ostrovsky *et al.*, 1991), la cual además de presentar las actividades catalíticas mencionadas anteriormente posee una función reguladora de la transcripción ya que es capaz de unirse a la región de ADN situada entre los genes *putA* y *putP* (Ostrovsky *et al.*, 1991; Ostrovsky *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993) evitando la expresión de los mismos al impedir el acceso de la ARN polimerasa a las regiones promotoras. La unión de la proteína PutA al ADN está condicionada por la presencia/ausencia de prolina en el medio de cultivo. Cuando no existe prolina en el medio la proteína PutA permanece unida a la región de ADN que existe entre los genes *putA* y *putP* evitando la expresión de los genes del catabolismo de la prolina cuando no se requieren. Sin embargo cuando la prolina está presente en el medio la proteína PutA sufre un cambio conformacional que provoca la liberación las regiones promotoras de los genes *putA* y *putP* permitiendo su expresión (Menzel *et al.*, 1981b; Ostrovsky *et al.*, 1991). Una vez liberada de su función reguladora, se ha sugerido que la proteína PutA se asocia a la membrana citoplasmática, donde lleva a cabo su función enzimática al acoplarse a la cadena de transporte electrónico (Menzel *et al.*, 1981a; Abrahamson *et al.*, 1983; Graham *et al.*, 1984; Wood 1987) permaneciendo en contacto con el transportador PutP con objeto de optimizar el catabolismo de la prolina a la entrada de la misma (Maloy 1987).

El modelo propuesto para explicar cómo PutA autorregula su expresión y la del gen *putP* dependiendo de la presencia/ausencia de prolina en el medio se basa en el estado de oxidación que presenta la proteína (Wood *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 1993; Ostrovsky *et al.*, 1993). PutA es una flavoproteína que contiene FAD como cofactor el cual se reduce cuando se produce la oxidación de la prolina (Wood 1987). Estudios *in vitro* han demostrado que la afinidad de la proteína PutA por el ADN al que se une *in vivo* disminuye significativamente con la reducción de la proteína. De igual forma estudios de hidrofobicidad relativa muestran que la reducción de la proteína provoca un aumento de hidrofobicidad de la misma (Ostrovsky *et al.*, 1993). El modelo de regulación del operón del catabolismo de la prolina basado en la distinta localización de la proteína PutA se resume en que la entrada de prolina en la célula provoca la reducción del FAD unido a la proteína PutA lo que se traduce en un descenso de la afinidad de la proteína por la región de ADN al que se une y un aumento de la

hidrofobicidad de la misma. Estos dos hechos provocan la liberación de las regiones promotoras del operón y la migración a la membrana interna citoplasmática en donde se acopla con la cadena de transporte electrónico para desempeñar su función enzimática.

Además de la regulación por prolina el operón *put* de enterobacterias se encuentra sometido a otros niveles de regulación. En *S. typhimurium* y *E. coli* el operón *put* está sometido a represión catabólica de forma que la expresión de los genes *putA* y *putP* es muy débil en medios en los que la glucosa está presente (Wood *et al.*, 1979). En *S. typhimurium* el efecto de la represión catabólica es tan marcado que esta enterobacteria es incapaz de usar la prolina cuando en el medio hay glucosa (Prival *et al.*, 1971; Razkin *et al.*, 1978b) debido a que la transcripción de los genes *put* está fuertemente reprimida (Maloy *et al.*, 1983). Se ha demostrado que la proteína receptora de AMP cíclico y el propio AMP cíclico se requieren para la completa expresión del operón *put* (Hahn *et al.*, 1986; Maloy *et al.*, 1983; Nakao *et al.*, 1988) ya que mutantes en la adenilato ciclasa (*cya*<sup>-</sup>) y en la proteína CAP o receptora de AMP cíclico (*crp*<sup>-</sup>) son incapaces de activar la transcripción de los genes *put* (Maloy *et al.*, 1983). En la región de ADN situada entre los dos genes del operón *put* de enterobacterias se han localizado secuencias que se ajustan al consenso propuesto por de Combrugghe y colaboradores (1984) para los sitios de unión de la proteína receptora de AMP cíclico al ADN (Nakao *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1991).

Pero el efecto de represión catabólica sobre el operón *put* de *K. pneumoniae* y *E. coli* puede suprimirse en situaciones de hambre de nitrógeno, hecho que no se observa en *S. typhimurium*. Esto parece indicar que además de la regulación por fuente de carbono, la expresión del operón *put* parece estar regulada por la fuente de nitrógeno del medio. Se sabe que la expresión del operón *put* de *K. pneumoniae* y *E. coli* se encuentra bajo el control del mecanismo general de regulación del metabolismo del nitrógeno ya que se activa cuando no existe amonio en el medio (Chen *et al.*, 1991). En enterobacterias la regulación del metabolismo del nitrógeno se lleva a cabo a través de tres proteínas fundamentales que son los productos de los genes *ntrA*, *ntrB*, y *ntrC*. El gen *ntrA* codifica el factor  $\sigma^{54}$  que confiere la especificidad a la holoenzima de la ARN polimerasa para promotores con secuencias consenso -12/-24 muy conservadas del tipo 5'-GG(N)<sub>10</sub>GC-3' (Barrios *et al.*, 1999). El producto del gen *ntrB* es una kinasa que

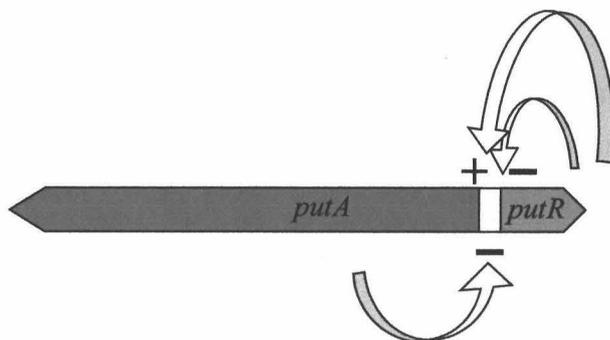
fosforila y desfosforila a la proteína NtrC con objeto de activarla o desactivarla. La proteína NtrC es un activador transcripcional que en su forma fosforilada cataliza la isomerización del complejo cerrado de la  $\sigma^{54}$ -ARN polimerasa a complejo abierto permitiendo la transcripción de los correspondientes promotores  $\sigma^{54}$  dependientes (Magasanik 1996; Buck *et al.*, 2000). Pero se da el hecho de que el operón del catabolismo de la prolina no presenta promotores típicos del factor  $\sigma^{54}$  (Barrios *et al.*, 1999) ni homología alguna con las secuencias consenso de los sitios de unión de NtrC (Chen *et al.*, 1991). El control de la expresión del operón *put* no se produce de forma directa a través de las proteínas NtrC, NtrB y  $\sigma^{54}$ , sino que se produce de forma indirecta a través de la llamada proteína NAC (*nitrogen assimilation control*). La expresión del operón *put* en *K. aerogenes* es totalmente dependiente de la proteína NAC de forma que un mutante carente de esta proteína no es capaz de utilizar la prolina (Bender *et al.*, 1983). Además, la proteína NAC es suficiente para producir la activación de la expresión del operón *put* ya que se ha comprobado que cepas portadoras de fusiones transcripcionales de un promotor del tipo  $P_{lac}$  y el gen *nac* expresen los genes *put* únicamente en presencia de IPTG (Schwacha *et al.*, 1993). En *Salmonella* no existe la proteína NAC (Muse *et al.*, 1998) ni el operón del catabolismo de la prolina se activa cuando se introduce la proteína NAC en *trans* (Chen *et al.*, 1998) lo que explica que no esté sometida a control de nitrógeno.

La proteína NAC juega un papel importante en la regulación de la expresión de algunos operones responsables del catabolismo de compuestos nitrogenados cuya degradación suministra a la célula una fuente de nitrógeno alternativa al amonio en situaciones de hambre. Esta proteína pertenece a la familia LysR de reguladores transcripcionales (Henikoff *et al.*, 1988) que activa la transcripción de operones como los de degradación de prolina, histidina y urea y reprime la expresión operones involucrados en la asimilación de amonio como el de la glutamato deshidrogenasa (Bender *et al.*, 1983; Macaluso *et al.*, 1990). La expresión del gen *nac* está controlada por el sistema de regulación general del nitrógeno (sistema NTR) de forma que para la expresión de la proteína NAC es necesaria la existencia de las proteínas NTRC-NTRB y el factor  $\sigma^{54}$  (Macaluso *et al.*, 1990) (**Figura 7**). Dado que la proteína NAC activa la transcripción de operones dependientes de la ARN polimerasa  $\sigma^{70}$  y que su síntesis depende del sistema general de regulación del nitrógeno se ha propuesto que esta

proteína es un regulador transcripcional que acopla la expresión de los operones dependientes de la ARN polimerasa  $\sigma^{70}$  con los operones dependientes de la ARN polimerasa  $\sigma^{54}$  en situaciones de hambre de nitrógeno (Bender 1991).

### 3.3.2. Estructura y regulación del operón del catabolismo de la prolina en *Rhodobacter capsulatus*.

El operón del catabolismo de la prolina en *R. capsulatus* consta de dos genes el gen *putA* y el gen *putR*. El gen *putA* codifica una proteína homóloga a la proteína PutA de enterobacterias que posee las dos actividades enzimáticas necesarias para la transformación de prolina hasta glutamato aunque la proteína PutA de *R. capsulatus* es 86 aminoácidos más corta en el extremo amino terminal que su homóloga de enterobacterias. El gen *putR* es una fase abierta de lectura de 465 nucleótidos que se transcribe divergentemente con respecto al gen *putA* y codifica una proteína reguladora de la familia de reguladores Lrp (Willins *et al.*, 1991) (**Figura 8**). La proteína PutR es un regulador transcripcional que regula su propia expresión y la del gen *putA*. En ausencia de prolina la proteína PutR se une a la región de ADN existente entre los genes *putA* y *putR* permitiendo sólo la expresión de los mismos a niveles muy bajos. Cuando la prolina está presente en el medio, la proteína PutR sufre un cambio conformacional que provoca la liberación de la región de ADN a la que se une y aumenta la afinidad de la proteína por el promotor del gen *putA* permitiendo la expresión a alto nivel de ambos genes (Keuntje *et al.*, 1995). La proteína PutA de *R. capsulatus* también parece controlar su propia síntesis como ocurre en el caso de enterobacterias (Keuntje *et al.*, 1995).

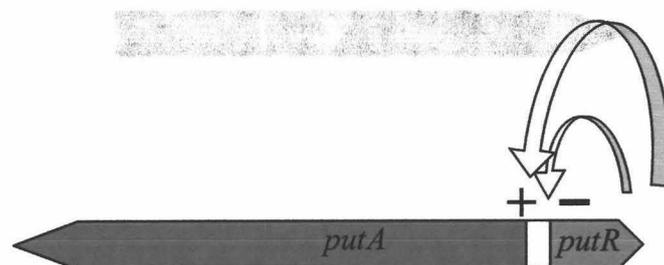


**Figura 8. Organización genética del operón del catabolismo de la prolina en *R. capsulatus*.** Con el signo negativo se indica la represión que ejercen las proteínas PutA y PutR en ausencia de prolina mientras que con signo positivo se indica la activación que produce la proteína PutR en la expresión de *putA* y *putR* en presencia de prolina.

Se conoce poco acerca de la regulación del operón *put* de *R. capsulatus* por hambre de carbono y/o nitrógeno. Parece ser que la expresión del operón del catabolismo de la prolina en *R. capsulatus* no depende del sistema de regulación general del nitrógeno ya que existe expresión de los genes *putA* y *putR* en mutantes NtrC<sup>-</sup> y NtrA<sup>-</sup> de este microorganismo.

### 3.3.3. Estructura y regulación del operón de degradación de la prolina en *Agrobacterium tumefaciens* y *Bradyrhizobium japonicum*.

El operón del catabolismo de la prolina en *A. tumefaciens* y *B. japonicum* presenta algunos aspectos similares al de *R. capsulatus*. La estructura genética del operón (**Figura 9**) es la misma que la encontrada en *R. capsulatus*, es decir, el operón consta de los genes *putA* y *putR* transcritos divergentemente. La proteína codificada por el gen *putR* presenta el mismo papel regulador que la proteína PutR de *R. capsulatus* siendo un activador de los genes *putA* y *putR* cuando existe prolina en el medio y un represor cuando no existe ésta. Pese a la similitud estructural la proteína PutA de *A. tumefaciens* y *B. japonicum* no parece autorregular su propia síntesis como ocurre en el caso de enterobacterias y *R. capsulatus* de forma que el único regulador transcripcional conocido para el operón es la proteína PutR (Cho *et al.*, 1996).



**Figura 9. Organización genética y regulación del operón del catabolismo de la prolina en *A. tumefaciens* y *B. japonicum*.** Con el signo negativo se indica la represión que ejercen la proteína PutR en ausencia de prolina mientras que con signo positivo se indica la activación que ejerce la proteína PutR en la expresión de los genes *putA* y *putR* en presencia de prolina.

### 3.3.4. Estructura y regulación del operón del catabolismo de la prolina en *Sinorhizobium meliloti*.

En *S. meliloti* el gen *putA* responsable del catabolismo de la prolina (Jimenez-Zurdo *et al.*, 1995) no parece formar parte de ninguna agrupación génica (Figura 10). Mediante comparación de secuencia y experimentos de intercambio alélico se ha determinado que corriente arriba al gen *putA* no existe ninguna fase de lectura abierta (ORF) implicada en el catabolismo de la prolina (Soto *et al.*, 2000). Las ORFs situadas corriente arriba al gen *putA* codifican proteínas que no presentan homología con el regulador transcripcional PutR como ocurre en *Agrobacterium*, *Rhodobacter* o *Bradyrhizobium* ni con el transportador PutP de enterobacterias. Se ha demostrado que existe un transportador de prolina en este microorganismo pero no se encuentra ligado al gen *putA* (Soto *et al.*, 2000). Por tanto, el operón del catabolismo de la prolina en este organismo consta de un único gen, el gen *putA* cuya expresión se induce por presencia de prolina y se autorregula como en el caso de enterobacterias. Al contrario de lo que ocurre en enterobacterias el operón del catabolismo de la prolina no está sometida a represión catabólica (Soto *et al.*, 2000) ni parece estar regulado por el sistema general del metabolismo del nitrógeno (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1997).

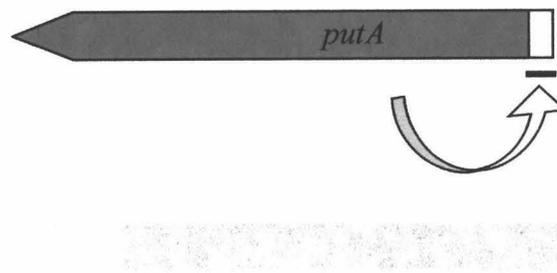


Figura 10. Organización genética y regulación del operón del catabolismo de la prolina en *S. meliloti*. Con el signo negativo se indica la represión que ejercen la proteína PutA en ausencia de prolina.

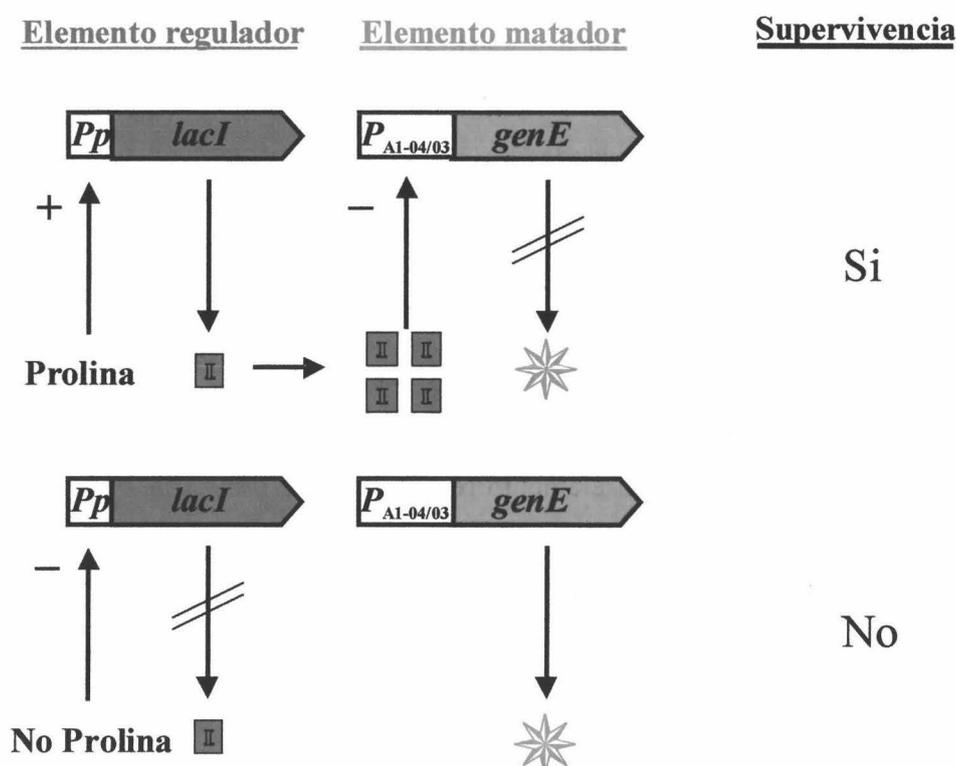
#### **4. Diseño de un sistema activo de contención biológica dependiente de prolina.**

En todo sistema activo de contención se distinguen dos elementos fundamentales, un elemento matador, cuya expresión provoca la muerte de la célula portadora del sistema de contención y un elemento regulador el cual controla la expresión del elemento matador en respuesta a un cambio de la señal del medio ambiente. El funcionamiento de un sistema activo de contención biológica se basa en la inducción de la expresión de los llamados genes matadores o suicidas en situaciones definidas.

En el laboratorio, el sistema de control de la muerte bacteriana utilizado más frecuentemente se basa en la fusión de un gen matador al promotor del operón de la lactosa ( $P_{lac}$ ), cuya expresión se reprime por la proteína LacI (Bej *et al.*, 1988). En presencia de lactosa o del análogo de la misma, el isopropiltiogalactósido (IPTG), la proteína LacI se libera del promotor  $P_{lac}$  y éste se expresa libremente. Sin embargo, en el medio ambiente no sería práctico controlar la supervivencia de microorganismos liberados intencionadamente utilizando una señal química exógena. El control de la muerte celular a través de compuestos presentes en el medio ambiente, o a través de cambios en las condiciones físicas del entorno como la temperatura, humedad, etc., se consideran más convenientes. Dado que el objetivo era la construcción de una cepa contenida capaz de sobrevivir únicamente en las inmediaciones de las raíces de maíz se pensó que la señal más adecuada era algún compuesto exudado por la planta, de entre los cuales se eligió la prolina. El elemento regulador del sistema de contención debía estar diseñado de forma que evitara la expresión del elemento matador en presencia de exudados radiculares o lo que es mismo en presencia de prolina. Esto se conseguiría mediante la fusión del gen que codifica para la proteína represora LacI a un promotor inducible por prolina. Dicho promotor parecía lógico buscarlo en los genes responsables del catabolismo de la prolina de *P. putida* ya que se esperaba que la expresión de los mismos estuviera condicionada por la presencia de prolina en el medio como ocurría en otros organismos.

El elemento matador elegido para la construcción de la cepa contenida fue el desarrollado en nuestro grupo de investigación por la doctora Ronchel el cual funcionó eficientemente en la construcción de una cepa contenida de *P. putida* dependiente de alquilbenzoatos (Ronchel *et al.*, 1998). Este elemento matador está basado en la expresión del gen suicida del fago  $\Phi X174$ , conocido como gen *E*, a partir del promotor  $P_{A1-04/03}$ , un derivado del promotor  $P_{lac}$ .

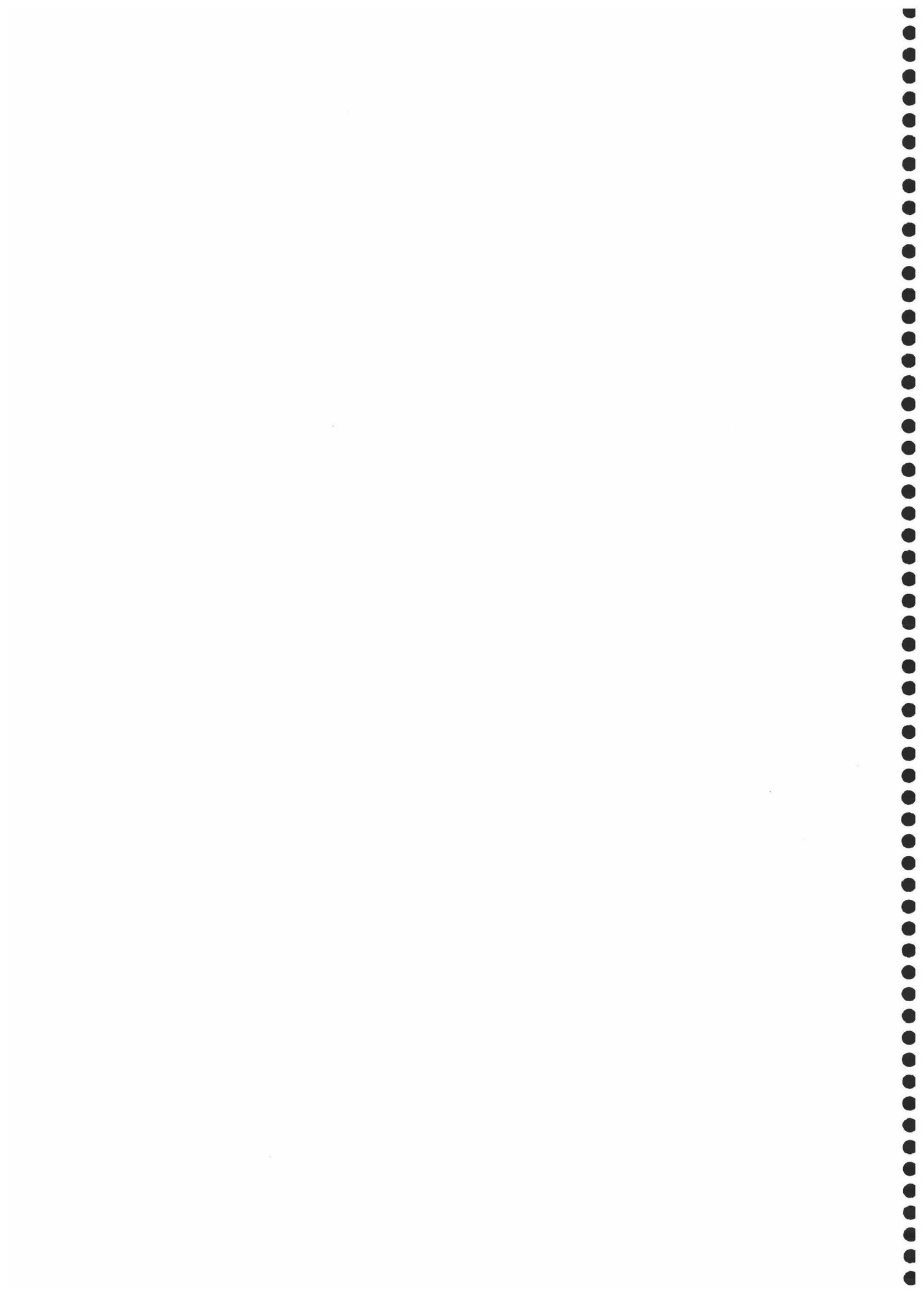
El funcionamiento del sistema ideado se resume en la **Figura 11**. En presencia de prolina, el promotor fusionado al gen *lacI* se expresa, con lo que la proteína LacI se sintetiza, previniéndose la expresión del promotor  $P_{A1-04/03}$  y por tanto la síntesis de la proteína matadora. En ausencia de prolina, el promotor dependiente de este iminoácido no se expresa, no se sintetiza el represor LacI, el promotor  $P_{A1-04/03}$  se libera, la proteína matadora se sintetiza y se produce la muerte celular.



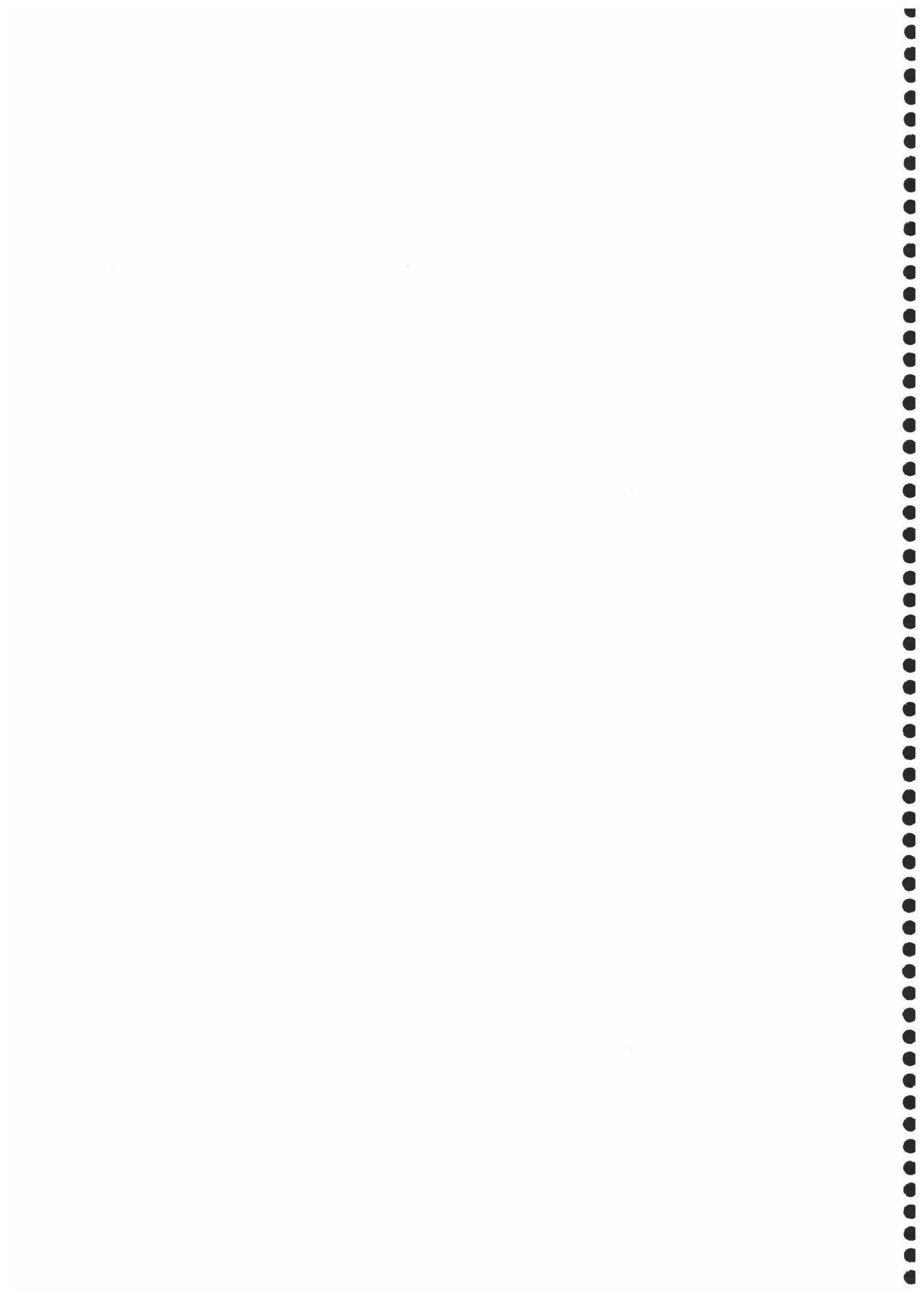
**Figura 10. Funcionamiento de un sistema de contención biológica dependiente de prolina.** A) Cuando existe prolina en el medio, el promotor  $P_p$  dependiente de prolina se activa, permitiendo la síntesis del represor LacI (■), se evita la expresión del gen matador o suicida y la síntesis de la proteína E (\*), por lo que la célula sobrevive. B) Cuando no existe prolina en el medio, el promotor  $P_p$  dependiente de prolina no se expresa, el represor LacI (■) no se sintetiza, el promotor  $P_{A1-04/03}$  no se reprime por lo que la proteína matadora se sintetiza provocando la muerte celular.

Dado que los promotores del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* no estaban caracterizados a nivel molecular fue necesario realizar un estudio previo del operón responsable del catabolismo de este compuesto antes de la construcción del sistema de contención.

En esta Tesis Doctoral se presentan resultados sobre la identificación del operón del catabolismo de la prolina, su regulación y su utilización en el diseño de un sistema de contención que permita controlar la supervivencia de una cepa de *P. putida* en suelos.

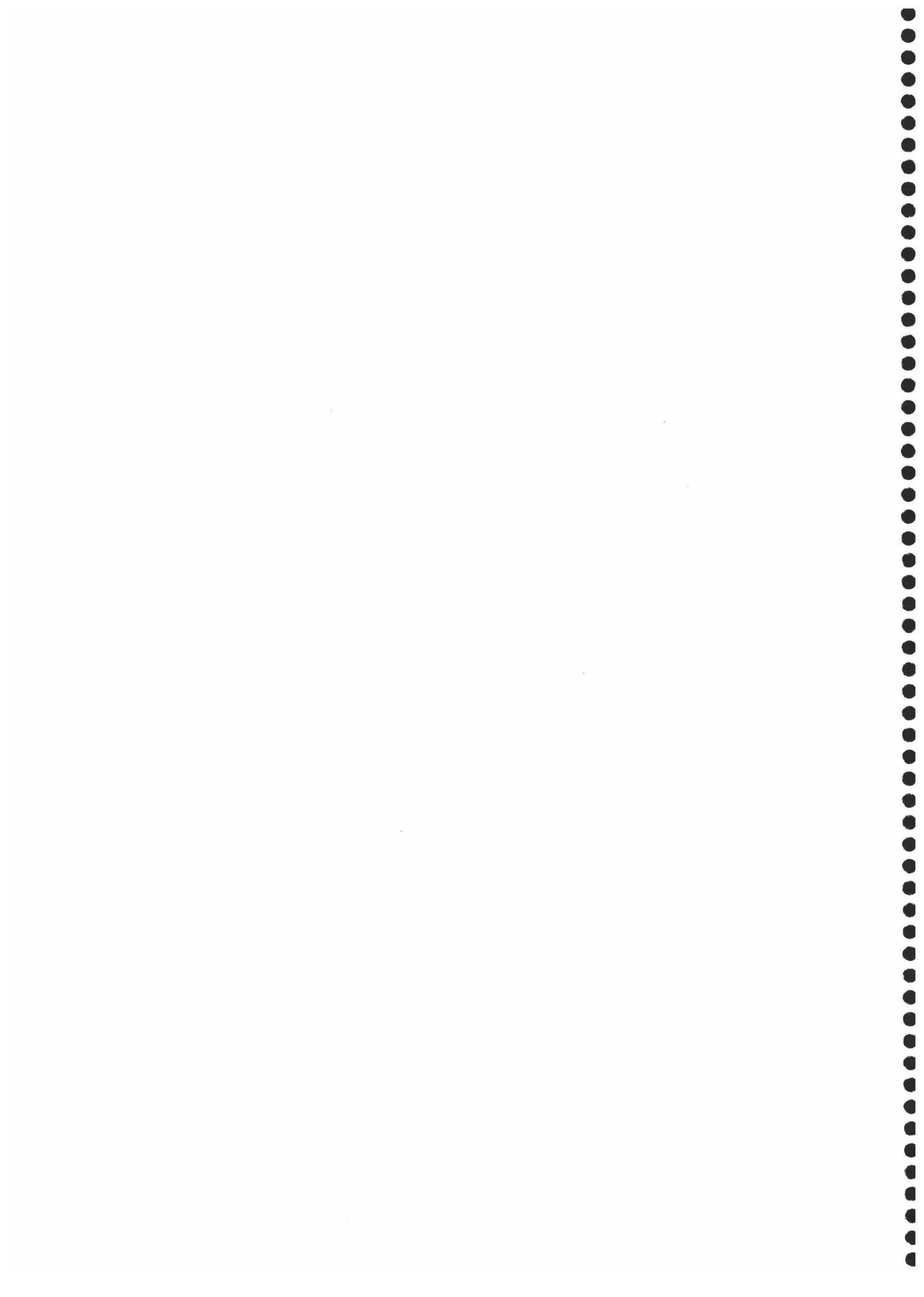


OBJETIVOS

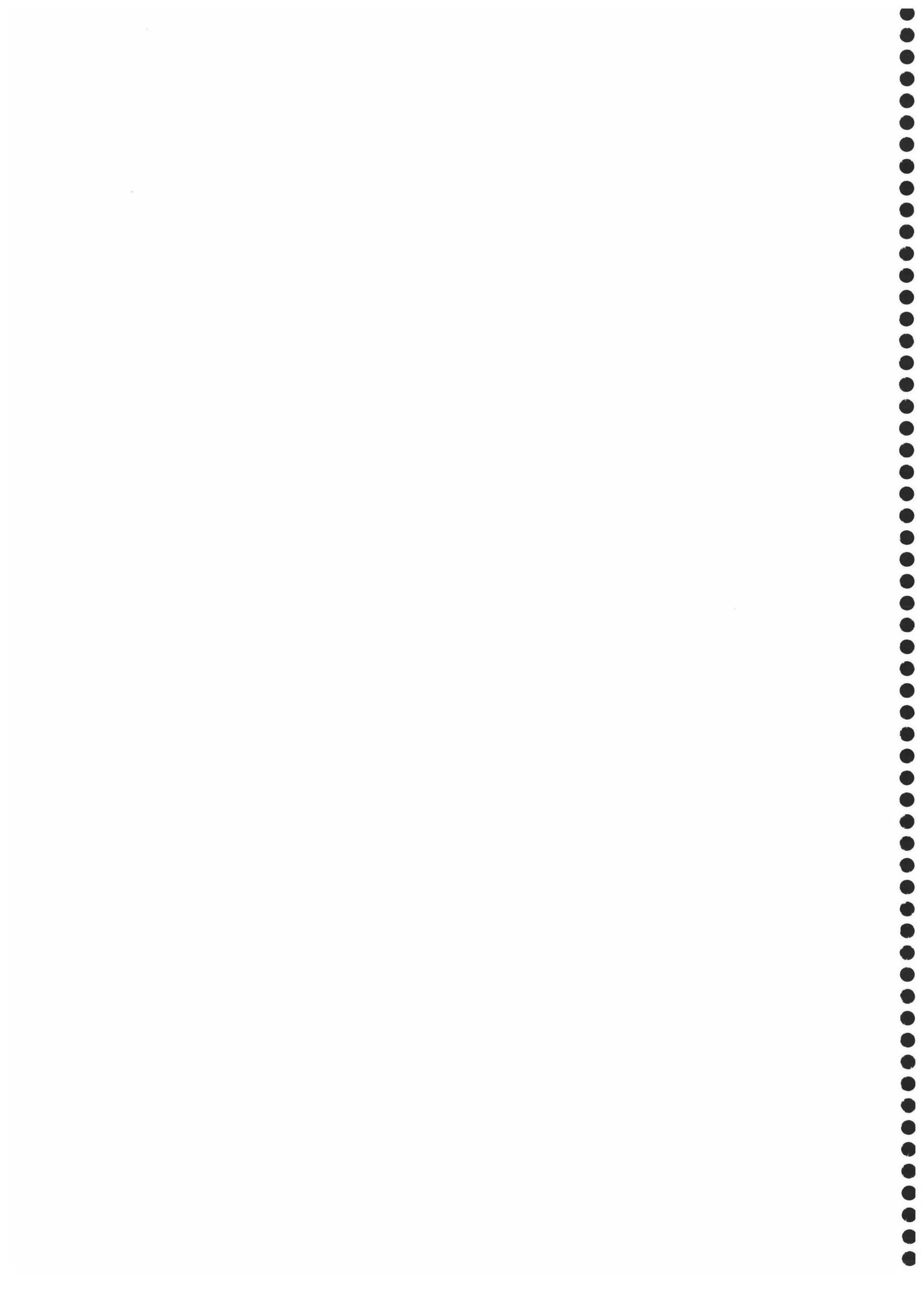


En base a los antecedentes reseñados en la *Introducción* de esta Tesis Doctoral se establecieron los siguientes objetivos inicialmente.

- 1) Caracterización de la utilización de prolina como fuente de carbono y nitrógeno por *Pseudomonas putida* KT2440. Localización física, clonación, secuenciación y análisis de los genes implicados en el catabolismo de la prolina en *P. putida* KT2440.
- 2) Estudio de la expresión de los genes implicados en el catabolismo de la prolina, identificación de las regiones promotoras y análisis de la transcripción en distintos fondos genéticos.
- 3) Aislamiento y caracterización de mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina.
- 4) Diseño y ensayo funcional de un sistema activo de contención biológica en *P. putida* basado en el promotor del gen *putA*, la función reguladora de la proteína PutA y la acción letal del producto del gen *E* del fago  $\phi$ X174.



## MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. CEPAS BACTERIANAS.

Las estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo, junto con sus genotipos o características más relevantes se recogen en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo/Características	Referencia/Fuente
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17</i> ( $r_K^- m_K^+$ ) <i>gyrA96</i> (Nal <sup>R</sup> ) <i>relA1 thi</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) F'[ <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , (1985)
DH5 $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> ( $r_K^- m_K^+$ ) <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal <sup>R</sup> ) <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan, (1983)
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> ( $r_B^- m_B^-$ ) <i>recA13 ara-14</i> <i>proA2 lacY1 galK2 rpsL20</i> (Sm <sup>R</sup> ) <i>xyl-5 mtl-1</i>	Boyer <i>et al.</i> , (1969)
RM2	<i>Trp lacZ rpsL thi</i> $\Delta$ putAP F'	Wood, (1981)
CC118	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD <math>\Delta</math>lacX74 galE galK phoA20</i> <i>thi-1 rpsE</i> (Sp <sup>R</sup> ) <i>rpoB</i> (Rif <sup>R</sup> ) <i>argE recA1</i>	Manoil <i>et al.</i> , (1985)
CC118 $\lambda$ pir	CC118 lisogenizada con el fago $\lambda$ pir	Herrero <i>et al.</i> , (1990)
S17-1- $\lambda$ pir	<i>RecA, thi pro hsdR M<sup>+</sup> RP4:2-Tc:Km</i> Tn7, $\lambda$ pir	de Lorenzo <i>et al.</i> , (1994)
Mv1190 $\lambda$ pir	F'[ <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>lacI<sup>q</sup></i> ] <i>thi</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) <i>supE</i> $\Delta$ ( <i>srl-recA</i> ) 306::Tn10 $\lambda$ pir	Herreo <i>et al.</i> , (1990)
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. putida</i> KT2440	<i>hsdR1</i>	Franklin <i>et al.</i> , (1981)
<i>P. putida</i> KT2442	<i>P. putida</i> KT2440, Rif <sup>R</sup>	Franklin <i>et al.</i> , (1981)
<i>P. putida</i> KT2440-IHF3	KT2440, <i>ihfA::Km, Km<sup>R</sup></i>	Marqués <i>et al.</i> , (1998)
<i>P. putida</i> KT2440-C1R1	KT2440, <i>rpoS::Km::luxAB, Km<sup>R</sup></i>	Ramos <i>et al.</i> , (1998)
<i>P. putida</i> MAD-ptsN	KT2442, <i>Pu::lacZ, ptsN::Km, Km<sup>R</sup></i>	Cases <i>et al.</i> , (1999)
<i>P. putida</i> KT2440- <i>rpoN</i>	KT2440, <i>rpoN::Km, Km<sup>R</sup></i>	Köhler <i>et al.</i> , (1989)

## 2. MEDIOS DE CULTIVO.

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla a continuación. Todos los medios y soluciones se esterilizaron en autoclave por calor

húmedo a 120°C y 1 atmósfera de presión, o por filtración utilizando filtros estériles de acetato de celulosa de 0,22 µm de diámetro de poro.

### 2.1. Medios ricos.

Como medio habitual de crecimiento de las cepas de *E. coli* se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición fue la siguiente: bacto-triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g y H<sub>2</sub>O hasta 1 litro.

Para la preparación de medio sólido LB se añadió bacto-agar hasta alcanzar una concentración final de 1,5% (p/v) y se esterilizó mediante autoclave.

### 2.2. Medios mínimos.

Para el cultivo de células en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9 (Sambrooks *et al.*, 1989) cuya composición fue la siguiente: solución 10xM9, 100 mL; solución A9 ("goodies"), 2,5 mL; MgSO<sub>4</sub> 1 M, 1 mL; citrato férrico amónico 0,6% (p/v), 1 mL y H<sub>2</sub>O hasta 1 litro. Las soluciones empleadas en este medio se prepararon y esterilizaron por separado en el autoclave.

**La composición de la solución 10xM9 fue:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 70 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 g; NH<sub>4</sub>Cl, 10 g; NaCl, 5 g y H<sub>2</sub>O hasta 1 litro.

**La solución A9 se compuso de:** HBO<sub>3</sub>, 300 mg; ZnCl<sub>2</sub>, 50 mg; MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O, 30 mg; CoCl<sub>2</sub>, 200 mg; CuCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 10 mg; NiCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 20 mg; NaMoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 30 mg y H<sub>2</sub>O hasta 1 litro.

El medio M8 fue similar al medio M9 con la excepción de que se preparó a partir de la solución 10xM8 la cual contenía la misma composición que la solución 10xM9 pero sin NH<sub>4</sub>Cl.

La/s fuente/s de carbono (succinato, prolina, glucosa, citrato, glutámico, glicerol, glicina, fumárico y acetato) se adicionó/aron al medio mínimo a la concentración adecuada según el experimento a partir de soluciones madre 1 M las cuales se esterilizaron mediante autoclave, a excepción de la prolina y la glicina que se esterilizaron por filtración, y se almacenaron a 4°C hasta su utilización. Para la preparación de medio mínimo sólido se añadió bacto-agar para alcanzar una concentración final del 2% (p/v). El bacto-agar se esterilizó previamente mediante autoclave en soluciones en H<sub>2</sub>O al 2,25% (p/v).

### 2.3. Antibióticos.

Las soluciones de antibióticos se prepararon 1.000 veces concentradas en H<sub>2</sub>O destilada, excepto el cloramfenicol que se preparó en etanol absoluto, y la rifampicina y la tetraciclina que se prepararon en metanol. Las soluciones preparadas en H<sub>2</sub>O se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20°C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales indicadas en µg/mL: ácido nalidíxico (Nal), 10; ampicilina (Ap), 100; cloramfenicol (Cm), 30; estreptomina (Sm), 50; kanamicina (Km) 25; rifampicina (Rif), 20 y tetraciclina (Tc), 20.

### 2.4. Metales pesados.

El telurito potásico (Tel) se preparó en solución 1000 veces concentrada en H<sub>2</sub>O destilada, se esterilizó por filtración, se almacenó a -20°C y se utilizó a una concentración final de 30 µg/mL.

### 2.5. Condiciones de cultivo.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37°C y las cepas de *P. putida* se cultivaron a 30°C. Los cultivos líquidos se incubaron con una agitación de 200 rpm en un incubador orbital Adolf Kühner ISF-4-V.

## 3. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.

La conservación de cepas a corto plazo se hizo en cultivos en estría en placas de medios selectivos a 4°C. La conservación a largo plazo se hizo por congelación de cultivos líquidos en 40% (v/v) de glicerol a -20°C y -80°C.

## 4. PLÁSMIDOS.

En la Tabla 2 se relacionan los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. Asimismo en el texto se detallan algunas propiedades que han sido relevantes para su utilización o en el diseño de ciertos experimentos.

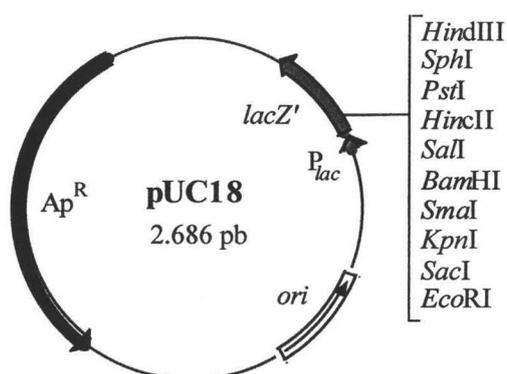
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia/Fuente
pUC19	Ap <sup>R</sup> , <i>oriColE1</i> , <i>rop</i> <sup>-</sup> , $\alpha$ -complementación	Vieira <i>et al.</i> , (1982)
pUC18	Similar al pUC19 con distinta orientación del MCS.	Norlander <i>et al.</i> , (1983) GenBank: L08752
pLAFR3	Tc <sup>R</sup> , <i>cos</i> , <i>oriV</i> RK2, <i>oriTRK2</i> , $\alpha$ -complementación	Staskawicz <i>et al.</i> , (1987)
pCK01	Cm <sup>R</sup> , vector de clonación de bajo n° de copias	Fernández <i>et al.</i> , (1995)
pPC6	Derivado de pBR322 que contiene un fragmento <i>AatII</i> - <i>PvuII</i> que porta el operón del catabolismo de la prolina de <i>S. typhimurium</i> .	Hahn <i>et al.</i> , (1988)
pMCC31	Ap <sup>R</sup> , Tel <sup>R</sup> , derivado de pJMSB4, P <sub>A1-04/03</sub> ::gen <i>E</i>	Ronchel (1997)
pMP220	Tc <sup>R</sup> , ' <i>lacZ</i>	Spaink <i>et al.</i> , (1987)
pUC18Not	Derivado de pUC18 con dos sitios <i>Not</i> I flanqueando al MCS, Ap <sup>R</sup>	Herrero <i>et al.</i> , (1990)
pCK220 (pUT/mini-Tn5 <i>luxABK</i> m)	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , <i>oriR6K</i> , <i>oriTRP4</i> , plásmido para la donación del mini-Tn5 <i>luxABK</i> m	Sternberg <i>et al.</i> , (1997)
pCNB5 (pUT/mini-Tn5 <i>lacI</i> <sup>q</sup> / <i>P<sub>trc</sub></i> )	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , <i>oriR6K</i> , <i>oriTRP4</i> , plásmido para la donación del mini-Tn5 <i>lacI</i> <sup>q</sup> / <i>P<sub>trc</sub></i>	de Lorenzo <i>et al.</i> , (1993)
pUT/mini-Tn5/Km <sub>2</sub>	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , <i>oriR6K</i> , <i>oriTRP4</i> , plásmido para la donación del mini-Tn5Km	de Lorenzo <i>et al.</i> , (1990)
pJMSB4	Ap <sup>R</sup> , Tel <sup>R</sup> , <i>oriR6K</i> , <i>oriTRP4</i> , plásmido para la donación del mini-Tn5Tel	Sánchez (1997)
pRK600	Cm <sup>R</sup> , <i>oriColE1</i> , <i>mobRK2</i> , <i>traRK2</i>	Kessler <i>et al.</i> , (1992)

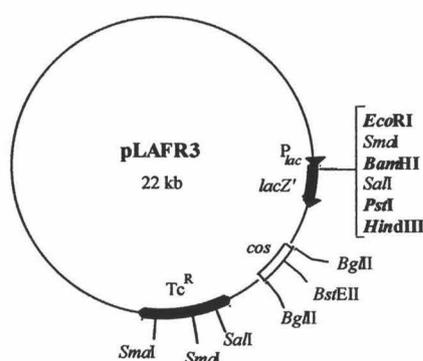
**pUC18:** vector de clonación de 2.686 pb que combina fragmentos de pBR322 y de vectores de la serie M13mp (**Figura 12**). Carece del gen *rop* implicado en el control del número de copias de plásmidos que contienen el origen de replicación de *ColE1*, y como consecuencia, presenta un alto número de copias (más de 700) por célula. Confiere resistencia a ampicilina, y posee un sitio de clonación múltiple (MCS) dentro de la región que codifica el péptido  $\alpha$  de *LacZ*. Esto posibilita una fácil selección de los plásmidos recombinantes en cepas que permitan  $\alpha$ -complementación, es decir, aquellas portadoras de la delección *lacZ* $\Delta$ M15 (por ejemplo JM109, DH5 $\alpha$ , etc.). Aquellos clones que porten un plásmido con inserto, formarán colonias de color blanco (en contraposición al color azul de los clones sin inserto) en medio LB sólido suplementado con ampicilina y con 25  $\mu$ g/mL del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -

D-galactopiranosido (X-gal). Si el plásmido se transforma en una cepa *lacI*<sup>+</sup>, es necesario añadir, además, 130  $\mu$ M de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

**pLAFR3:** cósmido derivado de pLAFR1 (Friedman *et al.*, 1982) que posee el fragmento *Hae*II de 454 pb de pUC8 (Vieira *et al.*, 1982) conteniendo el MCS y las regiones *lac* que permiten la  $\alpha$ -complementación (**Figura 13**). Posee los sitios *cos* del fago lambda necesarios para el empaquetamiento de ADN dentro de la cápsida de dicho fago. Sólo los cósmidos recombinantes con un tamaño total entre 36 y 51 kb son susceptibles de ser empaquetados *in vitro*. Este plásmido se utilizó para la construcción de la genoteca de *P. putida* utilizada en este trabajo.



**Figura 12. Plásmido pUC18.** Los sitios de restricción indicados son únicos y están localizados en el MCS dentro del fragmento *lacZ'*. También se muestra la localización del origen de replicación (*ori*), y del gen de resistencia a ampicilina. Las flechas indican el sentido de la replicación del plásmido o de la transcripción de los genes.



**Figura 13. Cósmido pLAFR3.** En el mapa se muestran los sitios de restricción más relevantes. En negrita se indican los sitios del MCS que son únicos en el plásmido. Se muestra además la posición del gen de resistencia a tetraciclina y la de los sitios *cos*. También se indica la posición del fragmento *lacZ'* que se encuentra bajo el control del promotor *P*<sub>lac</sub> (el sentido de la transcripción viene indicado por la flecha).

**pCNB5:** plásmido de la serie pUT que contiene un transposón mini-Tn5*lacI<sup>q</sup>/P<sub>trc</sub>* (Figura 14). El sistema donador empleado para todos los transposones mini-Tn5 se basa en el plásmido pUT (Herrero *et al.*, 1990), un derivado del plásmido suicida pGP704 (Miller *et al.*, 1988). Este plásmido tiene el origen de replicación del plásmido R6K (dependiente de la proteína  $\pi$ ), el origen de transferencia, *oriT*, del plásmido RP4 (es transferible si se aportan las funciones de movilización en *trans*), y lleva el gen de la  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a una gran variedad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos incluyendo piperacilina. El plásmido pUT contiene además el gen que codifica la transposasa de IS50<sub>R</sub>, necesaria para la transposición de los elementos mini-Tn5. Durante la transposición la transposasa corta el ADN diana dejando una duplicación directa de 9 pb a cada lado de los extremos del mini-Tn5. Estos elementos transponibles, delimitados por 19 pb de los extremos I y O de Tn5, poseen como característica común un gen marcador seleccionable y un sitio de restricción único, *NotI* o *SfiI*, que facilita la clonación de ADN heterólogo para su posterior inserción en el cromosoma o en otro replicón de la bacteria elegida. Además, se han eliminado secuencias no esenciales (como el gen *inh*, que codifica un inhibidor de la transposición), reduciendo así considerablemente su tamaño. Como consecuencia, una misma cepa puede usarse repetidas veces como receptora de distintas transposiciones siempre que se utilicen mini-Tn5 con marcadores de selección diferentes. Por otra parte, el gen que codifica la transposasa se encuentra fuera de los extremos del minitransposón y, por tanto, no se moviliza con éste durante la transposición. Como resultado, las inserciones resultantes son muy estables. Además, como la transposasa actúa preferentemente en *cis*, incluso si la célula huésped adquiriese con posterioridad, o ya portase, un transposón natural del mismo tipo, éste no estimularía una nueva transposición del elemento mini-Tn5 insertado. Los transposones de la serie mini-Tn5 se pueden usar para generar mutantes por inserción al azar o también para introducir secuencias heterólogas de ADN en el cromosoma de una gran variedad de bacterias gram negativas. El minitransposón mini-Tn5*lacI<sup>q</sup>/P<sub>trc</sub>*, que confiere resistencia a kanamicina, permite clonar y expresar genes heterólogos bajo el control del promotor P<sub>trc</sub>. Además, porta el gen *lacI<sup>q</sup>* con lo que la expresión a partir de dicho promotor se puede inducir añadiendo IPTG.

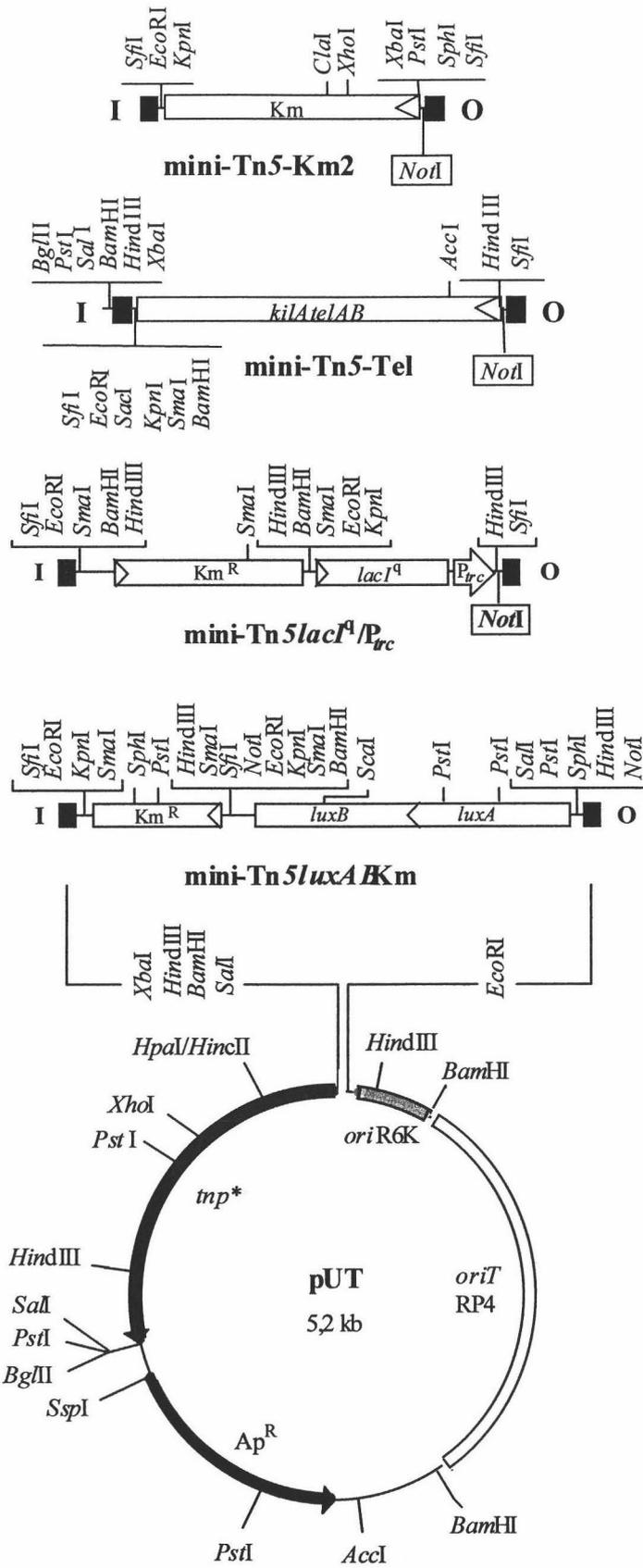
**pCK220:** plásmido de la serie pUT que contiene un transposón mini-Tn5luxABKm (**Figura 14**). Este minitransposón es un derivado del mini-Tn5luxAB construido por de Lorenzo *et al.*, (1990) en el cual se ha reemplazado el gen original de resistencia a tetraciclina por un gen de resistencia a kanamicina (Sternberg *et al.*, 1997). También lleva los genes 'luxAB desprovistos de promotor. Estos genes codifican las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, de la luciferasa de *Vibrio harveyi*. Este elemento permite, mediante fusiones transcripcionales, detectar y cuantificar la actividad de promotores bajo los cuáles se inserte la unidad móvil. Los clones que portan fusiones activas se pueden detectar porque emiten una luz verdeazulada (con un máximo de emisión a una longitud de onda de 490 nm) en presencia de oxígeno molecular y de un aldehído saturado de cadena larga que contenga más de 8 átomos de carbono (por ejemplo, *n*-decanal). La emisión de luz se puede detectar directamente en colonias cultivadas sobre medio sólido.

**pUTKm2:** plásmido de la serie pUT que contiene un transposón mini-Tn5-Km<sub>2</sub> que porta el gen de resistencia a la kanamicina del transposón Tn903 (**Figura 14**). El sitio *NotI*, único en el plásmido, se encuentra delante del promotor del gen que codifica resistencia a la kanamicina.

**pJMSB4:** plásmido de la serie pUT que contiene un transposón mini-Tn5-Tel que porta el gen de resistencia al telurito potásico (**Figura 14**). El sitio *NotI*, único en el plásmido, se encuentra delante del promotor del gen que codifica resistencia a esta sal.

**pRK600:** plásmido auxiliar que aporta en *trans* las funciones necesarias para la movilización de plásmidos *mob<sup>+</sup> tra<sup>-</sup>*. Este plásmido posee el origen de replicación de ColE1 y por tanto no se puede replicar en *Pseudomonas*. Confiere resistencia a cloramfenicol.

**pPC6:** plásmido derivado del vector de clonación pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) que contiene un fragmento *PvuII-AatII* de 6,8 kb del cromosoma de *S. typhimurium* que incluye el operón completo del catabolismo de la prolina de este organismo (**Figura 15**).

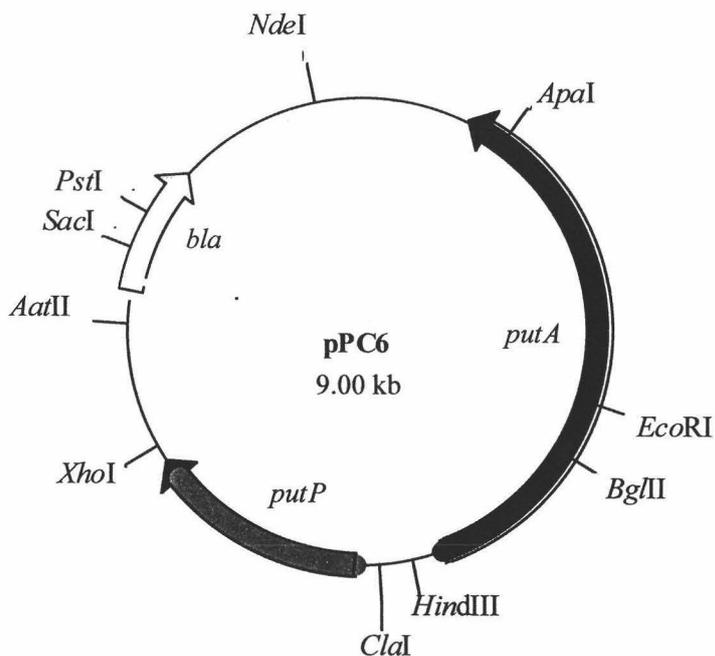


**Figura 14. Plásmidos de la serie pUT.** El plásmido pUT, que funciona como donador de los elementos mini-Tn5, se muestra en la parte inferior de la figura, y es común para las cuatro construcciones. En el mapa se indican los sitios de restricción más relevantes, los orígenes de replicación y de transferencia, el gen de resistencia a ampicilina y el gen *tnp\**. Este gen es un derivado de *tnp* (que codifica la transposasa de IS50<sub>R</sub>) en el cual se ha eliminado un sitio *NotI* interno. Las unidades móviles que se muestran están clonadas en el pUT como fragmentos *XbaI-EcoRI*. Ambos sitios son externos a los extremos del minitransposón (indicados como I y O), y no son transportados con éste durante el evento de transposición. NOTA: Que un sitio de restricción mostrado en el mapa del pUT no se indique en el mapa de los minitransposones no implica que no pueda estar, y viceversa. En cambio, el sitio *NotI* recuadrado dentro del mini-Tn5*lacI*<sup>q</sup>/*P<sub>trc</sub>*, mini-Tn5-Tel y mini-Tn5Km2 si es único, tanto en el minitransposón como en el pUT.

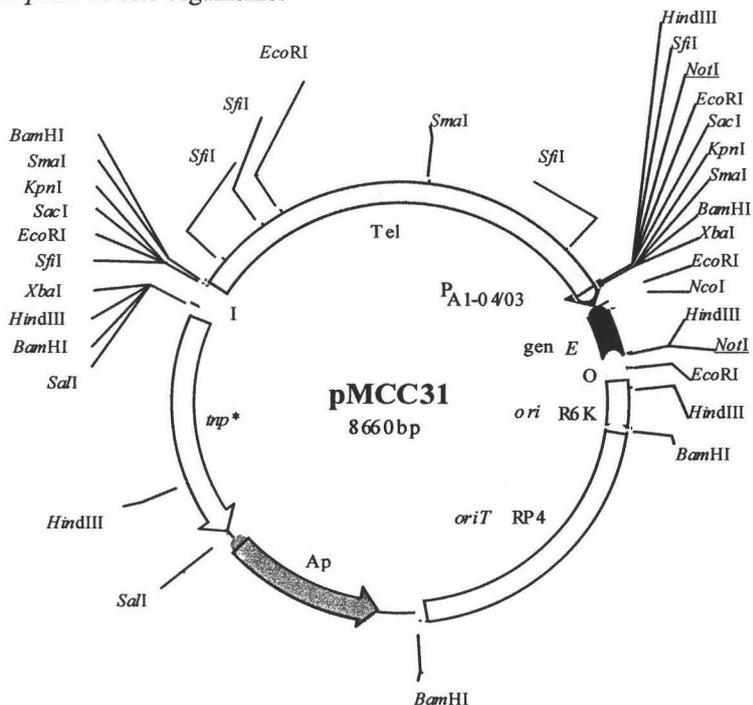
**pMCC31:** plásmido derivado del vector pJMSB4 resultado de la clonación en el sitio único *NotI* de un fragmento que contenía la fusión transcripcional P<sub>A1-04/03</sub>:: gen *E* (Figura 16). El promotor P<sub>A1-04/03</sub> de origen sintético (Lanzer *et al.*, 1988) es reprimible por la proteína LacI e inducible por IPTG. La represión de este promotor por la proteína LacI es 7 veces superior que la represión ejercida sobre el promotor natural P<sub>lac</sub>, de la misma forma que su inducción por IPTG es 7 veces superior. El gen *E* del fago ΦX174 codifica un polipéptido de 91 aminoácidos que se inserta en las membrana citoplasmática y la membrana externa de bacterias gram-negativas produciendo un túnel transmembrana que desencadena una serie de acontecimientos que desembocan en la lisis celular (Witte *et al.*, 1990).

**pMP220:** plásmido derivado del vector pTJS75 (Schomidhauser *et al.*, 1985) perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP que porta el gen '*lacZ* desprovisto de promotor. La expresión del gen '*lacZ* a partir de promotores clonados delante del gen permite la medida de la expresión del promotor como actividad β-galactosidasa.

**pCK01:** plásmido de bajo número de copias y de amplio espectro de huesped derivado del vector pHSG575 (Takeshita *et al.*, 1987). Este plásmido confiere resistencia a cloramfenicol y presenta un sitio de clonación múltiple idéntico al del pUC18 pero flanqueado por dos sitios *NotI* dentro de la región que codifica el péptido α de LacZ.



**Figura 15. Plásmido pPC6.** Los sitios de restricción indicados son únicos. Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes. En blanco se muestra el gen de resistencia a ampicilina, en gris el gen *putP* de *S. typhimurium* y en negro el gen *putA* de este organismo.



**Figura 16. Plásmido pMCC31.** En el mapa se indican los sitios de restricción más relevantes, los orígenes de replicación y de transferencia, el gen de resistencia a ampicilina y el gen *tnp*. Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes. En negro se muestra el gen *E*, en gris oscuro el gen que codifica para la resistencia a la ampicilina y en gris claro el gen que codifica para la resistencia a telurito potásico.

## 5. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO.

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron los métodos que se describen a continuación, dependiendo del grado de pureza requerida y de la cantidad de ADN que se quisiera obtener, así como del tamaño del plásmido a aislar.

La cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó en agitación durante 10-14 h a su temperatura óptima en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes.

### 5.1. Método "Qiapreps".

El sistema "Qiapreps spin plasmid kit" (Qiagen, ref. 27104) se utilizó para la preparación rápida de ADN plasmídico libre de ARN, partiendo de un volumen de cultivo de 3 mL y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ADN plasmídico se empleó para reacciones posteriores de secuenciación y/o clonación.

### 5.2. Método de la lisis alcalina.

Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala y análisis tras una clonación se utilizó el método de la lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) con algunas modificaciones.

Se partió de un volumen de 1,5 mL de cultivo. Las células se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 2'. Tras eliminar el sobrenadante, éstas se resuspendieron en 100 µL de GTE y se incubaron durante 5' a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 µL de solución de lisis, se agitó el tubo suavemente por inversión y se incubó durante 5' en hielo. El lisado se neutralizó añadiendo 150 µL de tampón acetato sódico 3M pH 4,8 y, tras mezclar el tubo por inversión las proteínas, el ADN cromosómico y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12.000 x g durante 15' y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El sobrenadante se trató con un volumen de una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (v/v), para eliminar restos de proteínas, y nuevamente con un volumen de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en proporción (24:1) para eliminar restos de fenol. Posteriormente a la fase acuosa se añadieron 2 volúmenes de etanol puro frío, se incubó durante 30' a -20°C y se centrifugó a 12.000 x g durante 10'. Las sales del precipitado se lavaron con un volumen de etanol 70% (v/v) en H<sub>2</sub>O. Tras descartar el sobrenadante y secar el precipitado, éste se resuspendió en 35 µL de TE.

La composición de las soluciones empleadas en este procedimiento fue la siguiente:

**GTE:** glucosa, 50 mM; Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM; EDTA-Na<sub>2</sub>, 10 mM. La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

**Solución de lisis:** SDS 1% (p/v) y NaOH 0,2 N. Esta solución fue de preparación extemporánea a partir de soluciones madre de SDS al 10% (p/v) y 2 N de NaOH.

**Acetato sódico 3 M pH 4,8:** a 60 mL de una solución de acetato sódico 5 M se le añadieron 11,5 mL de ácido acético glacial y H<sub>2</sub>O hasta 100 mL. Cuando fue necesario, el pH se ajustó a 4,8 con ácido acético glacial. La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

**TE:** Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM y EDTA-Na<sub>2</sub>, 1 mM. Esta solución se esterilizó en el autoclave y se almacenó a 4°C.

## 6. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL.

Para la preparación de ADN total se utilizó una modificación del método descrito por Kado *et al.*, (1981). Brevemente, las células se cultivaron con agitación durante 10-14 h en medio LB, tras lo cual se recogieron 0,5-1 mL del cultivo por centrifugación a 17.000 x g durante 1'. Después de eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 400 µL de una solución que contenía EDTA 25 mM, sacarosa 20% (p/v) y Tris-HCl 25 mM pH 8,0, y se incubaron a 4°C durante 5'. A continuación, se añadieron 200 µL de una solución con SDS 2% (p/v) y NaOH 0,3 N, y el tubo se mezcló por inversión hasta que la lisis fue total. Posteriormente, se añadieron 0,1 volúmenes de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M y el tubo se volvió a mezclar. Tras centrifugar la mezcla a 17.000 x g durante 10', el ADN se extrajo con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La extracción se repitió tres veces. Finalmente, el ADN de la fase acuosa se precipitó añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se concentró por centrifugación a 17.000 x g durante 15'. El sedimento se lavó con 1 mL de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 17.000 x g durante 1'. El precipitado de ADN se secó a 37°C y se resuspendió en 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub>.

## 7. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS.

### 7.1. Transferencia por conjugación.

La conjugación bacteriana se utilizó para la transferencia de ADN plasmídico desde *E. coli* a cepas de *Pseudomonas*. El sistema utilizado fue el denominado

“triparental”. En este sistema de cruce, las funciones de transferencia (*tra*) son aportadas en *trans* por un plásmido auxiliar autotransferible (pRK600), el cual moviliza el plásmido en cuestión; de esta forma, la bacteria portadora del plásmido auxiliar también forma parte del cruce (de Lorenzo *et al.*, 1990). Este sistema implica que las cepas donadora y receptora, así como la cepa auxiliar, deben estar marcadas adecuadamente con resistencias a antibióticos o con capacidades metabólicas específicas que permitan la selección de los transconjugantes y la contraselección de donadores, receptores y cepa auxiliar.

Se partió de cultivos de las cepas donadora y receptora del plásmido en cuestión, así como de la cepa portadora del plásmido auxiliar, que habían sido cultivadas a 30°C en agitación durante 10-14 h. Se recogieron aproximadamente  $10^8$  células de cada cultivo por centrifugación a 12.000 x g durante 1'. Las células sedimentadas se lavaron 2 veces con 1 mL de medio 1xM9, posteriormente, se mezclaron y se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 1'. A continuación, se resuspendieron en 50 µL de 1xM9 y la suspensión bacteriana se depositó sobre un filtro de nitrocelulosa estéril de 0,22 µm de diámetro de poro colocado sobre la superficie de una placa de LB sólido, incubándose a 30°C entre 4 y 12 h. Transcurrido este tiempo, el filtro con las células se colocó en un tubo con 5 mL de medio 1xM9, y las células se resuspendieron por agitación. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas en el mismo medio y se sembraron placas de medio selectivo para los transconjugantes y los parentales. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de los transconjugantes. Las cepas donadora, receptora, y auxiliar, se sometieron individualmente al mismo tratamiento y se sembraron en placas del mismo medio selectivo, sirviendo de esta manera como controles negativos de la conjugación. La frecuencia de transferencia del plásmido se expresó como el número de transconjugantes por receptor.

## 7.2. Transformación mediante choque térmico.

El método utilizado para la preparación de células competentes de *E. coli*. y su posterior transformación fue descrito por Inoue *et al.*, (1990). Con este método se obtuvieron frecuencias de transformación mayores de  $1 \times 10^7$  transformantes/µg de ADN de pBR322.

### **7.3. Transformación por electroporación.**

La transformación de células de *Pseudomonas* se realizó mediante el método de Enderle *et al.*, (1998). Para ello se partió de un cultivo de *Pseudomonas* en medio sólido crecido a 30°C durante 10-14 h. De este cultivo se tomaron con el asa de siembra 3 mg de células evitando arrastrar el agar del medio y se resuspendieron en 500 µL de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Las células de la mezcla homogénea se recogieron por centrifugación a 12.000 x g, tras lo que se eliminó el sobrenadante y el sedimento se volvió a lavar en 500 µL de H<sub>2</sub>O destilada estéril en las mismas condiciones. Posteriormente las células se resuspendieron en 40 µL de H<sub>2</sub>O destilada estéril momento a partir del cual todas las operaciones se realizaron en hielo. A las células preparadas según se ha descrito se les añadieron entre 5 y 15 ng de ADN libre de sales. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 1 mm de anchura donde recibieron un pulso eléctrico de 1800 voltios en un electroporador modelo Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad, ref. 165-2098). Tras el pulso las células se resuspendieron en 1 mL de LB a temperatura ambiente y la suspensión se incubó 1 hora a 30°C. Entonces la suspensión se diluyó seriadamente en medio M9 y las células se sembraron en placas de medio selectivo para la selección de los transformantes.

## **8. TÉCNICAS COMUNES DE MANIPULACIÓN DE ADN Y ARN.**

### **8.1. Determinación de la concentración de ADN y ARN.**

Para estimar la concentración de ADN de una solución se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

La absorbancia de la solución de ADN o ARN se determinó a 260 nm y 280 nm, frente a un blanco de H<sub>2</sub>O o TE dependiendo del disolvente utilizado en la disolución del ácido nucleico. La concentración de ADN o ARN de la muestra se calculó respecto al valor estándar de  $A_{260}=1$  para soluciones con 50 µg/mL de ADN de cadena doble o 40 µg/mL de ARN. La relación  $A_{260}/A_{280}$  se utilizó para estimar el grado de pureza de la preparación, de forma que valores de esta relación por debajo de 1,8 se consideraron indicadores de contaminación por proteínas y/o fenol.

## **8.2. Restricción de ADN.**

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima fijadas por el fabricante. Las reacciones contenían habitualmente entre 0,1 y 5  $\mu\text{g}$  de ADN, 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente suministrado por la casa comercial (10 veces concentrado), y 0,5-10 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-30  $\mu\text{L}$  completados con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada estéril. Las digestiones de plásmidos se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2-4 h a la temperatura indicada por el fabricante, mientras que las restricciones de ADN total se incubaron durante 12-16 h.

Las restricciones parciales de ADN cromosómico se realizaron según el método descrito por Ausubel *et al.* 1999.

## **8.3. Defosforilación de ADN con fosfatasa alcalina.**

Con objeto de aumentar la eficiencia de clonación, rutinariamente se defosforilaron los vectores con fosfatasa alcalina de gamba ártica. Para ello el ADN plasmídico previamente linearizado con la/s enzima/s de restricción adecuada/s se mezcló con 0,1 volúmenes del tampón suministrado por el fabricante, y de 0,1 a 0,5 unidades de fosfatasa alcalina de gamba ártica (USB. Amersham, ref. 70092), por cada 1 pmol de extremos de ADN. Tras la incubación a 37°C de la mezcla durante 1 hora la fosfatasa se inactivó por calor, incubando la mezcla de reacción 15' a 65°C.

## **8.4. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa.**

### **8.4.1. Electroforésis de ADN.**

La separación y visualización tanto de plásmidos completos, como de fragmentos de ADN originados por la digestión con enzimas de restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Por cada 5  $\mu\text{L}$  de muestra a analizar se añadió 1  $\mu\text{L}$  de tampón de carga, y esta mezcla se depositó en un pocillo del gel de agarosa al 0,8% (p/v) en TAE, sumergido en una cubeta con el mismo tampón. Cuando el fragmento de ADN era inferior a 0,5 kb, la concentración de agarosa en el gel fue de 1,5% (p/v). La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 5-10 V/cm.

Las moléculas de ADN se tiñeron por inmersión en una solución con bromuro de etidio (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 10 min. Tras lavar en agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio, el ADN se visualizó mediante exposición del gel a luz ultravioleta (254 nm).

El tamaño de los fragmentos se estimó por interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando como patrón los fragmentos del ADN del fago  $\lambda$  cortado con los enzimas de restricción *HindIII*, *HindIII/EcoRI* o *BstEII*. Las imágenes se recogieron con una video-cámara acoplada a una impresora térmica, empleando el equipo "gelprinter" de la casa comercial TDI (Madrid).

La composición de los tampónes y soluciones empleados en este procedimiento fue la siguiente:

**Tampón TAE:** Tris-base, 4,84 g; ácido acético glacial, 1,14 mL; EDTA- $\text{Na}_2$  0,5 M pH 8, 2 mL y  $\text{H}_2\text{O}$  hasta 1 litro. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en el autoclave.

**Tampón de carga:** glicerol, 30% (v/v), azul de bromofenol, 0,3% (p/v) y xilencianol 0,3% (p/v).

Los marcadores de peso molecular se prepararon de la siguiente forma: se digirieron 80  $\mu\text{L}$  de ADN del fago  $\lambda$  (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con 1,5 unidades de los enzimas *HindIII* y/o *EcoRI* por  $\mu\text{g}$  de ADN en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  del tampón correspondiente. Una vez digerido, se calentó a 80°C para separar las regiones *cos* de  $\lambda$ , y a la reacción se añadieron finalmente 80  $\mu\text{L}$  de tampón de carga, completándose el volumen hasta 400  $\mu\text{L}$  con TE, de forma que la concentración final de ADN en la solución fue de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### 8.4.2. Electroforesis de ARN.

Las muestras de ARN se separaron y visualizaron, en aquellos casos en que fue necesario, de la misma forma que la descrita para el ADN con las variaciones siguientes: todo el material de electroforesis se enjuagó previamente en SDS al 1% (p/v) y se aclaró con una solución autoclavada 1:1000 de DEPC en  $\text{H}_2\text{O}$ . El tampón TAE se preparó por dilución del 50 veces concentrado (descrito en la sección anterior) en solución autoclavada 1:1000 de DEPC en  $\text{H}_2\text{O}$ . La concentración de la agarosa en el gel fue de 1,5% (p/v) en lugar de 0,8% (p/v) y se acompañó de 0,1% (p/v) de SDS. Todo el material de vidrio para preparar estas soluciones se trató previamente con cloroformo para eliminar posibles contaminaciones de RNasas.

### 8.5. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Una vez identificado en el gel de agarosa el fragmento de ADN que se quería recuperar, se cortó el trozo de agarosa del gel que contenía el fragmento con ayuda de un bisturí, y se extrajo del mismo utilizando el sistema comercial Quiaex II (Qiagen ref. 20021) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 8.6. Ligación de ADN.

Para la ligación de moléculas de ADN se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. El vector linearizado y el fragmento de ADN obtenidos por digestión con una o varias restrictasas y purificado (según se indica en el **apartado 8.5**), se mezclaron en una proporción adecuada y se añadió 0,1 volúmenes de tampón de ligación (suministrado por el fabricante) y 1 unidad de ADN-ligasa del fago T4 en un volumen final de 15-20 $\mu$ L completados con H<sub>2</sub>O miliQ. La mezcla se incubó a 14°C durante 8-14 h, tras lo que se introdujo en la cepa adecuada por los métodos descritos en los **apartados 7.2 ó 7.3** de esta sección de *Materiales y Métodos*.

## 9. SECUENCIACIÓN DE ADN.

La secuenciación de ADN plasmídico se realizó tanto de forma manual como automática. Para la secuenciación manual se siguió tanto la versión original de las instrucciones del sistema comercial "T7 Sequencing Kit" (Pharmacia P-L Biochemicals, ref. 27-1682-01), basado en el método de Sanger *et al.*, (1977), usando [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP y la ADN polimerasa del fago T7, como una variación de este sistema en el que en lugar de usar [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP se utilizó 5-10 pmoles de cebador previamente marcado con 10<sup>5</sup> cpm en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (según se describe en el **apartado 12** de *Materiales y Métodos*), y en la que a la reacción de marcaje se le añadió 16  $\mu$ M de dATP frío (esta reacción de secuenciación se utilizó como patrón de peso molecular en las determinaciones de los orígenes de transcripción mediante análisis de extensión a partir de cebador). La secuenciación automática se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra del CSIC en Granada, utilizando un aparato Applied Biosystems (modelo 373 STRECHT), así como en el servicio de secuenciación automática del Grupo de Degradación de

Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC en Granada, utilizando el secuenciador ABI PRISM™ (modelo 310) de Perkin Elmer. El método de secuenciación fue el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISM™ Dye Terminator que utiliza en la reacción de extensión el enzima comercializado como "Ampli Taq DNA Polymerase" (ref. 402122), y emplea dideoxinucleótidos marcados diferencialmente con cromóforos fluorescentes.

Los cebadores empleados para la secuenciación del ADN a lo largo de esta tesis se detallan a continuación (Tabla 3) junto a su secuencia:

Tabla 3. Cebadores usados para la secuenciación de fragmentos de ADN.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Nombre	Secuencia (5' → 3')
U-21 (17-mer)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	12U <sub>1</sub>	5'-CACCACTTCTGCTCGGGGC-3'
Rev (21-mer)	5'-CAGGAAACAGCTATGACCATG-3'	4R <sub>1</sub>	5'-AAGCCGCACTGACCGAGCAC-3'
12R <sub>5</sub>	5'-ATCGGCATTCAGGCGCTTAA-3'	4R <sub>2</sub>	5'-GCCAAGCGCACCCCCACCG-3'
12R <sub>6</sub>	5'-TGGAAGGCGTGACGATAGTT-3'	4RU <sub>2</sub>	5'-CGGTGGGGGTGCGCTTGGC-3'
12RU <sub>3</sub>	5'-AACTATCGTCACGCCTTCCA-3'	4R <sub>3</sub>	5'-TTCCATCCAGGAACTGGTGC-3'
12U <sub>8</sub>	5'-AATTGGCGGCGCTGCTTTG-3'	4UR <sub>1</sub>	5'-ACGCCATTGCCGAAGTGC GT-3'
12R <sub>7</sub>	5'-CCACAGGATCACCGTCAGCC-3'	4U <sub>1</sub>	5'-ACGCACTTCGGCAATGGCGT-3'
12UR <sub>4</sub>	5'-GGCTGACGGTGATCCTGTGG-3'	PutA <sub>3</sub>	5'-CCGGTTCGGACGGCTCGTTT-3'
12UR <sub>3</sub>	5'-GAAGCATTCTTGCGCAGGAA-3'	SU <sub>2</sub>	5'-CGTTGCTGGCCGTCTGGACAACC-3'
12U <sub>6</sub>	5'-TTCCTGCGCAAGAATGCTTC-3'	SU <sub>5</sub>	5'-CCTTGAGCATCTCGATTACG-3'
12U <sub>5</sub>	5'-CTTCTCGGCCATCCTGAGC-3'	SU <sub>4</sub>	5'-GCAACATGTCGTAACCCG-3'
12UR <sub>4</sub>	5'-GGTGCCTGACGGTGATCCTGTG-3'	SU <sub>7</sub>	5'-CACCTGTTAGTCCAGCCCC-3'
12U <sub>4</sub>	5'-CGTGCTGATCTCCACCGTG-3'	SU <sub>8</sub>	5'-GCGACTCGGACCAGCTGCGC-3'
12U <sub>3</sub>	5'-GGGTGGTCGACGCTGGGTA-3'	SU <sub>9</sub>	5'-GGGGCTGGACTAACAGGTGC-3'
12U <sub>2</sub>	5'-CGGGTGCAACCAGGTGCAAC-3'	If	5'-AGATCTGATCAAGAGACAG-3'

## 10. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.

Para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos (determinación de las fases de lectura abierta, de los sitios de restricción, uso de codones, perfiles de hidropatía, composición de aminoácidos, etc.) se emplearon los programas informáticos DNA Strider v. 1.1 (Marck, 1988) y SeqEd v. 1.0.3 (Applied Biosystems, Inc., 1992).

Para el diseño y análisis de oligonucleótidos (para secuenciación y PCR) se utilizaron los programas informáticos OLIGO v. 4.05 (W. Rychlik, National

Biosciences, Inc., 1992) y Amplify v. 2.52 $\beta$  (B. Engels, University of Wisconsin, 1996). Para la estimación de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos se usó el programa "Tm determination" (Breslauer *et al.*, 1986) disponible en Internet (**Tabla 4**) que, además de la composición de bases, también tiene en cuenta su secuencia.

La comparación de nuevas secuencias (de nucleótidos y aminoácidos) con las distintas bases de datos, se realizó con la ayuda de los programas BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponible en el servidor de Internet del NCBI, y FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988) disponible en el servidor de Internet del EMBL-EBI (**Tabla 4**). La base de datos TIGR BLAST contiene, entre otros, el genoma completo de *P. putida* KT2440 que se usó para la obtención de secuencias adyacentes a secuencias conocidas. Para la predicción de regiones transmembrana se usó el programa TMPred, disponible en el servidor de Internet del ISREC (**Tabla 4**). La predicción de péptidos señal y de su sitio de corte se realizó con ayuda del programa SignalP v. 1.1 (Nielsen *et al.*, 1997) disponible en el servidor de Internet del CBS (**Tabla 4**). El alineamiento de secuencias peptídicas se realizó con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) disponible en el servidor de Internet del PBIL (**Tabla 4**). Con todos estos programas se usaron las opciones estándar. Los alineamientos obtenidos se trataron con el programa GeneDoc v. 2.5 (K.B. Nicholas y H.B. Nicholas, 1997) que, además de generar secuencias consenso para los alineamientos, permite colorear o dar sombreado a los aminoácidos en función de su identidad o similitud.

**Tabla 4. Direcciones de Internet de los programas usados en esta tesis.**

Programa	Dirección
Tm determination	<a href="http://alces.med.umn.edu/rawtm.html">http://alces.med.umn.edu/rawtm.html</a>
BLAST	<a href="http://ulrec3.unil.ch/software/WUBLAST_form.html">http://ulrec3.unil.ch/software/WUBLAST_form.html</a>
FASTA3	<a href="http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/">http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/</a>
TIGR BLAST	<a href="http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?">http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi?</a>
TMPred	<a href="http://www.isrec.isb-sib.ch/software/TMPRED_form.html">http://www.isrec.isb-sib.ch/software/TMPRED_form.html</a>
SignalP V1.1	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
Clustal W	<a href="http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html">http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html</a>

## 11. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN EN CADENA CON ADN POLIMERASA TERMORRESISTENTE (PCR).

La reacción de amplificación en cadena con una ADN polimerasa termorresistente se llevó a cabo en aquellos casos en que se deseó obtener fragmentos de ADN para su posterior clonaje o secuenciación y en aquellos casos en que fue necesaria la comprobación de la existencia de un fragmento de ADN determinado. La reacción de amplificación incluyó: ADN molde, 0,2 ng de ADN cromosómico o 10 pg de ADN plasmídico; cebadores, 50-100 pmoles; tampón Taq ADN-polimerasa (KCl, 50 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM; Tris-HCl, 10 mM pH 9); dNTPs, 100-200 μM de cada uno; Taq ADN-polimerasa, 0,5 U/100 μL; H<sub>2</sub>O hasta 100 μL. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 3', se realizaron 25 ciclos de 1' a 94°C, 1 minuto a la temperatura de hibridación adecuada para cada pareja de cebadores y 1' por cada 2 kb de ADN a extender a 72°C, seguido al final de los 25 ciclos de una extensión de 10' a 72°C. La temperatura de hibridación se varió en función de la temperatura de fusión de los cebadores utilizados. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria se combinaron distintas modificaciones en la concentración de MgCl<sub>2</sub> (incrementándola a 3 ó 4,5 mM) y/o la presencia de ciertos compuestos en la mezcla de reacción, como por ejemplo glicerol al 10% (v/v) o DMSO al 5% (v/v). Ocasionalmente, el producto obtenido tras la amplificación se purificó utilizando el sistema comercial "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN, ref. 28104) para eliminar los cebadores y los dNTPs.

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación con ADN polimerasa termorresistente se detallan en la **Tabla 5**.

**Tabla 5. Cebadores usados para la amplificación de fragmentos de ADN.**

Nombre	Secuencia (5' → 3')
AEco	5'-TTACGAATTCTGCTTTGAGTCGCTCACG-3'
PEco	5'-TTACGAATTCGGATGTAGATCACGAAGG-3'
PBam	5'-CTGAGGATCCCCGATGTAGATCACGAAGG-3'
ABam	5'-TGAGGATC CTGCTTTGAGTCGCTCACG-3'
LacI3	5'-CCTGTCTAGACTCCTAATGAGTGAGCTA-3'
LacI5	5'-CCGGAAGGGATCCAATTCAGGGTGGTGAAT-3'
OslacZ	5'-GATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG-3'

La reacción de PCR también se utilizó para la selección de un plásmido recombinante de entre un conjunto de candidatos potenciales. En este caso se utilizó una variación del método anteriormente descrito llamado PCR de colonia. En este método la mezcla de reacción fue similar a la descrita anteriormente con la excepción de que el ADN cromosómico o plasmídico se sustituyó por la biomasa procedente de una colonia recogida directamente de la placa de transformación. La mezcla de reacción se sometió a las condiciones estándar de reacción anteriormente citadas para que diera lugar la amplificación del fragmento deseado tras la lisis de las células producida por el uso de temperaturas elevadas.

## **12. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE CEBADOR.**

La técnica conocida como extensión reversa a partir de cebador o “primer extension” se utilizó en aquellos casos en los que se deseaba determinar el punto de iniciación de la transcripción o el nivel de expresión de un gen. Básicamente consiste en la extensión a partir de un cebador antiparalelo a la región codificante de un gen usando como molde el ARN mensajero del mismo. En esta técnica se distinguen distintos pasos cuya metodología se detalla a continuación.

### **12.1. Extracción de ARN.**

La extracción de ARN y su análisis posterior se llevó a cabo según el método descrito por Chomczynski *et al.*, (1987) y Sambrook *et al.*, (1989), modificado por Marqués *et al.*, (1993).

Para la preparación de ARN se tomaron distintas fracciones alícuotas de un cultivo en tubos previamente enfriados en nitrógeno líquido. Las células se recogieron por centrifugación a 2500 x g a 4°C durante 15' y se congelaron a -80°C hasta la extracción del ARN. Para la preparación del ARN se añadieron 1,4 mL de solución de lisis, mezcla que se agitó vigorosamente con los sedimentos de cada muestra, tras lo cual se incubó a 60°C durante 10', sometiendo la mezcla a agitación periódica durante este tiempo. Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 0,28 mL de cloroformo, agitándose de nuevo para homogenizar la muestra. Se centrifugó a 10000 x g en frío durante 10', y la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio a la que se añadió 0,66 mL de isopropanol frío, que tras mezclar se incubó a -20°C durante 15'. Los ácidos

nucleicos se recogieron por centrifugación a 12000 x g durante 15', y el sedimento se lavó con etanol al 70%. Una vez seco se resuspendió en 75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>.

El ADN de la muestra se eliminó mediante tratamiento con DNasaI de páncreas bovino, para lo cual se añadieron 25 $\mu$ L de una mezcla de DNasaI a una concentración de 0,4 U/ $\mu$ L a los 75 $\mu$ L de ácidos nucleicos anteriormente extraídos. Este tratamiento se realizó durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se añadieron 110  $\mu$ L de proteinasa K de *Tritirachium album* a 0,02U/ $\mu$ L para eliminar las proteínas presentes en las muestras. La mezcla se incubó 1 hora a 37°C, tras lo cual se realizaron dos extracciones consecutivas con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y con cloroformo:alcohol isoamílico respectivamente. El ARN presente en la fase acuosa de esta última extracción se precipitó añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 2 volúmenes de etanol frío. Tras mantener la mezcla durante 30' a -80°C se centrifugó a 12000 x g durante 15' y el sedimento se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>. La concentración de ARN de la solución resultante se cuantificó espectrofotométricamente según se describe en el **apartado 8.1** de *Materiales y Métodos*.

La composición de los tampónes y soluciones empleados en este procedimiento fue la siguiente:

**H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>**: Solución resultante al autoclavar una solución 1:1000 de DEPC comercial en H<sub>2</sub>O, tras incubarla al menos 60' a temperatura ambiente.

**Solución D**: Guanidinium isotiocianato, 4M; citrato sódico, 25 mM; N-lauril sarcosina 0,5% (p/v), en H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> hasta 50 mL. Una vez disuelta la mezcla, se esterilizó en el autoclave y se le añadieron 0,36 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Solución de lisis**: Solución D, 20 mL; acetato sódico 2M pH 4, 2 mL; fenol saturado en H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>, 20 mL.

**Fenol saturado en H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>**: Este reactivo se prepara mezclando por agitación fenol con H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>. Tras la separación de las dos fases se repite el proceso dos veces más.

**Mezcla de DNasaI**: RNase inhibitor, 20 U (inhibidor de RNasas); DTT (ditiotreitól) 0,1M, 1  $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub> 1M, 1  $\mu$ L; DNasa I (libre de RNasa) 10 U, H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> hasta 25  $\mu$ L.

**Mezcla de Proteinasa K**: Tris 0,2 M pH 7/NaCl 0,1 M, 100  $\mu$ L; SDS 10%, 4  $\mu$ L, EDTA 0,5 M pH 8, 4  $\mu$ L, Proteinasa K (libre de RNasa), 2,4 U.

Todas las disoluciones empleadas en la preparación de las soluciones anteriores, salvo las que llevan Tris, se prepararon en una solución 1:1000 de DEPC en H<sub>2</sub>O, y tras 1 hora de incubación el DEPC se inactivó mediante autoclavado.

### 12.2. Marcaje de cebadores.

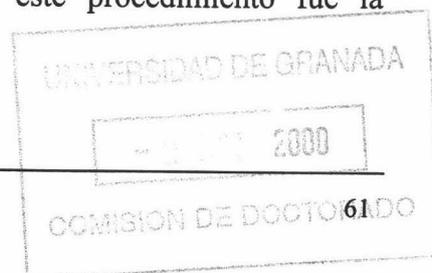
Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se marcaron por fosforilación en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Cada reacción contenía en un volumen final de 10  $\mu$ L, 1  $\mu$ L de tampón de polinucleótido quinasa 10 veces concentrado, 10 pmoles de oligonucleótido, 1  $\mu$ L de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (>3.000 mCi/mmol) y 1 unidad de polinucleótido quinasa del fago T4. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 1 hora tras lo cual la quinasa se eliminó tratando la mezcla con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El exceso de nucleótido radiactivo se eliminó por filtración forzada a través de una columna rellena con gel Sephadex G-25.

**Tampón de polinucleótido quinasa 10 veces concentrado:** TrisClH 0,5 M pH 7,6; MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M; DTT, 50 mM; spermidina 1 mM; EDTA, 1 mM.

### 12.3. Reacción de extensión.

Los cebadores complementarios a las cadenas de ARN de los genes en estudio se muestran en la **Tabla 6** los cuales hibridan con secuencias próximas al extremo 5' de los ARNm de los genes en estudio, generalmente dentro de la región codificante. Para la hibridación de los oligonucleótidos marcados con las cadenas de ARN se mezclaron 2  $\mu$ L de tampón de hibridación, 10<sup>5</sup> cpm del oligonucleótido marcado y 10-60  $\mu$ g de ARN total en un volumen final de 10  $\mu$ L. La mezcla se incubó a 85°C durante 5' y entonces se transfirió a un baño a 65°C que se dejó enfriar hasta 45°C. La reacción de extensión se realizó añadiendo 40  $\mu$ L de tampón de transcriptasa reversa que contenía 1 mM de cada uno de los 4 desoxinucleótidos, 20 U de RNase Inhibitor, 3  $\mu$ g de Actinomicina D y 7 U de transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de ave. La mezcla se incubó a 44°C durante 1 hora tras lo cual la reacción se detuvo por la adición de 5  $\mu$ L de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 150  $\mu$ L de etanol.

La composición de las soluciones utilizadas en este procedimiento fue la siguiente:



**Tampón de hibridación:** NaCl, 2 M y piperacina-N,N'-bis(2-etanosulfonato) (PIPES) 50 mM; pH 7.

**Tampón de transcriptasa reversa:** Tris-HCl 12,5 mM, pH 8,2; ditioneitol (DTT), 10 mM; MgCl<sub>2</sub>, 6 mM.

**Tabla 6. Oligonucleótidos usados para la extensión reversa a partir de cebador.**

Nombre	Secuencia (5'→3')
12U <sub>1</sub>	5'-CACCACTTCCTGCTCGGGG-3'
PESP	5'-GGCGATCCAGGCCTCGGACAGCCCCG-3'
LacI4	5'-AAACGGTCTGATAAGAGAGACCGGC-3'

#### 12.4. Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis.

Las reacciones de extensión se precipitaron por centrifugación a 12.000 x g durante 15', se lavaron con etanol al 70% y se resuspendieron en 6 µL de TE y 3 µL de tampón de carga con formamida. La separación de las cadenas con distinta longitud se llevó a cabo mediante electroforesis en geles (40 x 20 cm) desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% (p/v) en TBE, a potencia fija de 40 W y voltaje variable entre 1.500 y 2.000 V.

Una vez finalizada la separación, el gel se transfirió a un papel Whatman 3MM, se cubrió con plástico transparente y se secó al vacío en un secador Bio-Rad a 80°C durante 20'. El gel se autorradiografió en una película Amersham Hyperfilm-MP durante al menos 24 h a -80°C. La película se reveló utilizando métodos estándar.

Alternativamente el gel se cuantificó mediante un Molecular Imager modelo GS-525 (Bio-Rad).

La composición de las soluciones utilizadas fue la siguiente:

**TBE:** Tris-base, 4,84 g; ácido acético glacial, 1,14 mL; EDTA-Na<sub>2</sub> 0,5 M, pH 8,0, 2 mL; H<sub>2</sub>O hasta 1 litro.

**Solución concentrada de acrilamida al 40% (p/v):** acrilamida, 38 g; N,N'-metilenebisacrilamida, 2 g y H<sub>2</sub>O hasta 100 mL. Esta solución se filtró a través de una membrana de nilón mediante vacío. La solución filtrada se almacenó en oscuridad a 4°C.

**Acrilamida desnaturalizante 6% (p/v):** acrilamida 40% (p/v), 9 mL; urea, 25,2 g; TBE (5 veces concentrado), 12 mL y H<sub>2</sub>O hasta 60 mL.

Para catalizar la polimerización de la acrilamida se añadieron a la solución anterior, inmediatamente antes de verter el gel, 125 µL de persulfato amónico 10% (p/v) y 125 µL de TEMED.

El montaje de las placas de cristal de la unidad de electroforesis, una de las cuales había sido tratada con dimetil-dicloro-silano para evitar la adhesión del gel, se realizó conforme a las instrucciones del fabricante.

### **13. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA DE NILÓN CARGADA POSITIVAMENTE POR EL MÉTODO DE "SOUTHERN BLOT" E HIBRIDACIÓN.**

La técnica utilizada es la descrita en el libro de métodos "Current protocols in molecular biology" (Ausubel *et al.*, 1999).

#### **13.1. Transferencia de ADN por capilaridad.**

Las muestras de ADN cromosómico o plasmídico, digeridas con enzimas de restricción o sin digerir se separaron en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de nilón de 0,45 µm de diámetro de poro cargadas positivamente (Boehringer Mannheim, ref. 1417240), siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito por Reed *et al.*, (1985).

Después de la electroforesis el gel se sumergió en una solución 0,25 N de HCl durante aproximadamente 15' hasta que se produjo el viraje del azul de bromofenol de azul a amarillo, este tratamiento ácido permitió la introducción de mellas en el ADN y su depurinización del mismo lo que facilitó su transferencia. El ADN se desnaturalizó introduciendo el gel en una solución de NaOH 0,5 M, hasta que se observó de nuevo el viraje del indicador ahora de amarillo a azul.

Sobre un cristal, se colocó una tira de papel Whatman 3MM, del mismo ancho que el gel, de manera que los extremos quedasen sumergidos en la solución de transferencia (NaOH 0,5 M), colocada en un reservorio inferior. Sobre el papel se colocó el gel en posición invertida y sobre éste la membrana de nilón, posteriormente se depositaron tres tiras de papel Whatman 3MM previamente humedecidas en solución de transferencia, abundante papel absorbente y un peso de aproximadamente 0,5 Kg. De

esta forma la solución de transferencia ascendió por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó retenido. La transferencia total del ADN del gel a la membrana se llevó a cabo entre 6 y 12 h.

La membrana se lavó posteriormente en solución 2xSSC (Obtenida a partir de la solución 20xSSC) durante 5' permitiendo su neutralización y la eliminación de posibles restos de agarosa.

Las membranas se conservaron secas a temperatura ambiente selladas en bolsas de plástico hasta su utilización.

### **13.2. Marcaje no radiactivo de ADN lineal.**

El marcaje de la sonda con digoxigenina y la detección de los híbridos ADN-ADN se realizó utilizando el kit de Boehringer Mannheim (ref. 1093657). Las sondas de ADN se marcaron con digoxigenina-dUTP, mediante extensión con el fragmento Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli*, y utilizando como cebadores una mezcla aleatoria de hexanucleótidos. El marcaje de la sonda y su recuperación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

En algunos casos el marcaje de la sonda se hizo por PCR utilizando el kit comercial de Boehringer Mannheim "digoxigenina-11-dUTP" (ref. 1093088) que provoca una incorporación múltiple de dUTP marcado, ya que puede ser usado como sustrato por la Taq polimerasa, reemplazando al dTTP durante la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de reacción contenía: ADN molde, 0,05-1 µg; cebador 25 pmoles; tampón Taq ADN-polimerasa (10X) 5 µL; dNTPs: 0,2 mM de dATP, dCTP y dGTP; 0,18 mM de dTTP y 0,02 mM de dig-dUTP; Taq ADN-polimerasa 1,2 U y H<sub>2</sub>O hasta 50 µL. Para la amplificación se usó el método descrito en el apartado 11.

### **13.3. Prehibridación e hibridación.**

Una vez transferido el ADN a la membrana de nilón se realizó una prehibridación y una hibridación de la misma para lo cual se utilizó el horno de hibridación modelo Techne Hybridiser HB-1D (Cambridge). La composición de la solución de prehibridación fue la siguiente: 5xSSC; formamida, 50% (v/v); 0,02% (p/v) SDS; 5% (p/v) agente bloqueante (suministrado por el fabricante); H<sub>2</sub>O hasta 20 mL.

Tras 1 hora de prehibridación a 42°C con 20 mL de solución de hibridación por cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana, ésta se retiró parcialmente, manteniéndose 2,5 mL/100 cm<sup>2</sup>. Entonces, se añadieron 20-200 ng de sonda marcada y desnaturalizada, y

posteriormente se realizó la hibridación durante 6-15 h a 42°C. El lavado de las membranas se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 10' cada uno a temperatura ambiente en 2xSSC + 0,1% (p/v) de SDS y dos lavados de 15' a 68°C en 0,1xSSC + 0,1% (p/v) de SDS. Cuando se emplearon sondas heterólogas se omitieron los dos últimos lavados a 68°C, sustituyéndolos por dos lavados de 10' con 1xSSC + 0,1% (p/v) de SDS a temperatura ambiente.

Para las hibridaciones con sondas heterólogas se emplearon condiciones de hibridación relajadas, disminuyendo alternativamente la concentración de formamida en la solución al 30% (v/v) o la temperatura de hibridación a 28°C, o ambas simultáneamente.

#### 13.4. Reacción inmunológica.

Esta reacción se realizó según protocolo detallado por Boehringer Mannheim. Tras la hibridación, la membrana se lavó con 20 mL de tampón-1 y se incubó en 100 mL de tampón-2 durante 30'. A continuación se lavó con tampón-1 y se incubó durante 30' con 20 mL de solución de anticuerpo (anti-digoxigenina conjugado a la fosfatasa alcalina) diluido en tampón-1. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15' con 100 mL de tampón-1 para eliminar el anticuerpo que permaneció sin unirse. A continuación, la membrana se equilibró con 20 mL de tampón-3 durante 2' y finalmente se incubó con 10 mL de la solución colorante durante 1 a 20 h en oscuridad. La reacción se detuvo por adición de 50 mL de TE a la membrana durante 5'.

La composición de las soluciones utilizadas en este proceso fueron las siguientes:

**20xSSC:** NaCl, 3 M; citrato sódico 0,3 M; se ajustó a pH 7 con HCl 1 M.

**Tampón-1, pH 7:** Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM y NaCl, 150 mM.

**Tampón-2:** solución bloqueante 0,5% (p/v) en tampón-1.

**Tampón-3, pH 9,5:** Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM; NaCl, 100 mM y MgCl<sub>2</sub>, 50 mM.

**Solución de anticuerpo:** anticuerpo anti-dioxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, preparado en 20 mL de tampón-1 a concentración final de 150 mU/mL.

**Solución colorante:** solución de azul de nitrotetrazolio (NBT); solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato 45 µL (BCIP), 35 µL y tampón-3 hasta 10 mL.

## **14. MUTAGÉNESIS.**

### **14.1. Mutagénesis por transposición.**

El funcionamiento y el mecanismo básico de mutagénesis utilizando minitransposones se detalla en el **apartado 4** de la sección de *Materiales y Métodos*. Para la obtención de mutantes en el metabolismo de la prolina se usó el minitransposón miniTn5KmluxAB contenido en el plásmido pCK220. La introducción del plásmido pCK220 en cepas de *P. putida* se realizó mediante conjugación tripartita entre cepas de *P. putida* KT2442 como receptora, *E. coli* CC118 $\lambda$ pir como donadora y *E. coli* HB101 (pRK600) como cepa auxiliadora tal y como se indica en el **apartado 7.1** de la sección de *Materiales y Métodos*. Tras la conjugación, los transconjugantes se seleccionaron en placas de medio mínimo M9 con 10 mM de benzoato como fuente de carbono con cloramfenicol y kanamicina. De los transconjugantes seleccionados se descartaron aquellos que además fueron resistentes a piperacilina los cuales aparecían a baja frecuencia como consecuencia de la integración del plásmido completo en el cromosoma de la célula huésped y no eran pues, el resultado de un verdadero hecho de transposición. Para la selección de los mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina, se ensayó el crecimiento de los transconjugantes obtenidos en placas de medio mínimo M8 con 20 mM de prolina y en placas de M9 con 20 mM de glucosa. Se seleccionaron aquellos clones capaces de utilizar la glucosa como fuente de carbono pero que fueron deficientes en la utilización de la prolina.

### **14.2. Mutagénesis al azar *in vitro*.**

Para la obtención de fragmentos de ADN con una secuencia alterada con respecto a la secuencia de ADN silvestre se utilizó la técnica de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente en las condiciones mutagénicas descrita por Leung *et al.*, (1989). La amplificación de los fragmentos se realizó de forma similar a la descrita en el **apartado 11** de los *Materiales y Métodos* con la excepción de que a la mezcla de reacción se le añadió MgCl<sub>2</sub> para alcanzar una concentración final 6.1 mM y 0,5 mM de MnCl<sub>2</sub>. Además los desoxirribonucleótidos dTTP, dCTP, dGTP se adicionaron a una concentración final de 1 mM mientras que el desoxirribonucleótido dATP se adicionó a una concentración final de 200  $\mu$ M. Las condiciones de amplificación fueron idénticas a las descritas en el **apartado 11**.

## 15. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA.

La medida de actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizó según el método descrito por Miller (1972) en células permeabilizadas. Este método se basa en una reacción colorimétrica en la que el *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la  $\beta$ -galactosidasa, es hidrolizado por la enzima rindiendo galactosa y *o*-nitrofenol, un compuesto de color amarillo cuya concentración se determinó espectofotométricamente. La composición de las soluciones utilizadas en este procedimiento aparecen al final de este apartado.

Se partió de células cultivadas a 30°C con agitación durante 12-16 h en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Ciento cincuenta microlitros de estos cultivos se diluyeron en 4 mL de medio fresco y se incubaron a 30°C durante 3 h momento en el que a las células se les añadió el inductor adecuado. Tras un 2 h de incubación, 20  $\mu$ L del cultivo se mezcló con 20  $\mu$ L de una solución del detergente bromuro de alquil-trimetil-amonio (MATAB) con objeto de permeabilizar las células. Esta mezcla se incubó en hielo durante 20'.

La determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizó a 30°C en tampón Z. A la mezcla con las células permeabilizadas se añadieron 0,8 mL de tampón Z y 0,2 mL de solución de ONPG. Los tubos de reacción se incubaron a 30°C hasta la aparición de color (de 2 a 30'). La reacción se detuvo añadiendo 2 mL de una solución 0,5 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La concentración de *o*-nitrofenol se estimó espectofotométricamente determinando su absorbancia a 420 nm. Para cada muestra se realizó además una medida a 550 nm para corrección de la turbidez y se determinó también la densidad celular de los cultivos utilizados en los ensayos midiendo su turbidez a 660 nm.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa expresada en unidades Miller se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{A_{420} - 1,7 \times A_{550}}{t \times V \times \text{D.O. } 660 \text{ nm}} \times 1.000$$

donde t representa el tiempo de reacción en minutos y V el volumen de células permeabilizadas en mL utilizadas en la reacción.

Las soluciones empleadas en este ensayo se conservaron a 4°C y su composición fue la siguiente:

**Solución de MATAB:** 20 mg de bromuro de alquil-trimetil-amonio en 10 mL de una solución 0,2 M de Tris-HCl pH 8.

**Tampón Z pH 7:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 60 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM; KCl, 10 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1 mM y β-mercaptoetanol, 50 mM. Esta solución es estable a 4°C.

**Solución de ONPG:** 40 mg de *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido se disolvieron en 10 mL de tampón fosfato 0,1 M pH 7. Esta solución es estable a 4°C en oscuridad.

Rutinariamente los ensayos de β-galactosidasa se realizaron por triplicado.

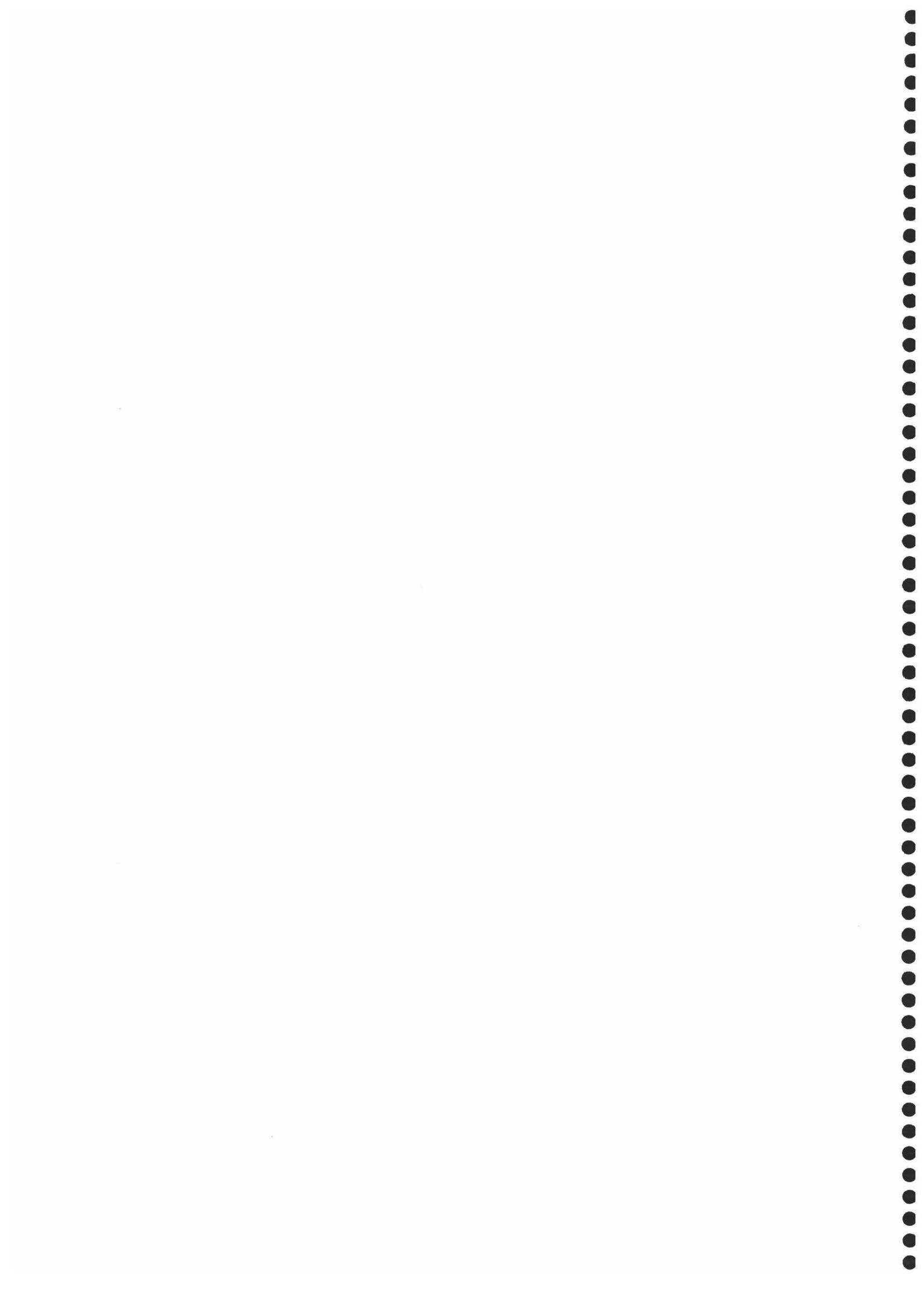
## 16. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLINA DESHIDROGENASA EN *P. putida* KT2440.

Para la determinación de la actividad prolina deshidrogenasa en células de *P. putida* se adaptó un método propuesto por Dendinger *et al.*, (1970) optimizado para determinar esta actividad en células de *Salmonella typhimurium*. Para ello, se partió de un cultivo de *P. putida* en el medio adecuado incubado durante 10-12 h el cual se diluyó en 10 mL del/los medio/s en estudio. Tras incubación a 30°C, las células en fase logarítmica tardía (turbidez próxima a 1) se centrifugaron a 2500 x g en una centrífuga de mesa (Beckman modelo GRP) durante 15 min. Tras descartar el sobrenadante las células se resuspendieron en 5 mL de tampón Tris-HCl 0,1 M pH 7 y se les añadió 50 μL de tolueno. Con objeto de obtener una permeabilización óptima esta suspensión bacteriana se agitó fuertemente durante 10'. La suspensión se centrifugó de igual forma que la anteriormente descrita y se lavó tres veces con 5 mL de tampón Tris-HCl 0,1 M pH 7 con objeto de eliminar completamente el tolueno. La mezcla de reacción para la determinación de la actividad prolina deshidrogenasa contenía 1 mL de células permeabilizadas, 1 mL de prolina 1M y 200 μL de una solución 0,05 M de *o*-aminobenzaldehído. Tras intervalos de tiempo de 5' se retiró una fracción alícuota de 150 μL a la que se le añadieron 150 μL de una solución de ácido tricloroacético al 10%. Diez minutos después de la adición del ácido tricloroacético la mezcla se centrifugó a 14000 x g durante 5' con objeto de eliminar la proteína precipitada. Posteriormente se determinó la absorbancia del sobrenadante a 443 nm con objeto de calcular la concentración de cromóforo producida en la reacción entre el *o*-aminobenzaldehído y la pirrolina-5'-carboxilato, utilizando un valor del coeficiente de extinción molar de dicho compuesto de 2.71 cm<sup>-1</sup> x mM<sup>-1</sup> (Strecker, 1965).

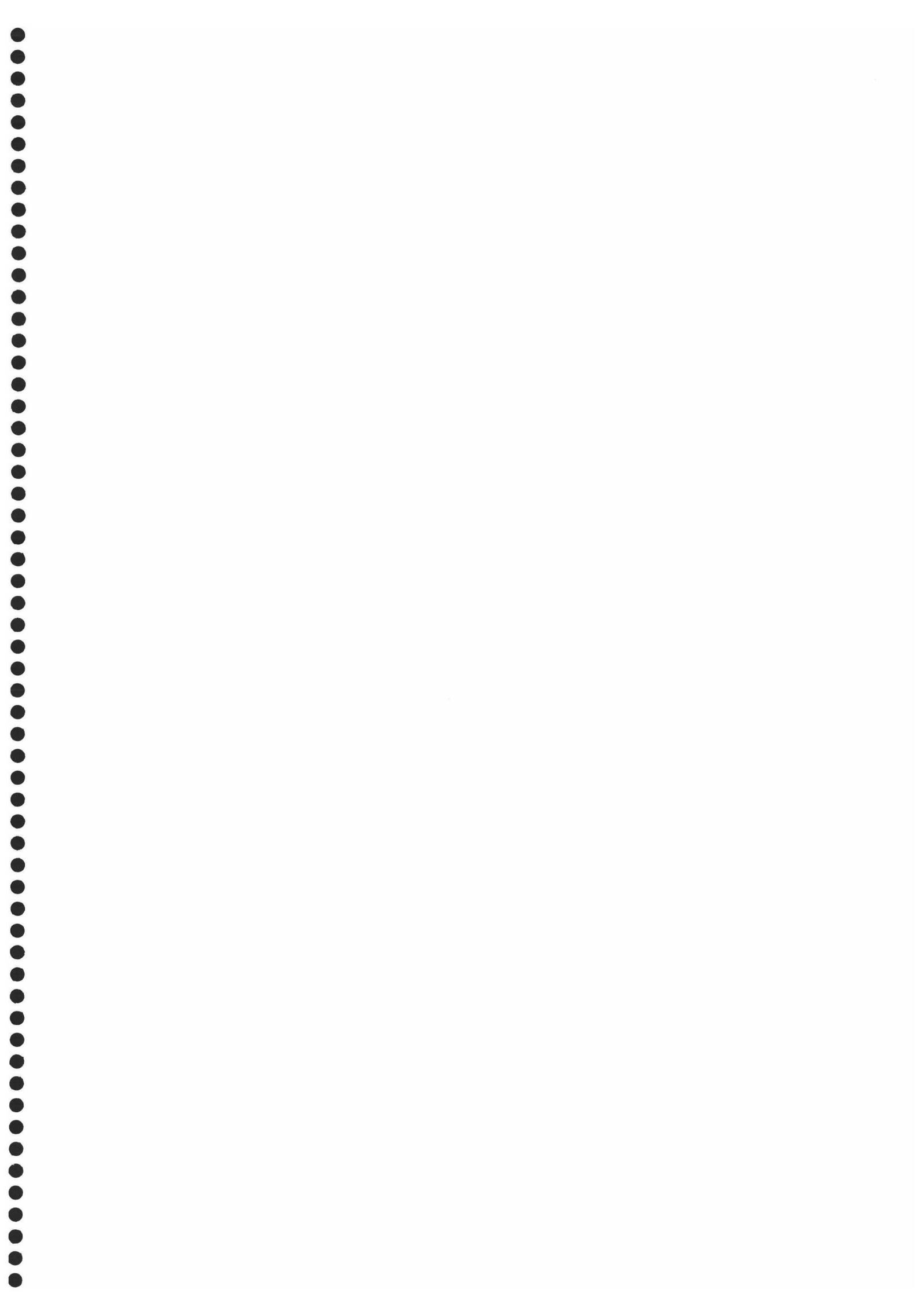
La concentración de proteína total de la suspensión bacteriana de células permeabilizadas con tolueno se determinó con el kit de Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad ref.500-0005). La actividad prolina deshidrogenasa se definió como nmoles de pirrolina-5'-carboxilato formados por mg de proteína total y minuto.

### **17. OBTENCIÓN DE EXUDADOS RADICULARES.**

Los exudados procedentes de la raíz de plantas de maíz se obtuvieron mediante el cultivo hidropónico de semillas de maíz previamente germinadas en condiciones de esterilidad. Para ello, las semillas de maíz se lavaron con 100 mL de agua destilada tras lo cual se sumergieron inicialmente durante 5' en etanol al 70% y posteriormente 20' en una solución de hipoclorito sódico al 20% para esterilizar la superficie de las semillas. Pasado ese tiempo se realizaron 4-5 lavados con H<sub>2</sub>O destilada estéril con objeto de eliminar los restos de hipoclorito. Una vez enjuagadas, las semillas permanecieron de 12 a 20 h en H<sub>2</sub>O destilada estéril para favorecer la germinación de las mismas. Posteriormente las semillas se colocaron en placas Petri de vidrio provistas de papel de filtro que habían sido esterilizadas en el autoclave. Tras humedecer con H<sub>2</sub>O destilada estéril el papel de las placas Petri se colocaron de 15 a 20 semillas por placa, las cuales se incubaron a 30°C para favorecer la germinación de las mismas. Pasados 2-3 días, las semillas germinadas se transfirieron a vasos de precipitados de cristal de 150 mL de capacidad provistos de una malla metálica en su borde los cuales habían sido autoclavados previamente. El recipiente se llenó completamente con una solución de medio mínimo M8 estéril cuya composición se detalla en el **apartado 2** de los *Materiales y Métodos*. Las semillas pregerminadas se colocaron sobre la rejilla sumergiendo las raíces en la solución nutritiva. Posteriormente el cultivo hidropónico se colocó en un recipiente mayor previamente autoclavado provisto de tapadera con objeto de mantener la esterilidad del cultivo en todo momento. Tras 3 ó 7 días desde la introducción de las raíces se retiraron las plantas y la solución acuosa que ahora contenía los exudados radiculares se filtró con papel de filtro para eliminar los restos celulares, posteriormente se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C.



RESULTADOS



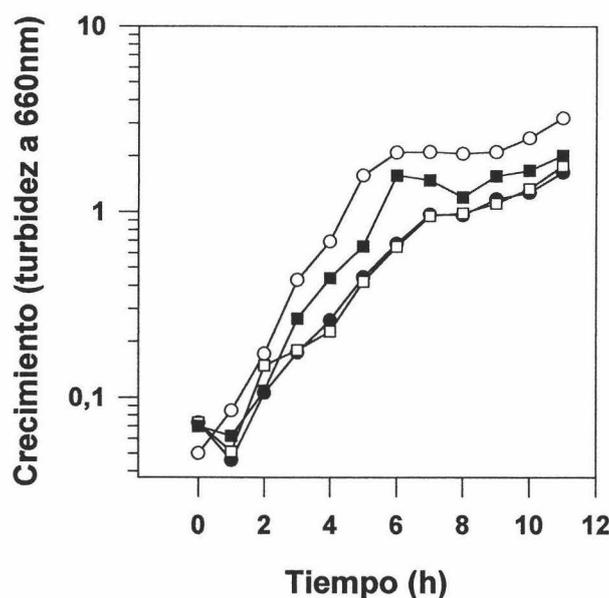
## Capítulo I

### **Aislamiento, clonación y secuenciación del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* KT2440.**

Las bacterias del género *Pseudomonas* pueden utilizar algunos de los llamados aminoácidos proteínogénicos como fuente de carbono y/o nitrógeno (Phillips, 1986). Las rutas metabólicas implicadas en el catabolismo de los aminoácidos así como la organización genética y regulación de los genes responsables de la degradación están bien caracterizadas en otros organismos, pero en el caso de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* la información es escasa. Ello estimuló el interés del grupo en el estudio en *P. putida* KT2440 del catabolismo de la prolina, un compuesto abundante en exudados radiculares de plantas (Vancura *et al.*, 1988), por lo que se emprendió la caracterización del operón responsable de la degradación de este iminoácido.

#### **1. Crecimiento de *P. putida* KT2440 en prolina.**

Con objeto de comprobar si *P. putida* KT2440 era capaz de utilizar prolina como fuente de carbono, de nitrógeno, o de carbono y nitrógeno se realizaron una serie de curvas de crecimiento en distintos medios mínimos. En los medios de ensayo la prolina fue la única fuente de nitrógeno (M8 con 20 mM de prolina y 20 mM de succinato como fuente de carbono), la única fuente de carbono (M9 con 20 mM de prolina), la única fuente de carbono y nitrógeno (M8 con 20 mM de prolina) o estuvo acompañada de otras fuentes de carbono y nitrógeno (M9 con 20 mM de succinato y 20 mM de prolina). *P. putida* KT2440 se cultivó durante 10-12 h en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato como única fuente de carbono tras lo cual se diluyó en 100 mL de los medios anteriormente citados hasta una turbidez inicial a 660 nm (D.O. <sub>660 nm</sub>) de 0,05. El crecimiento de *P. putida* KT2440 se determinó siguiendo la turbidez de los cultivos a intervalos de una hora. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 17**.



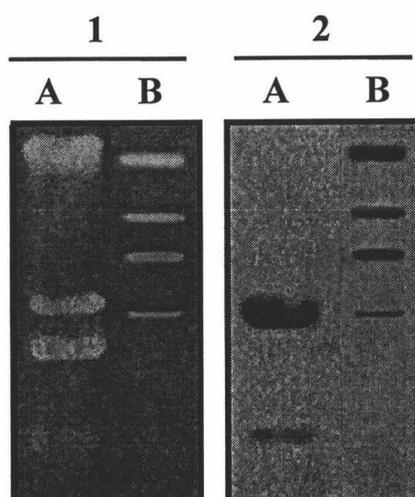
**Figura 17. Crecimiento de *P. putida* KT2440 en distintos medios con prolina.** Un cultivo de *P. putida* KT2440 en medio mínimo M9 con succinato se usó para inocular 100 mL de medios mínimos en los que la prolina fue la única fuente de nitrógeno (círculos abiertos), la única fuente de carbono (círculos cerrados), la única fuente de carbono y nitrógeno (cuadrados abiertos) y en un medio con otras fuentes de carbono y nitrógeno adicionales como amonio y succinato (cuadrados cerrados).

El crecimiento de *P. putida* KT2440 fue evidente en los cuatro medios ensayados, lo que implica que éste organismo puede utilizar la prolina como única fuente de carbono, como única fuente de nitrógeno o como única fuente de carbono y nitrógeno. De la pendiente de las curvas de crecimiento (**Figura 17**) se estimó que el tiempo de generación de *P. putida* KT2440 en fase exponencial fue de aproximadamente 1,37 h en el medio M8 con prolina y succinato, 2,44 h en el medio M9 con prolina, 2,27 h en el medio M8 con prolina y 1,7 h en el medio M9 con prolina y succinato. Una vez comprobado que *P. putida* KT2440 utilizaba la prolina como nutriente se planteó la identificación de los genes implicados en el catabolismo de la misma.

## 2. Aislamiento del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* KT2440.

La cepa *E. coli* RM2 (Wood, 1981) no utiliza prolina como fuente de carbono o nitrógeno debido a que contiene una deleción de los dos genes necesarios para el catabolismo de este aminoácido, *putA* y *putP*. La transferencia a esta cepa de una genoteca de *P. putida* KT2440 construida mediante clonación de los fragmentos resultantes de la digestión parcial de su cromosoma con *Pst*I en el vector pLARF3 (Ramos-Gonzalez *et al.*, 1993), permitió rescatar el cósmido pCRR831 como aquel que restauraba la capacidad de utilizar prolina como única fuente de nitrógeno a la cepa *E. coli* RM2.

Tras la separación mediante electroforesis y transferencia a una membrana de nilón cargada positivamente de los fragmentos resultantes de la digestión del cósmido pCRR831 con *Pst*I se realizó una la hibridación en condiciones estrictas usando como sonda un fragmento del operón del catabolismo de la prolina de *Salmonella typhimurium* presente en el plásmido pPC6 (Hahn *et al.*, 1988). Para preparar la sonda, este plásmido se digirió con la restrictasa *Mlu*I que rindió 3 fragmentos de tamaños 4,2 , 3,9 y 1 kb. Uno de ellos, el de 4,2 kb que contenía casi la totalidad de los genes *putA* y *putP* de *S. typhimurium*, se marcó con digoxigenina y se utilizó como sonda para la hibridación. Dos de las bandas resultantes de la digestión con *Pst*I del plásmido pCRR831, cuyos tamaños fueron 4,3 y 2 kb, hibridaron con la sonda utilizada. El resultado de la hibridación se muestra en la **Figura 18**.



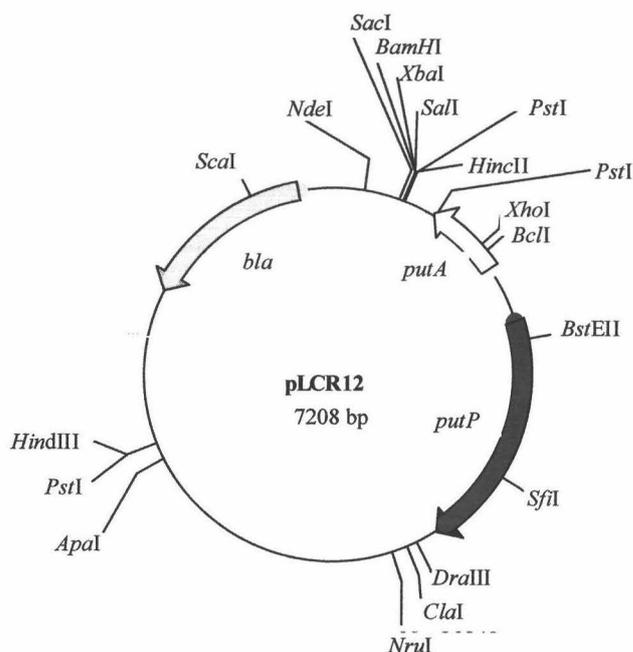
**Figura 18. Localización de los genes *put* de *P. putida* en el cósmido pCRR831 mediante hibridación con una sonda de *S. typhimurium*.** El panel 1 muestra el resultado de la digestión de pCRR831 con *Pst*I (calle A) junto con un marcador de peso molecular (ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III) (calle B). El panel 2 muestra el resultado de la hibridación de los fragmentos obtenidos de la digestión de pCRR381 con *Pst*I usando como sonda parte de los genes *putA* y *putP* de *S. typhimurium*. Nótese que el fago  $\lambda$  había sido marcado previamente con digoxigenina.

### **3. Subclonación y secuenciación de los fragmentos *Pst*I procedentes del cósmido pCRR831.**

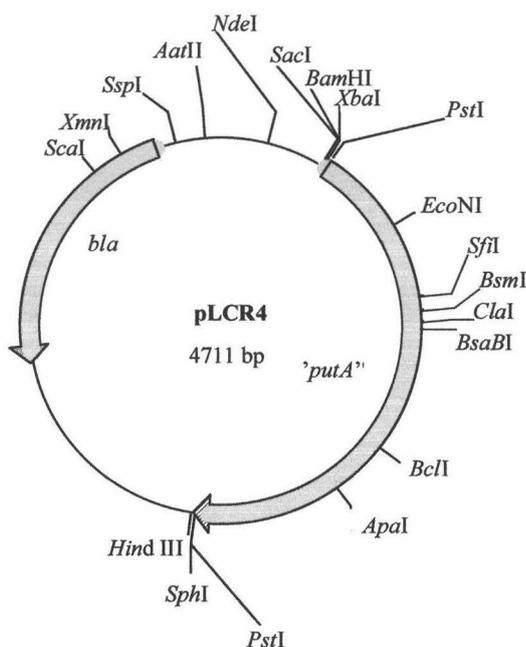
Tras la evidencia de que existían en *P. putida* KT2440 genes homólogos a los genes de *S. typhimurium* implicados en el metabolismo de la prolina, se procedió al aislamiento y subclonación de cada uno de los fragmentos *Pst*I de 4,3 y 2 kb del cósmido pCRR831 en el vector pUC19. Los plásmidos recombinantes resultantes tras la selección en *E. coli* JM109 se denominaron pLCR12 (**Figura 19**) y pLCR4 (**Figura 20**) y contienen los fragmentos de 4,3 y 2 kb respectivamente. Estos plásmidos se secuenciaron a partir de los cebadores universal y reverso, en un principio, continuando con cebadores internos a los insertos mostrados en la **Tabla 3** del **apartado 9** de *Materiales y Métodos*. En la **Figura 21** se muestra la secuencia completa de los genes *putA* y *putP* de *P. putida* KT2440 así como la localización de los cebadores empleados en dicha secuenciación.

#### **3.1 Análisis del inserto del plásmido pLCR12.**

Tras la secuenciación completa del fragmento *Pst*I de 4,3 kb clonado en el plásmido pLCR12 se comparó con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank. El resultado de la comparación mostró que el fragmento *Pst*I contenía un marco de lectura abierto completo de aproximadamente 1,5 kb homólogo al gen *putP* de distintos organismos y mostró un 79% de identidad con el gen *putP* de *P. fluorescens* y un 69% de identidad con el gen *putP* de *E. coli* entre otros.



**Figura 19. Esquema del plásmido pLCR12.** El plásmido pLCR12 se obtuvo mediante clonación en el sitio *PstI* del vector pUC19 de un fragmento *PstI* de 4,3 kb procedente del cósmido pCRR831. En la figura se muestran los sitios únicos de restricción, la posición de los tres sitios *PstI* que posee, así como la localización del gen *bla* que codifica resistencia a ampicilina (flecha gris), el gen *putP* (flecha negra), el extremo 5' del gen *putA* (flecha blanca) y la región intergénica a *putA* y a *putP*.



**Figura 20. Esquema del plásmido pCRL4.** El plásmido pCRL4 se obtuvo mediante clonación de un fragmento *PstI* de 2 kb procedente del cósmido pCRR831 en el sitio *PstI* del vector pUC19. En la figura se muestran los sitios únicos de restricción, la posición de los dos sitios *PstI* que posee así como la localización del gen *bla* que codifica resistencia a ampicilina y parte del gen *putA*.

Resultados

\* 20 \* 40 \* 60 \* 80 \* 100  
GGGTCCTTTTGGAAATCCCCEAATAATGGGGGAATTTTTACCGGGGTTAAGGGGTTCCGTTCAAAGGGGAGTCCCAAAAAAGGAAAGAGAACC  
CCCAGGAAAACCTTAGGGGGTTATTACCCCTTAAAAATGGCCCAATTCCCAAGGCAAGTTTTCCCTCAGGTTTTTTTCTTTCTTTGGGG

\* 120 \* 140 \* 160 \* 180 \* 200  
TTGAAAAGCGTTTAAAGTTTTTATATACCTTTTTGAAAAGGGCAAATGCCAATTTGGGATTTCAGGAAAACCTACCGGGGTCCATCCAAGGCCCC  
AACTTTTTTCGCAAAATTCAAAAATATATGGGAAAAACTTTTCCCGTTTACGGTTAAAGCCCTAAGTCCTTTTGGGATGGCCCAAGTAGGTTCCCGGG

\* 220 \* 240 \* 260 \* 280 \* 300  
AGTTGGGGTTAATACGGTTTTTTGCGTTGTCTGGTGGCCTCCGGCGTCGTTTTGAAAGCCATTGTGGCCGGCCTATTTTGGGGTTTTACCATTAGCA  
TCAACCCCAATTATGCCAAAAACGCAACAGACCACCGGAGGCCGAGCAAACCTTTCGGGTAACACCGCCGATATAAACGCCCAAAATGGTAAGTCGT

\* 320 \* 340 \* 360 \* 380 \* 400  
GCTTGTGATCATTCTGGGTGTTTCATGCAGAAGGGCATCAATTTTCAGTGCGGGTGACAAAAGAAGGAAGGCCAACAGCCGGGTTACCGTGGCAAATTG  
CGAACGACTAGTAAGACCCACAAGTACGCTTCCCGTAGTTAAAGTCACGCCCACTGTTTTCTTCCCTCCGGTTGTTTCGGCCCAAGTGCAGCCGTTAAC

\* 420 \* 440 \* 460 \* 480 \* 500  
GCTTTGGATGCTGTGGGTTATGGGCTTATGCAGCACAGCTGTCTGCTTTGATTTGCGTTTACCATTGGTTGAGCAAACCTTTGGCCGAAGCTCTGTCT  
CGAAACCTCAGACAACCCATAACCCGAATACGTCGTGTCGACAGACGAAACTAACCGGAAAGTGGTACCAAACCTCGTTTGAACCCGGCTTCGAGACGA

\* 520 \* 540 \* 560 \* 580 \* 600  
GAGGGGAGTCCGGATACCCCGATCCAACCCCGCTTCCACTTGCCTTAATACGGTGGTGGCACAACAGTGAACGGCGGTAGAAATGGCCAGCAG  
CTCCCTCAGGCTATCAGGGGCTAGGTTGGGCGCAAGGTGAACGGAATTATGCCACCACGCCGTTGTCCTTGGCCGCCATTTTAAACCGGCTTCGTC

\* 620 \* 640 \* 660 \* 680 \* 700  
TCCGGCCTTTCGCGGGTGAACCCGCTCTACACGACGCGCTGTGCATGTGTATAGGGCGGGTTTACCCGAAAGGACCGCCAGCCAGCCGAGAAT  
AGGCCGAGAAGCGCCACTTGGGCGAGGATGTGCTGCGGACACGTACACATATCCCGCCAAATGGGCGCTTTCTGGCCGGTCCGTCGGCTTTA

\* 720 \* 740 \* 760 \* 780 \* 800  
TTCCAGGGGATAAACCGGTAACAACAGAAGACACCCAAAGTACCCTGGCATGACCAGTCTGGTGGAGCACCTGTTAGTCCAGCCCTGCTTCCAGGACAT  
AAGTCCCTATTTGCCATTGTTGCTTCTGTGGGTTTCAGTGGCAACCGTACTGGTGAAGACCCTCGTGGACAATCAGGTCGGGACGGAAGTCCCTGTA  
SU9

\* 820 \* 840 \* 860 \* 880 \* 900  
GCACGATAAAAAAGGAGCCGAGGCTCTCCTTCTTCAACAACCCCTCAGCCATTAGCCAAATGGTTCATCAGGCTGGCGTTACCACCCCGCTGCAG  
CGTGCATTTTTTCTCTCGGCTCCGAGAGGAAGAAGATTGTTGGGAGTCGGTAAATCGTTACCAGTAGTCCGACCGCAATGGTGGGCGGCGACGTC

\* 920 \* 940 \* 960 \* 980 \* 1000  
TGTTACGCTCACCAGCGCTCGATGACCAAGGCTCCAGCGCAATCTGGTATCCCGCTGGACAGCCGCTGCACCCCAACGATCGCCCGGCAGCCTT  
ACAAGTGCAGTGGCGCGGAGCTACTGGTCCGCGAGGTCGCGTTAGACCACTAGGGGCGACCTGTGCGGCGACGTTGGGTTGCTAGCGGGGCGCTGC

\* 1020 \* 1040 \* 1060 \* 1080 \* 1100  
GGCCACCTGCTGGCATAAGCCGCGCAGTGGTCCGAGTGCCTATGGTGGATCAGCGGTCGAACGCCACTTCATCCTTGTTCAGTCCGCGACCAGCTTC  
CCGTGGACGACCGTATGCGGCGCTCGACCAAGGCTCAGCGGTACCACCTAGTGCAGCAGCTTGCCTGTAAGTAGGAACAAGTCCAGGCGCTGGTTCGAAG  
SU8

\* 1120 \* 1140 \* 1160 \* 1180 \* 1200  
ACCTTGGCTGCAGCTCAGCGCGCAGGCGGCGCAGGCGCTTGCCTGGTTACCGTCAACCCACACCGCGAGCTGCCAACGGCCAGTACCAGCGCGA  
TGGAAACCGGACGTCAGTGCAGCTCCGCGCCGCTCCCGGAACGGGCAAGTGGCAGTTGGGTGTGGCGGCTCGACGTTGCCGCTCATGGCGCCGCT

\* 1220 \* 1240 \* 1260 \* 1280 \* 1300  
ACTGCGCCAGCAGGTCGGTTTCGTTGTCGGCCAGGCACAGCACGTGCTCAGCGGCAGAATGGTGTAGCTGTTGCGCTCGCCGGTCCGGCCTGGCAGCAG  
TGACCGGGTCCAGCCAAAGCAACAGCCGGTCCGTGCTGTCAGAGTGGCGGCTTACCACATCGACAACGCGAGCGCCAGCCGACCCGACCGTCCGTC

\* 1320 \* 1340 \* 1360 \* 1380 \* 1400  
GCGGGCATGCGGCTTGCAGTGGTGGCGAACTGGTGCACAGCGCGCCAGGTCGGCCAGCTGGTTGTTCTCGGCCAGGCTTCAGGCGGTGCAGC  
CGCCGCTACGGCGAGACGCTGACCGACCGCTTACCGAGCTGTGCGCCGGTCCAGCCGCTGACCAACAAGAGCCGGTCCGGAAGTCCGGCACGTCG

\* 1420 \* 1440 \* 1460 \* 1480 \* 1500  
GGCTTACCAGCTGTTGTCAGGGTGGGTCGGGCTGCTTCCCGCTTCCGCTGCTGCTGGAAGTGGCGGCAATGGCGTCCGGCCGGGCGGGTGCAGCA  
CCGAAATGGTTCGACAAGCAGTCCACAGCCAGGCCGACGGAAGCGGACAGGACGACCTTACCAGCCGTTACCAGCCGCGCCCGCCAGCTGTGCT

\* 1520 \* 1540 \* 1560 \* 1580 \* 1600  
GGCGGTAGAGGTACAGCGGGCCGCGGCTTTCGGGCGGTTGCCAGACAGGCTTACCACCGAACGGTGCACGCCACCAGTGCACCCACAATGTTGCG  
CCGCCATCTCCATGTCGCCGCGGCGGCAAGCCCGGCCACGGTCTGTCCGGAAGTGGTGGTTGCCGACGTCGGGTTGGTACGTTGGTGTACAACGC  
SU4

\* 1620 \* 1640 \* 1660 \* 1680 \* 1700  
GTGACGACATGTTGCCGGCTTGGGTTTTCCACCACTTTGGCGATGGTCTCGTCGATACGGGTGTGCACGCCGAGGGTTCAGGCGGTAGCCGGAGTTGTTG  
CACTGCTGTACAACCGCCGCAACGCCAAAGTGGTGAACCGCTACCAGAGCAGCTATGCCACAGTGCAGGCTCCAGTCCGGCATCGGCTCAACAAC

\* 1720 \* 1740 \* 1760 \* 1780 \* 1800  
ATCTGCTCGATCAGCTGGTCCAGATTGGCGGTTGTAGCGCACACGTCAGCAGCGGGCCGAAGATTTCCGCTTCAGCTCGTTCGAAGCTGTCCAGCT  
TAGACGAGTAGTCCAGCAGGCTAACGCCGCCAACATCGGTTGGTGCAGTCTGTCCCGGCTTCAAAGCGCGAAGTTCGAGCAGCTTCGACAGGTCGA

\* 1820 \* 1840 \* 1860 \* 1880 \* 1900  
CGATCAGGGTTGGCATGACGAAGGTGCCGCGCTTGTATCTCGGCAGCATCGGCAATGGCGACTTGGTAGACCGGGCGGCTTTCTCGCGCATGCCCTGGAT  
GCTAGTCCCAACCGTACTGCTTCCAGGCGGCAACTAGAGCCGTCGTAGCCGTTACCCTGAACCATCTGGCCCGCGGAAAGAGCGGCTACGGGACCTA

\* 1920 \* 1940 \* 1960 \* 1980 \* 2000  
 GTGCTTCTCGATGCCGGCTTTGGCTTCGGCATCGATCACCAGGCGGATGTCCACGGCCAGGCGGTCCGGGCAGCCAGGCGGCTTTCAGCCATGGCCGCC  
 CACGAAGAGCTACGGCCGAAACCGAAGCCGTAGCTAGTGGCCCGGCTACAGGTGCCGGTCCGCCAGGCCGTCGGGTCCGCCGAAAGTCGGTACCGCGGG

SU5 2020 \* 2040 \* 2060 \* 2080 \* 2100  
 TTGAGCATCTCGATTACCGGGTTCGGCGGAGTCTTCTGCAAGCACAGTACGCGCAGGGCCGAGCAACGCTGGCCGGCAGTGTGCAAGGCCGAGGACACCA  
 AACTCGTAGAGCTAATGCGCCAGCCGCTCAGAAGGACGTTTCGTGTCATGCGCGTCCCGGCTCGTTGCGACCCGGCCGTGACAGCTTCCGGCTCCTGTGTT

\* 2120 \* 2140 \* 2160 \* 2180 \* 2200  
 CGTCGATCACGACCTTTCGGTCAAGTCCGAGGAGTCCGACGATCATCGGTTTGGCCCGCGGTTTCGGCGATCAGCGGGATCGGGCGGCCCTGGTTGTGTC  
 GCAGCTAGTGTGGACAAGCCAGTACAGGCTCCTCAGCTGCTAGTAGCGCAAGACCGCGGCCAAAGCCGCTAGTCCGCTAGCCCGGGGACCAACAG  
 SU2

\* 2220 \* 2240 \* 2260 \* 2280 \*  
 CAGACGGCCAGCGACGTTGCGTGCAGCAGGGGGCCACTTTCAGTGGAGCCGTTGAACATCACGCCCTTTCAGCGCTCGTCTCCGACCAGGCGGCCACCG  
 GTCTGCCGGTTCGCTGCAACGCGACGTCGTCGCCCGGTTGAAGTACCTCGGCCACTTGTAGTGCAGAACTGCGCGAGCAGAGGCTGGTCCGGCCGTGGC

\* 2320 \* 2340 \* 2360 \* 2380 \* 2400  
 ACAGTTTACCGCGGCCCGGCAGCAGTGCAGCACGCCCTTCTGGGATGCCAGCTTTCAGCAGCAGGCGCACGGCCCTGGGGCGGATCAGTGGGGTTTGGT  
 TGTCAAAGTGGCGCCGGCCGTCGTCGACGTCGTCGGAAGACCCTACGGTTCGAAGTTCGTCGTCGCCGTGCCGACCCCGCTAGTACCCCAACCA

\* 2420 \* 2440 \* 2460 \* 2480 \* 2500  
 CGGCAGGCTTGGCCAGTACCGGGTTCGGCGCAGCAGGGCTGCGGCCACCTGGCCGGTGAAGATCGCCAGCGGGAAGTTCATGGGCTGATGCACACCAC  
 GCCGTCCGAACCGGTCATGGCCCAACGGCCGTCGGTCCCGACGCCGTTGACCCGGCCACTTCTAGCGGTCCGCTTCAAGGTACCCGACTACGTGTGGT  
 PutA3

\* 2520 \* 2540 \* 2560 \* 2580 4U1 2600  
 AGGACCAGTGGCGGTGGCGCTCGTTGCTGAAGTCTTAAGTGCCTGCACCAGTGTAGCGCAGGAAGTCCACGGCTTTCAGCAATTCGGCAATGGCG  
 TCCTGGGTACCCCGCCACCCGAGCAACGACTTCAGCAATTCACGGACGTGGCGCATCATCGCGTCTTCAGGTGCCGAAGTTCGCTTAAGCCGTTACCGC  
 4UR1

\* 2620 \* 2640 \* 2660 \* 2680 \* 2700  
 TTGGGAAGGTTTGGCCGGCTTCGCGGATGAGCAGGCCATCAGCGGGTGGATTTCGGCTCCATCAGTTCGGCGGTGGCTCCAGAATGGCAGCAGCT  
 AACCCCTTCCAAAACGGCCGAGCGCTACTCGTCCGGGTAGTCCGCCACCTAAAGCCGGAGGTAGTCCAGCCGCCACGGAGGCTTACCGTTCGTGCGA

\* 2720 \* 2740 \* 2760 \* 2780 \* 2800  
 CGGCTGGTGGGTGGCTGCCAGATCGCGCGGGGTTTTCAGTGCACAAATGGATGGCGTTTCAAATTTGGCAACGGTGGCTCCTGCACATGGCCGACGAC  
 GCCGACCACCCACCGGACGGTCTAGCCGCGCCCAAGTACCGGTTTACCTACCGCAACAGTAAACCCTTGGCACCGGAGGACGTGTACCGGCTGCTG

\* 2820 \* 2840 \* 2860 \* 2880 \* 2900  
 GTTGGTGGTTCAGCCGGTTCAGCACCGGTCGCGCAGCGCTCTCCTGGCGCGCAGGCCAGCAGCGGGCAGCTCCCACTGTTTGTGAGCGGTGGCC  
 CAACGCCACCCAGTCCGCCAAGTTCGTCGCCACCGCTCGCGAGAGGGACCGCCGCTCCGGTTCGTCGCCCGCTCGGAGGGTGACAAACACTCGCCACCGG

\* 2920 \* 2940 \* 2960 \* 2980 \* 3000  
 ACCATGGCGCAGGACAACAACCCAGGCGGTGTTTCATGGCCATTTCAATACCGCCCAATTTGGCCGTTTCGGTCCATACAGGTTCGCGCGCAGGGGAA  
 TGGTACCGCGTCTGTTGTTGGGGTCCGCCACAAGTAAACCGTAAAGTTATGGCCGTTTAAACCGGCAAGCCACGGTATGTCCAGCGCGCGTCCCTT

\* 3020 \* 3040 \* 3060 \* 3080 \* 3100  
 TCGTGGGTGGCGCAGGCCGATACTGCCTTTCCTGGGTACCCATGCGATCGATGCTGGCCACCGGTTCGGCGACCAAGTTCCTGGATGGAATTCAGTGGTC  
 ACGCACCCACCGCTCCGGCTATGACGAAAGGACCCATGGGTACGCTAGCTACGACCGGTGGCCAGCCGCTGGTCAAGGACCTACCTTTAGCTCACCCAG  
 4R3

\* 3120 \* 3140 \* 3160 \* 3200  
 GGCAATGCGGTTGACGAACAGGTTTCGCGCGCTTTTCAGCAGGCGCGCACCAGGTAGGCCAGCAGGTTTCATGGGTGGCCAGCGGTTCATACACG  
 CCGTTACGCCAAGTTCGTTGCTCCACAAGCGCGCAAAAGGTCGTCGCCCGGTTGGTCCATCCGGTTCGTCGCAAGTACCACCGGTCGCCACGATGTGTC

\* 3220 \* 3240 \* 3260 \* 3280 \* 3300  
 CGGCAGGGCGGTTTCAGCTTGCATCGGCAATCTTGGCGACCACTTTCGTCGTCAGCGGTTTCGCCATGCGCTGCAGGCACTGGAAGTTCGACTGGCCCG  
 GCCGTGCCCGCAAGTTCGAACGGTAGCCGTTAGAACGGCTGGTGAACGAGCATGTTCGCCAAGCGGGTACGGCACGTCGGTACCTTTCGAGCATGACCGGGC

\* 3320 \* 3340 \* 3360 \* 3380 \* 3400  
 GGTAATAGTTCTGCCCGCAATGTGGTAGATGGCCGACAGGTTGGGGCTTGGGGTGGCGAAGTTCGGGTAGATGGCTTCTGGCACGGCCAGCAGCTT  
 CCATTATCAAGACGGGCGTTACACCATCTACCGGCTTCCACACCCGCAACACCCACCGCTTTCGACGCCATCTACCGAAGACCGTCCGGTTCGTCGAA

\* 3420 \* 3440 \* 3460 \* 3480 \* 3500  
 GCGGGCGCAGGCGACGTAGGACACGTCGGTGTACACCTTGGCGGTATAGACCGGGTAGCCTTCCAGGCTTCGACCTGGGCACGCTTGATCTCGCTGTCC  
 CGCCCGGTCGGCTGCATCCTGTGCAGCCACATGTGGAACGCCCATATCTGGCCATCGGAAGGTCCGGAAGCTGGACCCGTGCGAAGTACGAGCGACAGG  
 \* 3520 \* 3560 \* 3580 \* 3600  
 CAGTAGGCGCCTTTTAAACAGGCGGATTATCAGGCGGTGGGGGTGGCGTTCGCGCAGATCGAAGAAGTAGTTGATCAAGTACGGGCAGCGCTTCTGGTAGG  
 GTCATCCGCGGAAAATGTCCGCTAATAGTCCGCCACCCCGCAACCGGTTTCAGCTTCTTCATCAACTAGTTTCATGCCGTCGCGAAGACCATCC  
 4R2

\* 3620 \* 3640 \* 3660 \* 3680 \* 3700  
 CCTGGATAACGAAGCCGATGCCGTTCCAGCCAGCCAGGGATGGCTCGAAGCACAGGCGTTCGAGCAGGTCCAGCGAAAGCTCCAGGCGGTCCGGTCTTTC  
 GGACCTATTGCTTCGGTACGGCAAGTCCGGTCCCTACCGAGCTTCGTCGCGCAAGCTTCGTCAGGTCGCTTTCGAGGTCGGCCAGCCGGAAGAAG

\* 3720 \* 3740 \* 3760 \* 3780 \* 3800  
 GCGCTCGATGTTAAGCCGATGTCGACTGCTTGGCCAGCAGGGTCAGCGACAGCAGGCGCGGGTACAGCTTTCATCACCGCTCGTACTGGGCCCGG  
 CCGCAGTACAATTCGGCTACAGCATGACGAACCGGTCGTCACGTCGCTGTCGTCGCCCGCATGTCGAGAAGGTAGTCCGCGAGCATGACCCGGGGC

Resultados

\* 3820 \* 3840 \* 3860 \* 3880 \* 3900  
CTGTAGCGCGGGTGCAGTGCCGACAGCTTGATCGAGATGCCTGGGCCCTTCATAGATGCCACGGCCATGCGAGGCCCTTGGCCGATCGAGTGGATGGCTGCCTGCT  
GACATCGCGCCACGTCACGGCTGTGCAACTAGCTCTACGGACCCGGAAAGTATCTACGGTGCCGGTACGCTCCGGAACGGCTAGCTCACCTACCGGACGA

\* 3920 \* 3940 \* 3960 \* 3980 \* 4000  
CGTAGGACGCCAGGTACTTCTGCGCGTCTGCTCGGTTCAGTGCAGGCTTCGCCAAGCATGTCTAGGAGTAACGGAAGCCCTTGGCCCTCGAAACGGCTGGC  
GCATCTGCGGTCCATGAAGACGCGCAGCAGGAGCCAGTCAAGCGGTTCTGACAGCATCCTCATTGCCCTTCGGAACCGGAGCTTGGCCAGCCG

\* 4020 \* 4060 \* 4080 \* 4100  
GTTGGCCAGGGCTTCGCAATGGTCTCGCCGGTACGAACTGCTCACCCATCAGGCGCATGGCCATGTGACGCGCCTTGGGATCATCGCTCGCCGCTC  
CAACCGGTCCCGAAGCCGTTACCAGAGCGGCCACTGCTTGACGAGTGGGTAGTCCGCTACCGGTACAGCTGCGGGAACGCCCTAGTAGCCGAGCGCGAG

\* 4120 \* 4140 \* 4160 \* 4180 \* 4200  
TTGCCGATGATGCGGTGAGCGAGGAGGTGAGGCCGTTTCGTTATGGGTGCTGACCGCTTTCGCGGTGAGCAGCAGCCCCAGGTGGCGGCTTGACGA  
AACGGCTACTACGCCACTCGCTCCTCCACTCCGGCAAAGCAATACCACGACTGGTCAACGGCCAGTCTGCTGCGGGGTCCACCGCCGCAACTGCT

\* 4220 \* 4240 \* 4260 \* 4280 \* 4300  
ACAGTGACGGGCTGTGCCCAGGTGCGGCTGCCAGTTGCCGTTACTGATCTTGTGCGGGATCAGCGCATCACGGGTACCTTTGTGCGGGATACGAGCAG  
TGCTACTGCCCGACAACGGGTCCACGCCGAGGTTCAACGGCCATGACTAGAACAGCGCCTAGTCCGCTAGTGCCCATGGAACAGCCCTATGCGTCTGCT

\* 4320 \* 4340 \* 4360 \* 4380 \* 4400  
GGCTTCGGCCAGGCACACGCCACGCCCTTTCCTGAGACGACAGCGAGAATTCTGCAGAGGCCCTGGACGATACCGCCACGGCCGCCAGCGCTTTTCTGG  
CCGAAGCCGGTCCGTTGCGGTGCGGAAAGGACTCTGCTGTCGCTCTTAAGGACGTCGTCGGGACCTGCTATGGCCGTGCCGGCGGCTGCGAAAAGACC

\* 4420 \* 4440 \* 4460 \* 4480 \* 4500  
TTGCGCAGTTTTTCGCAATGCTTGGCCAGCTTGTGGTGGCGTGGCCAGCGCGCGCTCAGGCGCGCTGCTCCAGCAGCATCGGCACCCTTCTCT  
AACCGTCAAAAAGCCGTTACGAACCGCGTCAACAACCACCGCAGCGGTCGCGCGGAGTCCGCGCGGACGAGGTCTGCTAGCCGTGGTGAAGGA

12U1 \* 4520 \* 4540 \* 4560 \* 4580 \* 4600  
GCTCGGGCGCGGTAGGCGCGGTGATCGCCGAGCGCAGTACCAGCTGCGGCAAGATGCTCTCGGCAAATTCGAGGAAGCACCTGGTGGCTGTGGTCCGGC  
CGAGCCCGCCGCAATCCGCCGCACTAGCGGCTCGCGTATGGCTGACGCGGTTCTACGAGAGCCGTTTAAGCTCCTTCGTGACCACCGACACCAGCCG

\* 4620 \* 4640 \* 4660 \* 4680 \* 4700  
CTGGACTTACCAGGCATCGTCCGCCGGTGTGGCATGACCGTTGAGTTCGGTTCAGGTTGGCACCACCTCGAGCTTCTCCAGTAATGAAGATCGCT  
GACCTGAAGTGGCCGTAGCAGCCGCCAACGACCGTACTGGCAACTCAAGCCAGTCCACCGTGGTGGGAGCTCGAAGAGGTCCATTAACTTCTAGCGA

\* 4720 \* 4740 \* 4760 \* 4780 \* 4800  
TGCTTGATCAACCAGTGAAGCGTGGGTCGATGGACTGCGCAGCTGCTTTGAGTCGCTCACGGGTGCGGTGCTGAGTTCGACCCCAAGGTGGTGTAGTCG  
ACGAACTAGTTGGTCACTCCGCACGCCAGCTACCTGACGCGTTCGACGAAACTCAGCGAGTCCACCGCCAGCAGCTCAAACCTGGGGTTCCACCATCAGC

\* 4820 \* 4840 \* 4860 \* 12U2 \* 4900  
CCATTTCTTATCCTCGTTATGACCAGGTTGTGGCCTAAGCTGGCGTCAAGAGTATCTGTAGGACAATTCGGGTGCAACCAGGTGCAACCCGATTTTTTC  
GGTAAAGAATAGGAGCAATAACGGTCCAAACCCGATTCGACCGCAGTCTCATAGACATCCTGTTAAGCCACGTTGGTCCACGTTGGCTAAAAAAG

← putA

\* 4920 \* 4940 \* 4960 \* 4980 \* 5000  
GTGTGAAAGGTGCAACTCGTCCGACAGCTATCCCATACCCGAAAAGGGGCGCTTTCGGTGCATTTATTCTGAAAAAGCGGTTTTTCTCCCGAAAAG  
CACACTTCCACGTTGAGCAGGCTGTGATAAGGGTATGGGACTTTTCCCGCGAAAGCCACGCTAAATAAGACTTTTTTCGCCAAAAAACGAGGGCTTTC

\* 5020 \* 5040 \* 5060 \* 5080 \* 5100  
GAGCAAGAAGTGGGCTTTGTGCGAAAATGCACGGCAGGTGCAACTTCAAAAAGAAAATGGTGCACCTTCTTTGCGTTGTTGCATAGATTCCGCCGCC  
CTCGTTCTTACCCGAAAACAGCCTTTTACGTGCCGTCCACGTTGAACGTTTTCTTTTACCAACGTGGAAGAAAACGCAACACGTATCGTAAGCGGCGG

\* 5120 \* 5140 \* putP \* 5180 \* 5200  
TGGGTGCAACCACCAACGGTGTGGTTGCGCATGATAAAAACAAACGCCAGGGCACACGCATGGGCAATCCACTAACGATCACCTTCGTGATCTACATCGC  
ACCCACGTTGGTGGTTGCCACACCAACGCTACTATTTTTGTTTGGGTTCCCGTGTGCGTACCCGTTAGGTGATTGCTAGTGGAAAGCACTAGATGTAGCG

\* 5220 \* 5240 \* 5260 \* 12U3 \* 5280 \* 5300  
AGCAATGGTGTGATCGGCTTCGCCGCTATCGCGCTACCAACAACCTTTCGATTACATTTGGGTGGTCCGAGCCTGGGTAAGCGTGGTTACCGCGCTG  
TCGTTACCAGACTAGCCGAAGCGCGGATAGCGGATGGTTGTTGAAAGGCTAATGTAAGACCCACAGCGTCCGACCCATCGACCAATGGCGCGAC

\* 5320 \* 5340 \* 5360 \* 5380 \* 5400  
TCTGCCGGTGCCTCCGACATGAGTGGTGGTGTGATGGGCTGCCCGGTGCCATCTACTTCGCGGGCTGTCCGAGCCCTGGATCGCCATCGCCCTGA  
AGACGGCCACGGAGGCTGACTCACCGACGACTACCCGGACGGCCACGGTAGATGAAGCGCCCGACAGGCTCCGGACCTAGCGGTAGCCGACT

\* 5420 \* 5440 \* 5460 \* 5480 \* 5500  
CAGTGGGTGCCTACCTGAACTGGCTGTTCTGTCGAGCCGGTGCAGGTCGAGACCGAACAATGGTACGCGCTGACCCTGCCGACTACTTCTCCAG  
GTCACCCACGGATGGACTTGACCGACAAGCACCGTCCGGCCGACGGCACGCTGCGCTTGTGTTACCCTGCGGACTGGGACGGCCTGATGAAGAGGTC

\* 5520 \* 5540 \* 5560 \* 5580 \* 5600  
CCGTTTCGAAGACAATAGCGGCTGCTGCGTATCATTTCCGCCATCGTCATCCTGGTGTCTTACCCTACTGTGCCTCCGGCATCGTGGCCGGTGGC  
GGCAAAGCTTCTGTTATCGCCGACGACGCATAGTAAAGCGGTAGCAGTAGGACCACAAGAAGTGGTAGATGACACGGAGGCCGTAGCACCGCCACCG

\* 5620 \* 5640 \* 5660 \* 5680 \* 5700  
 CGTCTGTTTCGAGAGCACCTTCGGCATGTCTGACGAAACCGCTTTGTGGGCTGGTGCGGCGGCGACCATCGCCTACACCTTCGTTGGTGGCTTCCTGGCGG  
 GCAGACAAGCTCTCGTGAAGCCGTACAGCATGCTTTGGCGAAACACCCGACCACGCCGCCGCTGGTAGCGGATGTGGAAGCAACCACCGAAGGACCGCC

\* 5720 \* 5740 \* 5760 12U4 5780 \* 5800  
 TGAGCTGGACCAGATACCGTACAGGCTTCGCTGATGATCTTCGCGCTGATCCTGACCCCGGTAATCGTGTGATCTCCACCGGTGGCTTCGACCAGACCTT  
 ACTCGACCTGGCTATGGCATGTCCGAAGCGACTACTAGAAGCGGACTAGGACTGGGGCCATTAGCACGACTAGAGGTGGCCACCGAAGCTGGTCTGGAA

\* 5820 \* 5840 \* 5860 \* 5880 \* 5900  
 CGCCGCTATCGAGGCGGTGAACCGGGCAAACCTTCGACATGCTCAAGGGTGCCACCTTCATCGGCATCATCTCGCTGATGGGCTGGGGCTGGGTTACTTC  
 GCGGCGATAGCTCCGCCACTTGGCCGCTTTGAAGCTGTACGAGTTCCACCGTGGAAGTAGCCGTAGTAGAGCGACTACCCGACCCCGGACCCAATGAAG

\* 5920 \* 5940 \* 5960 \* 5980 \* 6000  
 CGCCACCGCATATCCTGGCGCGCTTCATGGCCGCTGATTCCGTGAATTCATCGCCAAAGGCGCGCCGATTTCCATGACCTGGATGATCTGTGCCTGG  
 GCCGTTGGCTATAGGACCGCGGAAGTACCGGCGACTAAGCCACTTAAGGTAGCGGTTCCGCGCGGCGTAAAGGTACTGGACCTACTAGGACACGGACC

\* 6020 \* 6040 12U5 6060 \* 6080 \* 6100  
 CGGGTACCTGTGCCGTTGGCTTCTGCGGCATTGCCTACTTCTCGGCCATCTCGAGCTGGCAGGCCCCGGTTAGCGAAAACCAAAACGTGTGTTTACGTA  
 GCCCATGGACACGGCAACCGAAGACGCCGTAACGGATGAAGACCGGGTAGGACTCGACCGTCCGGGCAATCGCTTTTGGTGTTCACACAAGTAGCT

\* 6120 \* 6140 \* 6160 \* 6180 \* 6200  
 GCTGGCAAGATCCTGTTCAACCCATGGGTTGCGGGTGTCTGCTGTGCGCCATCCTGGCCGAGTCATGATTACCCTGAGCTGCCAGCTGCTGGTGTGC  
 CGACCGGTTCTAGGACAAGTTGGGTACCCAACGCCACAGGACGACACCGGTTAGGACCGGCGTCAGTACTAATGGGACTCGACGGTTCGACGACACACG

\* 6220 \* 6240 12U6 6260 \* 6280 \* 6300  
 TCCAGTGCCTGACCGAAAACCTTCTACAAAGCCTTCTCGCGCAAGAATGCTTCGCGAGTTCGAACTGGTGTGGGTTCGGCCGCTGATGGTGTGCGCCGTTG  
 AGGTACCGGACTGGCTTTTGAAGATGTTTCGGAAGGACGCGTCTTACGAAGCGTCCAGCTTGACCACACCCAGCCGGCAGACTACCACGACCGGCACC

\* 6320 \* 6340 12U3 6360 \* 6380 \* 6400  
 CCCTGATCGCCATCGCCATGGCCGCCAACCCGAAAACCGCGTGCTGGGCTGGTGGCCTATGCCTGGGCTGGCTTCGGTGCCGCTTTGGCCCGTGGT  
 GGGACTAGCGGTAGCGGTACCGGCGGTTGGCCCTTTTGGCGCACGCCCGGACCACCGGATACGGACCCGACCGAAGCCACGGCGAAAACCGGGCCACCA

\* 6420 \* 6440 \* 6460 12U4 6480 \* 6500  
 GCTGATTCGGTGTGTTGAAAAGGCATGACCCGTAACGGTGCCTGCGCCGATCGTGGTGGGTGCGCTGACGGTGATCCTGTGGAAGAACTTCGACACC  
 CGACTAAAGCCACGACACCTTTCCGTAAGTGGCATTGCCACGCGACCGGCCATAGCACACCCACGCGACTGCCACTAGGACACTTCTTTGAAGCTGTGG

\* 6520 \* 6540 \* 6560 \* 6580 \* 6600  
 CTCGGGTTGTACGAAATCATCCCGGGCTTCTGTTTCGCCAGCATCGCCATTGTTCTGGTGAAGAACTGGGCGAGCCCTTCGCAAACGATGGTCAAGCGCT  
 GAGCCCAACATGCTTTAGTAGGGCCCGAAGGACAAGCGGTCGTAGCGGTAACAAGACCCTCGTTCGACCCGTCGGGAAGCGTTTGTACCAGTTCGCGA

\* 6620 \* 6640 \* 6680 \* 6700  
 TCGAAGCGGCTGATGCGGCGTATCACGCGGACAAGTAACACCCGTTGAATTGGCGGCGCCTGCTTTCGGGGTGGCCCAATCAGCAGCCAGGCCTGACTC  
 AGCTTCGCCGACTACGCCGATAGTGGCGCTGTTTATGTTGGCAACTTAACCGCCGCGGACGAAACGCCACGCGGTTAGTCTGCGGTCCGGACTGAG

\* 6720 \* 6740 \* 6780 \* 6800  
 CGCCTGAAGGCAAGGTAACCTTGCAGGAGTTGCCATGAAGTATCGTACCGCCTTCGACGCGGCAACCACGCCGACGCTCCTCAAACACAT  
 GCGGACGTTCCGTTCCATTTGAACGGCGGAAGCGTCTCAACGGTACTTGTATAGCAGTTCGGAAGGTTCGCGCCGCTTGGTGGGCTGCAGGAGTTTGTGTA

\* 6820 \* 6840 \* 6860 \* 6880 \* 6900  
 CGTGTGACCCGCTCATCGCCCTGATGTCGCGCAAGGAGCAGCCGTTGCGCTATATCGATACCCACGCGAGGCTCGGCTGTACGACCTGCAAGGCGAC  
 GCACGACTGGGCGGAGTAGCGGACTACAGCGGCTTCTCGTGGCAAGCGGATATAGCTATGGGTGCGTCCCAGCCGGACATGCTGGACGTTCCGCTG

\* 6920 \* 6940 \* 6960 \* 6980 \* 7000  
 CAGGCAAGCCGTACCGGCGAGTACCTGGAAGCGTAGCCCGCTGTGGAATCGCGATGACCTGCGCGCCATGGCCGACGAATACCTGCGCATTTAAGC  
 GTCCGTTCCGGCTAGGCCGCTCATGGACCTTCCGATCGGGCGGACACCTTAGCGCTACTGGACGCGCGGTACCGGCTGCTTATGGACGCGTAATAATTCG

\* 7020 \* 7040 \* 7060 \* 7080 \* 7100  
 GCCTGAATGCCGATGGCGAGCTGCGGTAATACCCGGGTTGCCGAAATGGCCCGTTGCTGATGCGCCAGCAGGACCGCCCTGCTTAACGAAAAGCA  
 CGGACTTACGGCTACCGCTCGACGCCATTATGGGCCCAACGGGCTTTACCGGCAACGGACTACGCGGTCGCTTGGCGGGGACGAATGCTTTTCGT

\* 7120 \* 7140 \* 7160 \* 7180 \* 7200  
 CCCCAGACGGGCGCTCCTTAAGGAAAACATGAAAAAGACCCGCGGTGACCGTGCAACTGGGTGAAGGGTGGCATGTGCCGCGGGCTTGTGCTGCC  
 GGGGCTTCTGCCCGGAGGAATCCCTTTTGTACTTTTTTCTGGGCGGCACTGGCACGTTGACCCACTTCCACCGTACAGGCGCCCGAAGCAGCG

**Figura 21. Secuencia del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* KT2440.** Se muestra la secuencia completa del operón de la prolina de *P. putida* KT2440. En ella se señalan los genes *putA* (en rojo) y *putP* (en azul) los cuales se transcriben divergentemente. Sobre la secuencia se señalan también los cebadores utilizados en la secuenciación del operón mediante una flecha que indica la dirección 5' → 3'.

Además del gen *putP*, el inserto del plásmido pLCR12 presentó una región de aproximadamente 450 pb homóloga al extremo 5' del gen *putA* de distintos organismos presentando un 70% de identidad con *putA* de *K. aerogenes* y un 69% de identidad con *putA* de *E. coli*.

### 3.2 Análisis del inserto del plásmido pLCR4.

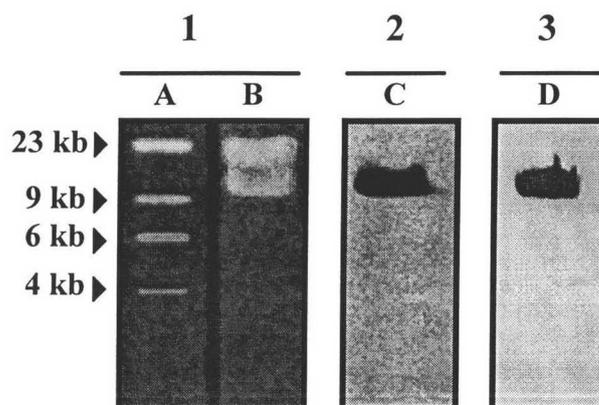
La secuencia nucleotídica del inserto de 2 kb del plásmido pCLR4 se comparó con las existentes en la base de datos GenBank y resultó ser homóloga al gen *putA* de otros microorganismos con un 70% de identidad con el gen *putA* de *K. aerogenes* y 69 % de identidad con el gen *putA* de *E. coli* entre otros.

En el inserto de pLCR4 se encontró una región codificante de 676 aminoácidos, pero en ningún momento se encontró un codón de terminación de la traducción por lo que se concluyó que gen *putA* de *P. putida* KT2440 estaba incompleto en dicho clon. Con objeto de obtener la secuencia completa del operón del catabolismo de la prolina se recurrió al cósmido pCRR831 con objeto de rescatar un fragmento de ADN que contuviera la región 3' del gen *putA*.

### 3.3 Construcción, secuenciación y análisis del plásmido pSLH4.

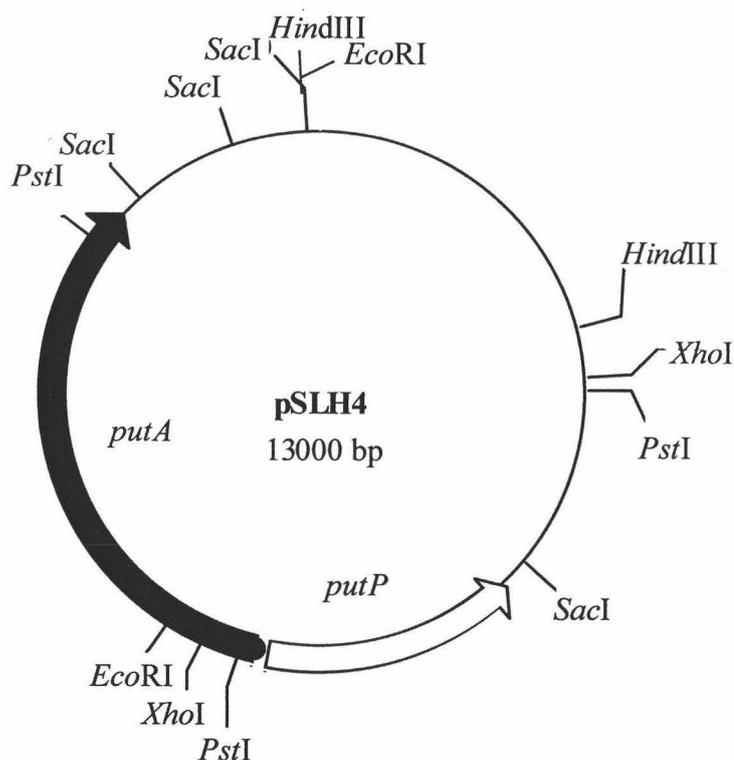
Para la construcción de un plásmido que contuviera un fragmento de ADN de mayor tamaño que el existente en los plásmidos pLCR4 y pLCR12 se digirió el cósmido pCRR831 con *Hind*III, enzima que rendía en dicho cósmido fragmentos de 10-15 kb. Tras la digestión, electroforesis y transferencia a una membrana de nilón, se realizó una hibridación en las condiciones detalladas en el **apartado 13** de *Materiales y Métodos*, usando como sonda el fragmento *Pst*I del plásmido pLCR4, el cual contiene parte del gen *putA*. En la **Figura 22** se muestra el resultado de dicha hibridación en la que se observó que un fragmento *Hind*III de aproximadamente 10,5 kb hibridó con la sonda mencionada. Para comprobar si este fragmento *Hind*III contenía también el gen *putP* además del gen *putA*, se repitió la hibridación en las mismas condiciones usando como sonda un fragmento obtenido por PCR con los cebadores 12R<sub>6</sub> y 12U<sub>5</sub> situados en el extremo 3' del gen *putP* (ver **Figura 21**). El resultado fue que dicha sonda hibridó con

el mismo fragmento *Hind*III, lo que sugería que, además del gen *putA*, este fragmento contiene el gen *putP* (Figura 22, calle D)



**Figura 22. Localización de los genes *putA* y *putP* en pCRR831 dentro de un fragmento *Hind*III.** El panel 1 muestra la digestión de pCRR831 con la restrictasa *Hind*III (calle B) junto con un marcador de peso molecular (ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III) (calle A). El panel 2 muestra el resultado de las hibridaciones de la digestión de pCRR831 con la enzima *Hind*III usando como sondas el fragmento *Pst*I de pLCR4 que contiene parte del gen *putA* de *P. putida* (calle C) y el extremo 3' del gen *putP* de *P. putida* obtenido mediante PCR a partir de los cebadores 12R<sub>6</sub> y 12U<sub>5</sub> (calle D) (ver Figura 21).

El fragmento *Hind*III se subclonó en el vector pUC19 previamente digerido con la misma restrictasa obteniéndose el plásmido pSLH4 mostrado en la Figura 23. Tras la construcción del plásmido pSLH4 se procedió a la secuenciación del inserto usando en un principio el cebador 4UR1, el cual estaba diseñado en base a la secuencia del extremo 3' del inserto *Pst*I del plásmido pLCR4, y posteriormente otros cebadores diseñados sobre la secuencia obtenida. El resultado fue la obtención de la secuencia completa del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* KT2440, la cual fue depositada en la base de datos GenBank con el número de acceso AF153207 y que se recoge en la Figura 21.



**Figura 23. Mapa del plásmido pSLH4.** El plásmido se obtuvo mediante clonación de un fragmento *HindIII* de 10,5 Kb procedente del cósmido pCRR831 en sitio *HindIII* del vector pUC19. Dicho fragmento contiene todo el operón de degradación de la prolina. En el mapa se muestran los sitios de restricción más relevantes así como la localización de los genes *putA* y *putP* y el gen *bla* que codifica para la resistencia a la ampicilina.

#### 4. Análisis del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* KT2440.

El análisis de la secuencia presentada en la **Figura 21** mostró que el operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* KT2440 consta de dos genes: el gen *putA* y el gen *putP* que se transcriben divergentemente a partir de una zona central de 355 pb. Al comparar las secuencias aminoacídicas deducidas de los genes *putA* y *putP* de *P. putida* KT2440 con las disponibles en las bases de datos GenBank, PDB, SwissProt y Pir mediante el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), se observó que las dos proteínas son homólogas a proteínas PutA y PutP de otros microorganismos. En las **Tablas 7 y 8** se recoge el organismo al que pertenecen, los porcentajes de identidad con las proteínas de *P. putida* y los números de acceso a la base de datos GenBank de algunas proteínas homólogas a PutA y PutP de *P. putida* KT2440.

Tabla 7. Identidad de la proteína PutA de *P. putida* con la de otros organismos.

Organismo	Porcentaje de identidad	Nº de acceso (GenBank)
<i>P. putida</i>	100%	AF153207
<i>K. aerogenes</i>	70%	AF038838
<i>E. coli</i>	69%	D90738
<i>S. typhimurium</i>	69%	X70843
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	54%	U39263
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	53%	Y08500

Tabla 8. Identidad de la proteína PutP de *P. putida* con la de otros organismos.

Organismo	Porcentaje de identidad	Nº de acceso (GenBank)
<i>P. putida</i>	100%	AF153207
<i>P. fluorescens</i>	79%	D32069
<i>E. coli</i>	69%	X05653
<i>S. typhimurium</i>	68%	L01148
<i>Rickettsia typhi</i>	67%	L01134
<i>Haemophilus influenzae</i>	58%	U32814
<i>Bacillus subtilis</i>	49%	U92466

La proteína PutA presentó cierto grado de similitud (alrededor del 30 % de identidad) con diversas deshidrogenasas como las aldéhidico deshidrogenasas de *B. subtilis* (GenBank Z99105) y *Homo sapiens* (GenBank AF003341), la retinaldéhidico deshidrogenasa de *Rattus norvegicus* (GenBank U60063) y la deshidrogenasa del semialdéhidico del ácido succínico de *E. coli* (GenBank AE000351).

La proteína PutP presentó cierta similitud también con otros transportadores asociados al simporte de sodio como los responsables del transporte de compuestos como el inositol (GenBank AJ001290), el pantetonato (GenBank U32778), el ácido fenilacético (al GenBank Z71176) y la glucosa (GenBank D78137).

En las **Figuras 24 y 25** se muestra el resultado del alineamiento múltiple de las proteínas PutA y PutP de *P. putida* KT2440 con las homólogas de distintos organismos.

#### 4.1. Análisis de la proteína PutA de *P. putida* KT2440.

El gen *putA* de *P. putida* KT2440 tiene un tamaño de 3945 pares de bases de cuya secuencia se predice una proteína de 1315 aminoácidos con un peso estimado de 142838 Daltons. La comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína con las existentes en la base de datos mediante el programa BLAST nos permitió observar que la proteína PutA de *P. putida* presenta homología con dos tipos de proteínas, las prolina deshidrogenasas y las pirrolina 5' carboxilato deshidrogenasas responsables de la oxidación de la prolina y la pirrolina 5' carboxilato (P5C) respectivamente. En la proteína PutA de *P. putida* se encontraron los dominios correspondientes a dichas actividades cuya localización se predijo en base a los alineamientos múltiples de proteínas PutA de distintos organismos (**Figura 24**) y en base al estudio detallado de secuencia que Ling y colaboradores (1994) realizaron sobre la proteína PutA de *E. coli*. El dominio de la actividad prolina deshidrogenasa se localizó entre los residuos 289 y 588 de la proteína (**Figura 24**). Dentro de este dominio, se encontró una secuencia conservada en enzimas dependientes de FAD entre los aminoácidos 312 y 354 y un motivo de unión al FAD con consenso GXGXXXG (Baker *et al.*, 1992) entre las posiciones 314 y 320.

La región de la proteína PutA de *P. putida* comprendida entre los aminoácidos 642 y 1074 fue homóloga a la pirrolina-5'-carboxilato deshidrogenasa de *Synechocystis sp.* (40% de identidad) y deshidrogenasas como la del ácido succínico, acetaldehído, gliceraldehído, etc, por lo que en estas posiciones se localizó el posible dominio de la actividad P5CDH de la proteína PutA (**Figura 24**), actividad que es responsable de la oxidación de la P5C a glutamato. Dentro de este dominio cabe destacar la presencia de los residuos E-880 y C-914 (**Figura 24**) que se encuentran conservados en todas las aldehído deshidrogenasas. Los aminoácidos situados entre las posiciones 905 y 917 de la proteína PutA de *P. putida* presentaron el consenso SAFDSAGQCSAL (Straub *et al.*, 1996) que forma parte del centro catalítico de todas las deshidrogenasas. En el dominio de la actividad P5CDH entre los residuos 830 y 854 se encontró el motivo

GXGX<sub>3</sub>GX<sub>13</sub>FTGST propuesto como motivo de unión al NAD<sup>+</sup> en la familia de las aldéhidoo deshidrogenasas (Hempel *et al.*, 1993).

Fuera de los dominios PDH y P5CDH, entre los aminoácidos 225 y 355 se localizó un motivo de unión a la pirrolina-5'-carboxilato que está presente en gran parte de las pirrolinas-5'-carboxilato reductasas y que en la proteína PutA podría estar involucrado en la unión con la P5C para su oxidación (Ling *et al.*, 1994).

La proteína PutA no presenta alternancia de dominios hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de su secuencia aminoacídica ya que no se trata de una proteína integral de membrana, sin embargo las regiones comprendidas entre los aminoácidos 158-167, 767-817 y 1205-1220 tienen un fuerte carácter hidrofóbico. Está descrito que la proteína PutA de *E. coli* se asocia a la membrana citoplasmática para acoplarse a la cadena transportadora de electrones donde es activa enzimáticamente (Ekena *et al.*, 1990), por lo que las regiones de carácter fuertemente hidrófobo anteriormente citadas, podrían estar involucradas en la asociación de la proteína PutA a la membrana citoplasmática.

Resultados

	*	20	*	40	*	60	*	
<i>P.putida</i>	:	MATTTLVGKLLDDPTRERLKAAAQSIDRTPHWLIKQAI	FNYLEKLEGGATLTELNGHASN	PADDAGEVQA-	:	69		
<i>K.aerogen.</i>	:	MGTTTMMGKLLDDATRERIKSAASRIDRTPHWLIKQAI	FNYLEKLENDELPEL	PALLSGAANESDDASEP	:	70		
<i>E.coli</i>	:	MGTTTMMGKLLDDATRERIKSAATRDRTPHWLIKQAI	FSYLEQLENSDTLPEL	PALLSGAANESDEAFTP	:	70		
<i>S.typhim.</i>	:	MGTTTMMGKLLDDATRERIKMAASRIDRTPHWLIKQAI	FSYLDKLENSDTLPEL	PALFVGAANESEEPVAP	:	70		
<i>A.tumefa.</i>	:	-----	MADGASKADVNP	:	12			
<i>S.melilo.</i>	:	-----	MSPNPLQKPA	:	10			
	80	*	100	*	120	*	140	
<i>P.putida</i>	:	-DHSHQCFLEFAESILPQSVLRS	AITAAYRRRPEQEVVPM	LLEQARLSAPLADATNK	LAAASIAEKLNRQKS	:	138	
<i>K.aerogen.</i>	:	TEEPYQPFLEFAEQILPQSVRRA	AITAAYRRRPEDAVPM	LLEQARLPQLPGEQAHK	LAYQLAEKLNRQKT	:	140	
<i>E.coli</i>	:	AEEP HQPFLDFAEQILPQSVS	RAAITAAYRRRPETEAVS	MLEQARLPQPVAEQAHK	LAYQLADKLNRQKN	:	140	
<i>S.typhim.</i>	:	QDEPHQPFLEFAEQILPQSVS	RAAITAAYRRRPEDAVSM	LMEQARLSPPVAEQAHK	LAYQLAEKLNRQKS	:	140	
<i>A.tumefa.</i>	:	QQTVNGIFQNFAPPVREQS	PLRKAITAAYRRRPEECL	APLIDAAATVTP	EQAAAIRTTATK	LIEALRAKTK	:	82
<i>S.melilo.</i>	:	IDAAPAPFADFAPPVVRPQ	STLRAITAAYRRRPE	TECLPPLVEAATQ	SKEIRDAASTARK	LIEALRGKHS	:	80
	*	160	*	180	*	200	*	
<i>P.putida</i>	:	VGGRAGIVQGLLQEFSLSSQE	-RRGVCLAEALLRIPDK	TRDALIRDKISTGNWQ	PHLGNPSPLFVNAAT	:	207	
<i>K.aerogen.</i>	:	ASGRAGMVQSLQEFSLSSQ	EGVALMCLAEALLRIPDK	ATRDALIRDKISNGNW	QSHIGRSPSLFVNAAT	:	210	
<i>E.coli</i>	:	ASGRAGMVQGLLQEFSLSS	QEGVALMCLAEALLRIPDK	ATRDALIRDKISNGNW	QSHIGRSPSLFVNAAT	:	210	
<i>S.typhim.</i>	:	ASGRAGMVQGLLQEFSLSS	QEGVALMCLAEALLRIPDK	ATRDALIRDKISNGNW	QSHIGRSPSLFVNAAT	:	210	
<i>A.tumefa.</i>	:	GTG----	VEGLVQEYSLSSHEGVAL	MCLAEALLRIPD	TATRDALIRDKI	ARGDWKSHIGGRS	L FVNAAT	148
<i>S.melilo.</i>	:	GSG----	VEGLVQEYSLSSQEGVAL	MCLAEALR	PVIRIPD	TATRDALIRDKI	ADGNWKSHLGRS	L FVNAAT
	220	*	240	*	260	*	280	
<i>P.putida</i>	:	WGLLFTGKLVSTHNETGLT	SSSLTRIIIGKS	GPEMIRKGVDMAMRL	MGEQFVTGETIAEAL	ANASRFEAKGF	:	277
<i>K.aerogen.</i>	:	WGLLFTGKLVSTHNETSL	SRSLNRIIGKS	GPELIRKGVDMAMRL	MGEQFVTGETIAEAL	ANARKLEEKGF	:	280
<i>E.coli</i>	:	WGLLFTGKLVSTHNEASL	SRSLNRIIGKS	GPELIRKGVDMAMRL	MGEQFVTGETIAEAL	ANARKLEEKGF	:	280
<i>S.typhim.</i>	:	WGLLFTGRLVSTHNEANL	SRSLNRIIGKS	GPELIRKGVDMAMRL	MGEQFVTGETIAQ	ALANARKLEEKGF	:	280
<i>A.tumefa.</i>	:	WGLVITGKLTSTVND	SGLSAALTKLI	ARAGEPVIRRGVDMAM	RMMDQFVTGETI	GEAIKRSKPLEEQGF	:	218
<i>S.melilo.</i>	:	WGLVVTGKLTSTVNDRT	LAARVTRLISRC	GPEVIRRGVDMAM	RMMDQFVTGETI	-EALKRSKELEEKGF	:	215
	*****	300	*	320	*	340	*	
		*****		GxGxxxG		*****		
<i>P.putida</i>	:	RYSYDMLGEAALTEHDAQ	KYLASYEQAIHSIGK	ASHGRGIYEGPGISIK	L SALHPRYSRAQY	ERVMEEELY	:	347
<i>K.aerogen.</i>	:	RYSYDMLGEAALTAADAQ	AYMVSYYQAIHAIGK	ASNGRGIYEGPGISIK	L SALHPRYSRAQY	DRVMEEELY	:	350
<i>E.coli</i>	:	RYSYDMLGEAALTAADAQ	AYMVSYYQAIHAIGK	ASNGRGIYEGPGISIK	L SALHPRYSRAQY	DRVMEEELY	:	350
<i>S.typhim.</i>	:	RYSYDMLGEAALTAADAQ	AYMVSYYQAIHAIGK	ASNGRGIYEGPGISIK	L SALHPRYSRAQY	DRVMEEELY	:	350
<i>A.tumefa.</i>	:	QYSYDMLGEAATTA	KDAERYKDYENAI	HAIGKASAGRGIY	GGPGISIKL	SALHPRYARVQA	ERVMAELL	288
<i>S.melilo.</i>	:	SYSYDMLRE-RT	TAADAERYRDE	ESAIHATAKPR	-GRGIYEGPGISIK	L SALHPRYR--QA	ARVMGELL	281
	360	*	380	*	400	*	420	
<i>P.putida</i>	:	PRLLSLTLLAKQYDIGLNI	DAEEADRLEISLDL	LERLCFEP	SLAGWNGIGFVIQAY	QKRCPLYIN	YFFDL	417
<i>K.aerogen.</i>	:	PRLKSLTLLARQYDIGI	NI DAEEADRLEISLDL	LEKLCFEP	ELAGWNGIGFVIQAY	QKRCPFV	IDYLI DL	420
<i>E.coli</i>	:	PRLKSLTLLARQYDIGI	NI DAEEADRLEISLDL	LEKLCFEP	ELAGWNGIGFVIQAY	QKRCPLV	IDYLI DL	420
<i>S.typhim.</i>	:	PRLKSLTLLARQYDIGL	NI DAEEADRLEISLDL	LEKLCFEP	ELAGWNGIGFVIQAY	QKRCPLV	IDYLV DL	420
<i>A.tumefa.</i>	:	PRVKSLMLLSKKYDIGL	NI DAEEADRLEISLDL	LEELALDKD	L AGWNGIGFVVQAY	GRRCPFV	LDYI DL	358
<i>S.melilo.</i>	:	PRVKALALLAKNYDIGL	NI DAEEADRLEISLDL	LEVLCLDGD	L SGWNGMGFVVQAY	GKRCPFV	LDFI DL	351
	*	440	*	460	*	480	*	
<i>P.putida</i>	:	AKRTPHRLIIRLLK	GAYWDSEIKRAQ	VEGLEGYPVYTRK	VYTDVSYVACARK	L LAVPEAIYPQ	FATHNAH	487
<i>K.aerogen.</i>	:	ATRSRRRLMIRLVK	GAYWDSEIKRAQ	MEGLEGYPVYTRK	VYTDVSYLACAK	L LAVPNLIYPQ	FATHNAH	490
<i>E.coli</i>	:	ATRSRRRLMIRLVK	GAYWDSEIKRAQ	MDGLEGYPVYTRK	VYTDVSYLACAK	L LAVPNLIYPQ	FATHNAH	490
<i>S.typhim.</i>	:	ASRSRRRLMIRLVK	GAYWDSEIKRAQ	MEGLEGYPVYTRK	VYTDVSYLACAK	L LAVPNLIYPQ	FATHNAH	490
<i>A.tumefa.</i>	:	AQRAGRIMVRLVK	GAYWDAEIKRAQ	VDGLEDFFVTRK	VHTDVSYIACARK	L LAARDVVFPQ	FATHNAQ	428
<i>S.melilo.</i>	:	ARRSGRRIMVRLVK	GAYWDAEIKRAQ	LDGLADFPVTRK	IHTDVSYMPRT	QAACRDRCGV	-PQFATHNAQ	420
	500	*	520	*	540	*	560	
<i>P.putida</i>	:	TLSAIYHLAGQNYYPG	QYEFQCLHGMGEPLYE	QVVGKIADGKLN	RPCRYAPVGT	HETLLAYL	VRRLL EN	557
<i>K.aerogen.</i>	:	TLLAIYQLAGQNYYPG	QYEFQCLHGMGEPLYE	QVVGKQVADGKLN	RPCRYAPVGT	HETLLAYL	VRRLL EN	560
<i>E.coli</i>	:	TLLAIYQLAGQNYYPG	QYEFQCLHGMGEPLYE	QVTKVADGKLN	RPCRYAPVGT	HETLLAYL	VRRLL EN	560
<i>S.typhim.</i>	:	TLLAIYHLAGQNYYPG	QYEFQCLHGMGEPLYE	QVTKVADGKLN	RPCRYAPVGT	HETLLAYL	VRRLL EN	560
<i>A.tumefa.</i>	:	SMATIYHLAGPDK	FDYEFQCLHGMGEPLYE	VVGK---K	KLDRPCRYAPVGT	HETLLAYL	VRRLL EN	495
<i>S.melilo.</i>	:	TLLAIYHMAGKDFH	VGVKYEFC	LHGMGEPLYE	EVVGR---G	KLDRPCRYAPVGT	HETLLAYL	VRRLL EN

```

*          580          *          600          *          620          *
P.putida : GANTSFVNRIADHSISIQELVADRWPASIAVWPRKGSIGLPHPRIPLPRDLYGTERAKLAGIEMANEHRL : 627
K.aerogen. : GANTSFVNRIADNTLPLDELVADPVSAVEKLAQQEGQAGLPHPKIPLPRDLYGSGRSNSAGLDLANEHRL : 630
E.coli : GANTSFVNRIADTSLPLDELVADPVTAVEKLAQQEGQTGLPHPKIPLPRDLYGHGRDNSAGLDLANEHRL : 630
S.typhim. : GANTSFVNRIADATLPLDELVADPVEAVEKLAQQEGQAGIHPKIPLPRDLYGEGRINSAGLDLANEHRL : 630
A.tumefa. : GANSSFVNRIADPAVPVASLLEDPVTVVKAYP----VPGARHDRIAAPAGLFGPERANSAGLDLSNETAL : 561
S.melilo. : GANSSFVHRINDPKVSIDELIADPVEVVRAMP----VVC AKHDRIALFAVLFGDARTNSAGFDLSNEETL : 553
    
```

```

          640          *          660          *          680          *          700
P.putida : GLLSCAMVATAHKQWEAAPLLACAARESAAAPVLNPNADHRNVVGHVQEAATVAKFDNAIHCALNPAPIWQA : 697
K.aerogen. : ASLSSLLNSALHKWQALPMLQEPVAEGEMQPVVNPAPKDI VGYVREASDAEVQQALTSAINNAPIWFA : 700
E.coli : ASLSSALLNSALQKQWQALPMLQEPVAAGEMSPVINPAPKDI VGYVREATPREVEQALSAVNNAPIWFA : 700
S.typhim. : ASLSSALLSNAMQKQWQAKPVLEQPVADGEMTPVINPAPKDI VGWGREATESEVEQALQNAVNPAPVWFA : 700
A.tumefa. : AALDNVLKAGATTEWKA----AAPHAGGKTRPVLNPGDHNDV VGYVTEPTHEADVEAAMQRAASN--WSS : 625
S.melilo. : ASLTEALRESAAMKWTALPQFATGPAAGETRTRVLNPGDHRDVG SVTE TRKRTHGAPCACRRRGA--GLG : 621
    
```

```

*          720          *          740          *          760          *
P.putida : TPPAERAAI IERTADLMEAEIHPLMGLLIREAGKTFPNAIAELREAVDFLRYAVQALNDFSNDAHRPLG : 767
K.aerogen. : TPPQERAAI IERAAVLMESQMP TLMGILVREAGKTF SNAIAEVREAVDFLHYAGQVRDDFDNETHRPLG : 770
E.coli : TPPAERAAI I HRAAVLMESQMQQI IGLVREAGKTF SNAIAEVREAVDFLHYAGQVRDDFDNETHRPLG : 770
S.typhim. : TPPQERAAI IQRAAVLMEDQMQLI GLLVREAGKTF SNAIAEVREAVDFLHYAGQVRDDFDNETHRPLG : 770
A.tumefa. : TPVEERAAC IERAAADRMAEMP ALLGLIMREAGKSM PNAIAEVREAVDFLRYAAEARKTFKANET-PLG : 694
S.melilo. : GRLAERAAI LDRAAELMQARMPTLLGLI IREAGKSALNAIAEVREAVDFLRYAAEQTRRTL--GPATPLG : 689
    
```

```

          780          *          800          *          820          *          840
P.putida : PVVCI SPWNFP LAIF TGQVA AALAAGN PVI AKPAEQ TPLIAA QAVRL LLEAG IPEGVLQLLPGRGETVGA : 837
K.aerogen. : PVVCI SPWNFP LAIF TGQIA AALAAGN SVLAKPAEQ TPLIAA QGVAILLEAGVPPGVVQLLPGRGETVGA : 840
E.coli : PVVCI SPWNFP LAIF TGQIA AALAAGN SVLAKPAEQ TPLIAA QGIIALLLEAGVPPGVVQLLPGRGETVGA : 840
S.typhim. : PVVCI SPWNFP LAIF TGQIA AALAAGN SVLAKPAEQ TPLIAA QGIIALLLEAGVPPGVVQLLPGRGETVGA : 840
A.tumefa. : PVVCI SPWNFP LAIF TGQVA AALAAGN PVI AKPAEQ TPLIAA QGVRL LLEAG VVQDAVQLLPGRGETVGA : 763
S.melilo. : I T IA V P E P EGVRI R I ASAL D R-V : 758
    
```

xxxxxxxxxxxxFTGST

```

*          860          *          880          *          900          *
P.putida : G V GDERVKG R L RNV G LDNQ R I Q TE I VS : 907
K.aerogen. : A TSDERVRG T L RNI S LDPQ R T M TE I LA : 910
E.coli : Q TGDDRVRG T L RNI S LDAQ R I M TE V LA : 910
S.typhim. : Q TADARVRR T L RNI T LDAQ R I M TE V LA : 910
A.tumefa. : A VGSALTAG R I GQL G VLAN Q V Q AE A IA : 833
S.melilo. : A VAGR-DAG R I AQL L LSPA R V Q AG G IT : 827
    
```

^^^^^^^^^^

```

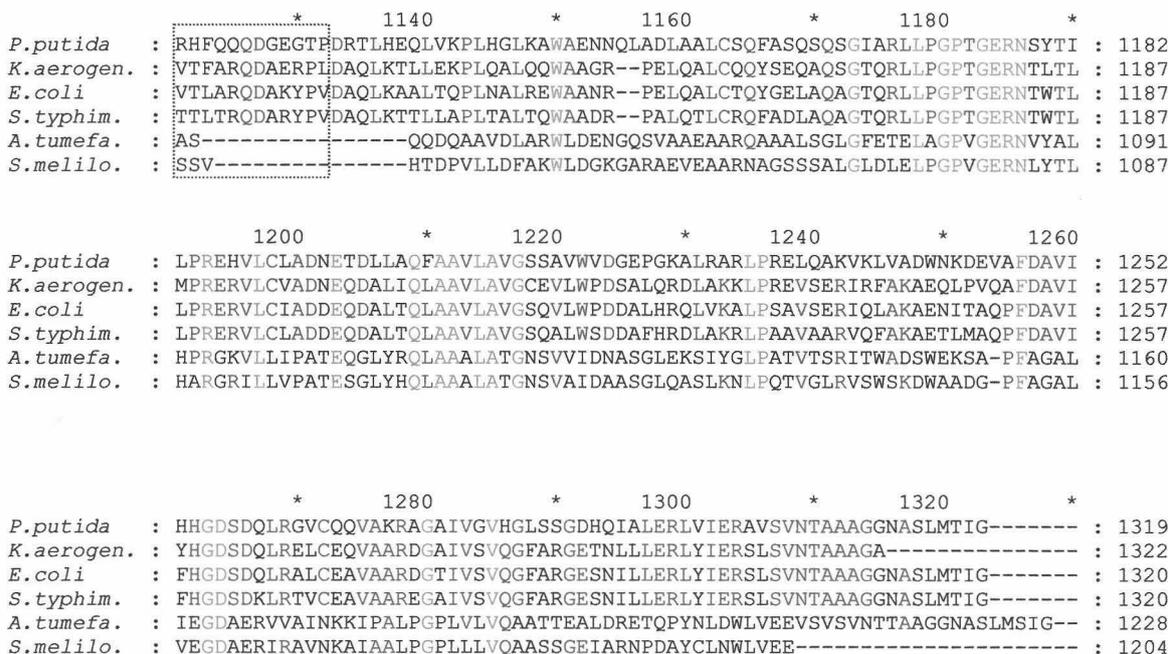
          920          *          940          *          960          *          980
P.putida : V EDS DRVIEMLK AMAESRLGCPDRL-AV I DA AG K IQG EK : 976
K.aerogen. : V EEV DHTLTMLR AMSECRMGNPGR-LTT I DA EN R IQA AK : 979
E.coli : V DEI DHTLKMLR AMAECRMGNPGR-LTT I DS AN R IQT SK : 979
S.typhim. : V DDI EHTLKMLR AMAECRMGNPGR-LTT I DS AN R IQT AK : 979
A.tumefa. : I EDV DRTLMLK ALHELIRIGRTDSL-SV V TA GI K VDS AL : 902
S.melilo. : V EDV GHPDDAE RAARHCISAAPVFSV V TS DN K IER GL : 897
    
```

```

*          1000          *          1020          *          1040          *
P.putida : RPVY VA---IAD A IKR M L LDSFDE KR I V YN RN DQ IEQI NS : 1043
K.aerogen. : RTVY AVRENSED R WRH P L LDSFDE KK V V YN NE DK VEQI AS : 1049
E.coli : RPVF AVRENSED R WQS A L LDDFAE QK V V YN NQ PE IEQI AS : 1049
S.typhim. : RPVF AARENSDD Q WQT M L LENFAE EK V V YN NQ AE IEQI AS : 1049
A.tumefa. : HRIE IS-----L G TGK P I MKSLAD KK V I FK DN DR IDEI AT : 967
S.melilo. : RKVE IG-----L S TGV P I LEKLSD QR V I YR DD DR VDDV AT : 962
    
```

```

          1060          *          1080          *          1100          *          1120
P.putida : L V I E AK VETATPATCRH- IV E Y LLSTR ADAIG : 1112
K.aerogen. : L V I E AQ TGSAKVGNLYVN MV E Y LLSSR QDAVG : 1119
E.coli : L V I E AQ TGSAHVGNLYVN MV E Y LLANR ESALA : 1119
S.typhim. : L V I E AQ TGSAHVGNLYVN MV E Y LLAHR PNALN : 1119
A.tumefa. : F L L D QH LSRVAAGNLYVN II R G VTQTA KIDRV : 1037
S.melilo. : F L L E AH TSRIKAGNLYIN II R G LVTTA VPPQH : 1032
    
```



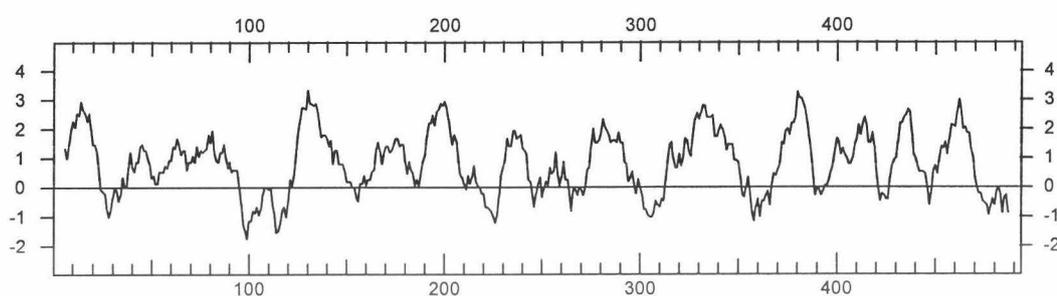
**Figura 24. Alineamiento múltiple de proteínas Prolina deshidrogenasa/pirrolina 5'carboxitato deshidrogenasa de distintos organismos.** Las proteínas alineadas pertenecen a los organismos *P. putida* (AF153207), *K. aerogenes* (AF038838), *E. coli* (D90738), *S. typhimurium* (X70843), *A. tumefaciens* (U39263) y *S. meliloti* (Y08500). El alineamiento de la proteína PutA de *P. putida* KT2440 con proteínas PutA de otros organismos se realizó mediante los programas ClustalW y GeneDoc. En color rojo se muestran aquellos aminoácidos presentes en un 100% de las secuencias alineadas y en color azul se muestran aquellos aminoácidos presentes en esa posición al menos en un 60% de las secuencias. Sobre la figura se marcan los dominios de las dos actividades enzimáticas de la proteína PutA. El dominio de la actividad PDH se muestra recuadrado con trazo continuo entre las posiciones 312 y 592 (aminoácidos 289-588 de la proteína PutA de *P. putida*), mientras que el dominio de la actividad P5CDH se muestra recuadrado con trazo discontinuo entre las posiciones 645 y 1032 (aminoácidos 642-1074 de la proteína PutA de *P. putida*). La zona de unión al FAD se marca con una línea punteada entre las posiciones 315 y 357 (aminoácidos 312-354 de la proteína PutA de *P. putida*) y sobre ella se muestra el motivo consenso de unión al FAD. La zona de unión al NAD(P)<sup>+</sup> se marca mediante su consenso entre las posiciones 833 y 857 (aminoácidos 830-854 de la proteína PutA de *P. putida*). La zona propuesta como centro catalítico de las deshidrogenasas se señala mediante una línea de ángulos en las posiciones 908 y 920 (aminoácidos 905-917 de la proteína PutA de *P. putida*). La zona propuesta de unión al P5C o su semialdéhido se marca con una línea de asteriscos de color verde entre las posiciones 259 y 288 (aminoácidos 225-355 de la proteína PutA de *P. putida*).



	220	*	240	*	260	*	280	
<i>P.putida</i>	: GFDQTFAAI----	EAVNRRNFDMLKGF	FIGIISLMGWGLGY	FRPPHILARFMAADSVNSIAKARRISMT	: 274			
<i>P.fluore.</i>	: GVDTTFLAI----	EAKDPTSF	DKLNTTF	FIGIISLMGWGLGY	FGQPHILARFMAADSVKSIKARRISMT	: 276		
<i>E.coli</i>	: FFGDSLEVI----	KQKSIENVDMLKGLNFVAIISLMGWGLGY	FGQPHILARFMAADSHHSIVHARRISMT	: 276				
<i>S.typhim.</i>	: GFSESLEVI----	KQKSIENVDMLKGLNFVAIISLMGWGLGY	FGQPHILARFMAADSHHSIVHARRISMT	: 276				
<i>R.typhi</i>	: GFSESLEVI----	KQKSIENVDMLKGLNFVAIISLMGWGLGY	FGQPHILARFMAADSHHSIVHARRISMT	: 276				
<i>H.influe.</i>	: DTAQFSAVLEQAEAAVNKDF	DLFTSTT	PLGLLSIAAWGLGY	FGQPHILARFMAADSVKSLIKARRISMG	: 280			
<i>B.subtil.</i>	: GVAPTfHEI----	DAVNPHLLDI	FKGASVISIISYLAWGLGY	QPHIIVRFMAIKDIKDLKPARRIGMS	: 274			
		*	300	*	320	*	340	*
<i>P.putida</i>	: WMILCLAGTCAVGF	CGIAYFSAHPELAGPV	SENH	KRVFIELAKILFNP	PWVAGVLLSAILA	AVMITLSCQL	: 344	
<i>P.fluore.</i>	: WMILCLGGTVAVG	FFGIAYFSAHPEVAG	PVTENPERV	FIELAKILFNP	PWVAGVLLSAILA	AVMSTLSCQL	: 346	
<i>E.coli</i>	: WMILCLAGAVAVG	FFGIAYFNDHPALAGAV	NQNAERVF	IELAQILFNP	PWIAGILLSAILA	AVMSTLSCQL	: 346	
<i>S.typhim.</i>	: WMILCLAGAVAVG	FFGIAYFNNNPALAGAV	NQNSERV	FIELAQILFNP	PWIAGVLLSAILA	AVMSTLSCQL	: 346	
<i>R.typhi</i>	: WMILCLAGAVAVG	FFGIAYFNNNPALAGAV	NQNSERV	FIELAQILFNP	PWIAGVLLSAILA	AVMSTLSCQL	: 346	
<i>H.influe.</i>	: WMVLCLAGAIGIGL	FAIPYFFANPAIAGT	VNREPEQV	FIELAKLLENP	PWIAGILLSAILA	AVMSTLSAQL	: 350	
<i>B.subtil.</i>	: WMIITVLG	SVLTGLIGVAYAHK----	FGVAVKDEPEMIF	IIFSKILFHPLITG	FLLSAILA	AIMSSISSQL	: 340	
		*	360	*	380	*	400	*
<i>P.putida</i>	: LVCSSAL	TENFYKAFLRKNASQ	VELVWVGRMLV	LAVALIAIAMAANPENR	VLGLVYAWAGFGAA	FGPVV	: 414	
<i>P.fluore.</i>	: LVCSSAL	TEDFYKAFLRKGASQ	RELVWVGRMLV	LVVALIAIAMAANPENR	VLGLVSYAWAGFGAA	FGPVV	: 416	
<i>E.coli</i>	: LVCSSAI	TEDLYKAFLRKHASQ	KELVWVGRVMV	LVALIALAANPENR	VLGLVSYAWAGFGAA	FGPVV	: 416	
<i>S.typhim.</i>	: LVCSSAI	TEDLYKAFLRKSASQ	QELVWVGRVMV	LVALIALAANPDNR	VLGLVYAWAGFGAA	FGPVV	: 416	
<i>R.typhi</i>	: LVCSSAI	TEDLYKAFLRKSASQ	QELVWVGRVMV	LVALIALAANPDNR	VLGLVYAWAGFGAA	FGPVV	: 416	
<i>H.influe.</i>	: LISSS	ITEDFYKGFIRPNASE	KELVWLGRIMV	LVI AALAIWIAQDEN	SKVLKLVFAWAGFGS	AFGPVV	: 420	
<i>B.subtil.</i>	: LVTASAV	TEDLYRSFRRKASD	KELVMIGRLSVL	VI AVIAVLLSLNPN	STILDVGYAWAGFGS	AFGPAI	: 410	
		*	440	*	460	*	480	*
<i>P.putida</i>	: LISVLW	KGMTRNGALAGIV	VGALTVILWKN	FDTLGLYEIIPGF	LFASIAIVLVSKL	GSPSQTMVKRFEAA	: 484	
<i>P.fluore.</i>	: LISVIW	KHMTRNGALAGIL	VGAI	TVIVWKHFELLGLYEIIPGF	IFASLAIYFVSKM	GAPTLMGVERFDAA	: 486	
<i>E.coli</i>	: LFSVM	WSRMTRNGALAGMI	I	GALTVIVWKQFGLGLYEIIPGF	IFGSIGIVVFSLLG	KAPSAAMQKRF	FAE : 486	
<i>S.typhim.</i>	: LFSVM	WSRMTRNGALAGMI	I	GAVTVIVWKQYGLDLYEIIPGF	IFGSIVIVLFSLLG	KAPSAAMQER	FAK : 486	
<i>R.typhi</i>	: LFSVM	WSRMTRNGALAGMI	I	GAVTVIVWKQYGLDLYEIIPGF	IFGSLGIVIFSLLG	KAPTATMQER	FAK : 486	
<i>H.influe.</i>	: LFSL	FWRMTSSGAMAGML	VGAVTVFAWKE	VVPADTDWFKVYEMIPGF	AFASLAIIVISLLS	KNKPEQDIL	: 490	
<i>B.subtil.</i>	: LLSLY	WKRMTNEWGALAAM	IVGAATVLIWIT	TGLAKSTGVYEIIPGF	ILSMIAGIIVSMIT	KRP	AKASYRL : 480	
			500					
<i>P.putida</i>	: DAAYHADK-----	: 492						
<i>P.fluore.</i>	: EKDYNLNK-----	: 494						
<i>E.coli</i>	: ADAHYHSAPPSRLQES--	: 502						
<i>S.typhim.</i>	: ADA-----	: 489						
<i>R.typhi</i>	: ADA-----	: 489						
<i>H.influe.</i>	: NTFDKAEKAYKEAK----	: 504						
<i>B.subtil.</i>	: FGVMEKLLKRRK-----	: 492						

**Figura 25. Alineamiento múltiple de proteínas prolina permeasa de distintos organismos.** Las proteínas alineadas corresponden a las citadas en la Tabla 8. El alineamiento de la proteína PutP de *P. putida* KT2440 con proteínas PutP de otros organismos se realizó con los programas ClustalW y GeneDoc. En color rojo se muestran aquellos aminoácidos presentes en un 100% de las secuencias alineadas y en color azul se muestran aquellos aminoácidos presentes en esa posición al menos en un 60% de las secuencias. El sitio de procesamiento predicho por el programa SignalP se indica con una flecha.

El análisis de hidropatía de la proteína PutP mediante el método propuesto por Kyte y Doolittle (1982) mostró que era una proteína fuertemente hidrofóbica tal y como se muestra en la **Figura 26**, lo que está de acuerdo con su papel fisiológico de transportador de membrana. El programa SignalP, disponible en la red en la dirección que se detalla en el **apartado 10** de *Materiales y Métodos*, predijo la existencia de un péptido señal de 25 aminoácidos en el extremo aminoterminal de la proteína. Según este programa el punto de procesamiento de PutP se sitúa entre la arginina 25 y la alanina 26 tal y como se indica en la **Figura 25**.

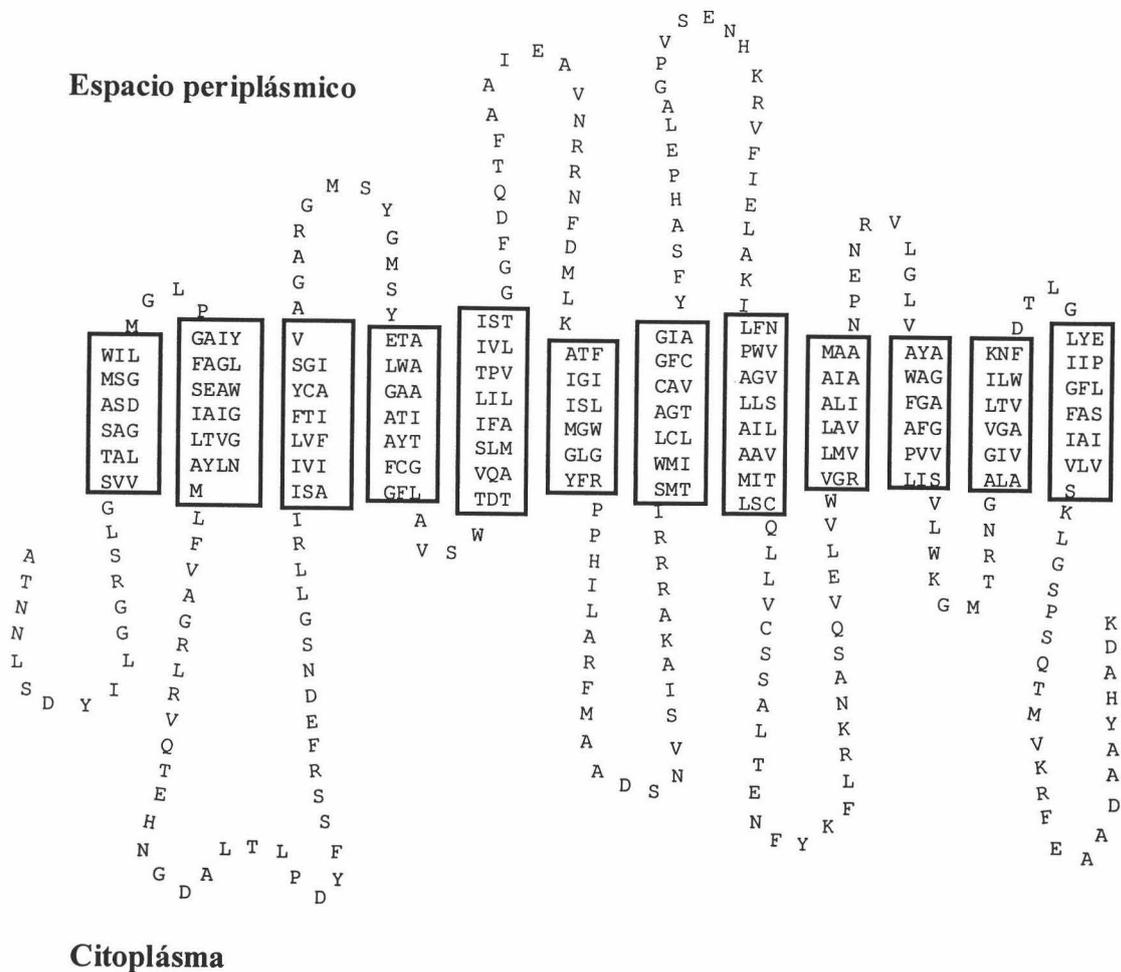


**Figura 26. Perfil de hidropatía de la proteína PutP de *P. putida* KT2440.**

El perfil de hidropatía de la proteína PutP se generó siguiendo el método de Kyte y Doolittle (1982). En el eje horizontal se indica la posición de los restos de aminoácidos de la proteína PutP. En el eje vertical se indica la hidrofobicidad relativa donde los valores positivos indican hidrofobicidad y los negativos hidrofilicidad.

La predicción de la estructura secundaria de la proteína PutP mediante el programa PredictProtein, disponible en la red en la dirección detallada en el **apartado 10** de *Materiales y Métodos*, reveló la existencia de 12 posibles alfa hélices comprendidas entre las posiciones 17-34, 39-63, 101-119, 134-154, 159-182, 206-223, 247-267, 294-317, 347-364, 375-392, 403-420 y 425-443 de la proteína madura. La

predicción de la estructura secundaria de la proteína PutP de *P. putida* permitió hacer la representación mostrada en la **Figura 27** la cual coincidió con la propuesta por Jung y colaboradores (1998) para la proteína PutP de *E. coli*.



**Figura 27. Predicción de la estructura secundaria de la proteína PutP.** La figura muestra la disposición de los aminoácidos de la proteína PutP en base a la predicción de la estructura secundaria realizada por el programa PredictProtein. Los aminoácidos enmarcados representan las 12 hélices alfa predichas por el programa, las cuales se insertan en la membrana citoplasmática. El resto de los aminoácidos se localizan en el espacio periplásmico o en el citoplasma de la bacteria.

## Capítulo II

### Estudio de la expresión de los genes del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* KT2440.

Con objeto de caracterizar el funcionamiento del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* KT2440 se diseñaron una serie de experimentos encaminados al estudio de la transcripción de los genes *putA* y *putP*. La expresión de los dos genes se abordó mediante dos estrategias distintas: una de ellas fue la medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en fusiones transcripcionales de los promotores de los genes *putA* y *putP* con el gen reportero '*lacZ*', y la otra fue la determinación de los niveles de ARN mensajero.

#### 1. Caracterización de la expresión del operón del catabolismo de la prolina mediante determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa en fusiones transcripcionales con el gen '*lacZ*'.

##### 1.1 Construcción de las fusiones transcripcionales de los promotores de los genes *putA* y *putP* con el gen reportero *lacZ*.

Como se ha mencionado con anterioridad, el operón del catabolismo de la prolina en enterobacterias consta de dos genes estructurales, *putA* y *putP*, los cuales se transcriben divergentemente a partir de la región de ADN comprendida entre ambos en donde se localizan sus promotores (Maloy *et al.*, 1983; Hahn *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1991). Dado que la organización genética del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* es similar a la de enterobacterias se asumió que la región comprendida entre los genes *putA* y *putP* de *P. putida* debía contener las regiones promotoras de ambos genes.

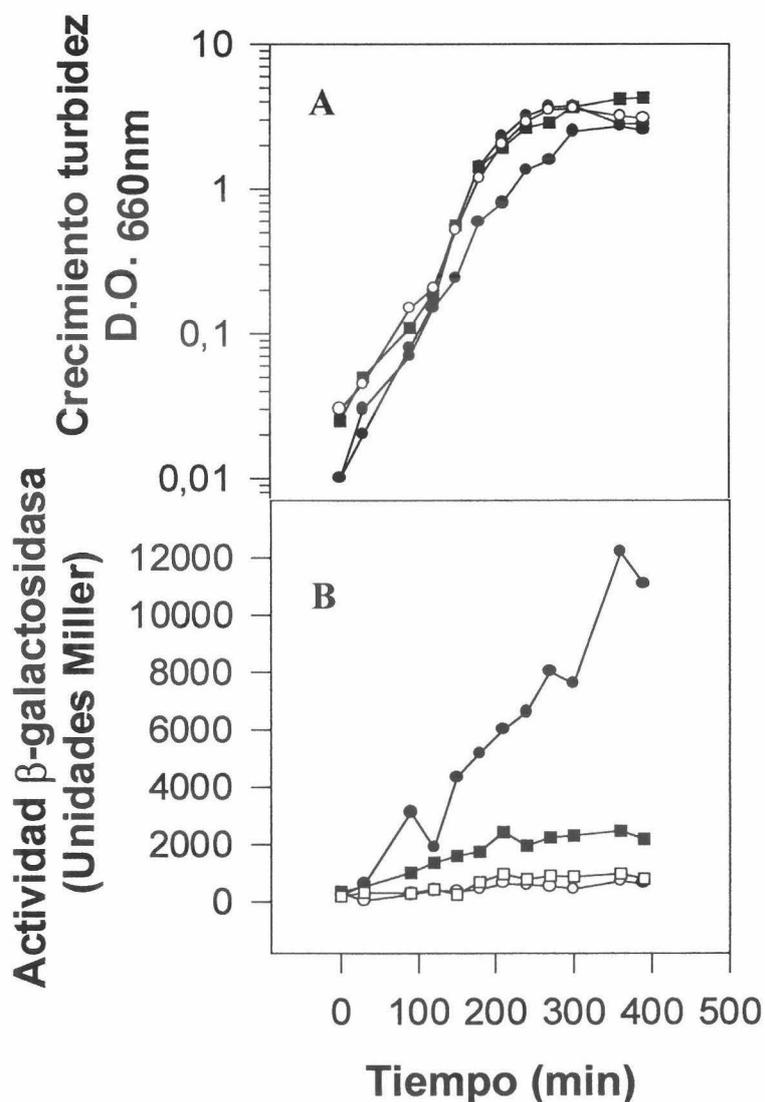
Para el estudio de la expresión de cada uno de los genes del operón *put*, se construyó una fusión transcripcional de la región situada entre los genes *putA* y *putP* al gen reportero '*lacZ*' existente en el plásmido pMP220 (**apartado 4** de *Materiales y Métodos*). La región promotora se obtuvo a partir de ADN cromosómico de *P. putida* KT2440 mediante amplificación por PCR con los cebadores AEco y PEco (**Tabla 5**). El cebador AEco es antiparalelo a la secuencia codificante del gen *putA* e híbrida con ADN localizado 60 pb corriente abajo del codón de inicio de su traducción, mientras que el

KT2440 mediante amplificación por PCR con los cebadores AEco y PEco (**Tabla 5**). El cebador AEco es antiparalelo a la secuencia codificante del gen *putA* e híbrida con ADN localizado 60 pb corriente abajo del codón de inicio de su traducción, mientras que el cebador PEco es antiparalelo a la secuencia codificante del gen *putP* y está diseñado a 40 pb corriente abajo del inicio de la traducción de dicho gen. Ambos cebadores presentan un sitio de restricción *EcoRI* en su extremo 5' añadido con el objeto de facilitar la clonación del fragmento amplificado. Tras la amplificación por PCR (**apartado 11** de *Materiales y Métodos*) de la región comprendida entre los cebadores AEco y PEco con una temperatura de hibridación de 56°C se obtuvo un fragmento de aproximadamente 0,5 kb el cual se digirió con *EcoRI*. Dicho fragmento se ligó al vector pMP220 previamente digerido con la misma enzima y el producto de la ligación se transformó en *P. putida* mediante electroporación tras lo cual, las células se sembraron en placas de medio rico LB con tetraciclina y X-gal. Después de 12 horas de incubación a 30°C se seleccionaron, para su posterior análisis, aquellas colonias que presentaban una coloración azul consecuencia de la expresión del gen '*lacZ*'. Dado que la expresión del gen '*lacZ*' podía tener lugar a partir del promotor del gen *putA* o a partir del promotor del gen *putP* se determinó la orientación del inserto *EcoRI* mediante PCR de colonia usando los cebadores AEco ó PEco diseñados en el inserto y el cebador OslacZ diseñado en base a la secuencia del gen '*lacZ*' del plásmido pMP220. Se eligieron dos plásmidos recombinantes, pMIS5 para la fusión de la región promotora del gen *putA* con el gen '*lacZ*' (fusión *PputA::'lacZ*) y pMIS12 para la fusión de la región promotora del gen *putP* con el gen *lacZ* (fusión *PputP::'lacZ*). Los plásmidos pMIS5 y pMIS12 se utilizaron para todos los estudios de expresión que se describen en los siguientes apartados.

### **1.2 Estudio de la expresión de los promotores *PputA* y *PputP* en medios con y sin prolina a lo largo del tiempo.**

Está descrito en enterobacterias y otros organismos como *S. meliloti*, *R. capsulatus* que los genes *putA* y *putP* se inducen por la presencia de prolina en el medio de cultivo (Ratzkin *et al.*, 1978b; Chen *et al.*, 1991; Jiménez-Zurdo *et al.*, 1995; Keuntje *et al.*, 1995). Con objeto de averiguar si la inducción por prolina tiene también lugar en *P. putida*, se realizaron una serie de curvas de actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas de *P. putida* KT2440 portadoras de los plásmidos pMIS5 y pMIS12. Células de *P. putida*

dividió en dos fracciones alícuotas, a una de las cuales se le añadió 20 mM de prolina mientras que a la otra se le añadió 20 mM de succinato con objeto de igualar la cantidad de fuente de carbono en las dos fracciones. A intervalos de una hora se determinó la turbidez del cultivo y la actividad  $\beta$ -galactosidasa de cada cultivo. En la **Figura 28** se muestra el crecimiento bacteriano (panel A) y los niveles de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (panel B) a lo largo del tiempo. La actividad  $\beta$ -galactosidasa que presentaron las células de *P. putida* (pMIS5) y *P. putida* (pMIS12) cultivadas en presencia de prolina fue en todo momento superior a la actividad de las mismas cultivadas en ausencia de este aminoácido, sin embargo se observó que la cepa *P. putida* (pMIS5) en condiciones de inducción, alcanzó un valor máximo de 12.000 Unidades Miller, mientras que la cepa *P. putida* (pMIS12) en estas mismas condiciones no superó las 2.500 Unidades Miller.



**Figura 28. Crecimiento y actividad  $\beta$ -galactosidasa de cepas de *P. putida* con los plásmidos pMIS5 y pMIS12.** Células de *P. putida* (pMIS5) (círculos) y *P. putida* (pMIS12) (cuadrados) se cultivaron bajo las condiciones descritas en el texto y se diluyeron hasta una D.O.<sub>660 nm</sub> de 0,05 en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato. Tras 2 horas de crecimiento a 30°C, cada uno de los cultivos se dividió en dos fracciones alícuotas, a una de las cuales se añadió 20 mM de prolina (símbolos cerrados) mientras que a la otra se le añadió 20 mM de succinato (símbolos abiertos). Se determinó el crecimiento del cultivo mediante medida de la turbidez a 660 nm (panel A) y de la actividad  $\beta$ -galactosidasa a lo largo del tiempo (panel B).

### 1.3. Estudio de la inducción de los promotores *PputA* y *PputP* con distintas concentraciones de prolina.

Una vez comprobado que los promotores del operón *put* de *P. putida* KT2440 son inducibles por prolina, se decidió determinar si el nivel de inducción de los promotores era o no dependiente de la cantidad de prolina existente en el medio de cultivo. Para ello se cultivaron células de *P. putida* (pMIS5) y *P. putida* (pMIS12) en medio rico LB durante 12-14 h, tras lo cual se diluyeron hasta una turbidez de 0,05 en 15 mL de medio mínimo M9 con 20 mM de succinato. Tras 3 h de crecimiento a 30°C, cada cultivo se dividió en 5 fracciones alícuotas de 3 mL, a cuatro de las cuales se le añadió 5, 20, 50 y 100 mM de prolina respectivamente, permaneciendo la quinta fracción como control negativo de la inducción. Después de 2 h más de incubación a 30°C se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cultivos inducidos y sin inducir. En la **Figura 29** se muestran los valores de la actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenidos. Las fusiones transcripcionales *PputA::lacZ* y *PputP::lacZ* presentaron en ausencia de prolina unos valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa de 350 y 700 Unidades Miller respectivamente mientras que los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa en los cultivos a los que se añadió prolina a concentraciones de 5, 20, 50 y 100 mM mostraron valores similares entre sí y en torno a las 4000 y 1800 Unidades Miller respectivamente. A partir de estos valores se determinó que la adición de prolina al medio aumenta 10 veces la expresión de la construcción *PputA::lacZ* y 2,6 veces la expresión de la construcción *PputP::lacZ*.

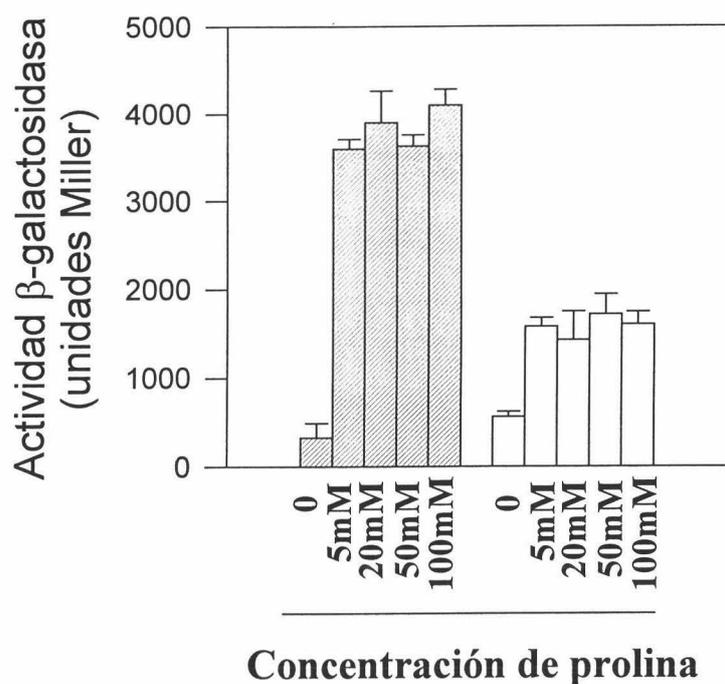
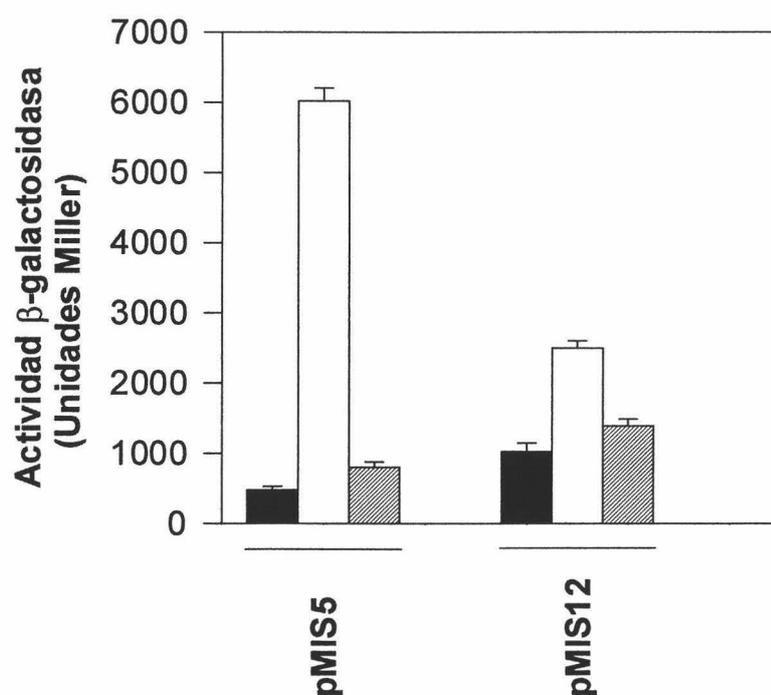


Figura 29. Expresión de los promotores *PputA* y *PputP* con distintas concentraciones de prolina. Se muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa de cepas de *P. putida* KT2440 portadoras de los plásmidos pMIS5 (fondo rayado) y pMIS12 (fondo blanco) cultivadas de la forma indicada en el texto con las concentraciones de prolina indicadas en la figura.

#### 1.4. Expresión de los promotores *PputA* y *PputP* en presencia de glutamato.

La acción de las dos actividades enzimáticas que posee la proteína PutA (prolina deshidrogenasa y pirrolina-5'-carboxilato deshidrogenasa) hace que la prolina se transforme de forma secuencial en  $\Delta^1$  pirrolina-5'-carboxilato y en glutamato confluyendo de esta forma la ruta catabólica de la prolina con la del glutamato (Dendinger *et al.*, 1970; Scarpulla *et al.*, 1978). Con objeto de determinar si la prolina es el único inductor de los genes del operón *put* y no un producto final de su metabolismo o del metabolismo del glutamato, se estudió la expresión de los promotores *PputA* y *PputP* en medios que contenían glutamato. Dada la gran inestabilidad de la pirrolina carboxilato en medio acuoso (Strecker 1960; Mezl *et al.*, 1976) se descartó el estudio del papel inductor de ésta.

Para estudiar el efecto del glutamato como inductor de los genes del catabolismo de la prolina, células de *P. putida* (pMIS5) y *P. putida* (pMIS12) cultivadas en medio rico LB con tetraciclina durante 12-14 h diluyeron 100 veces en 6 mL de medio mínimo M9 con 20 mM de succinato. Tras 3 h de agitación a 30°C los cultivos se dividieron en 3 fracciones alícuotas de 2 mL a una de las cuales se le añadió 20 mM de prolina y a otra 20 mM glutamato, quedando la tercera fracción como control negativo de la inducción. Dos horas después de la adición se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de los seis cultivos (**Figura 30**). Se observó que la cepa (pMIS5) cultivada en presencia de prolina presentó, una actividad  $\beta$ -galactosidasa de 6000 Unidades Miller mientras que las cultivadas en presencia de glutamato o de succinato presentaron una actividad de 600 Unidades Miller. Por otro lado la cepa de *P. putida* (pMIS12) cultivada en presencia de prolina presentó una actividad  $\beta$ -galactosidasa de 2500 Unidades Miller mientras que las cultivadas en presencia de glutamato o succinato presentaron una actividad de 1000 unidades. Estos resultados sugieren que la expresión del operón *put* está mediada por prolina y no por glutamato.

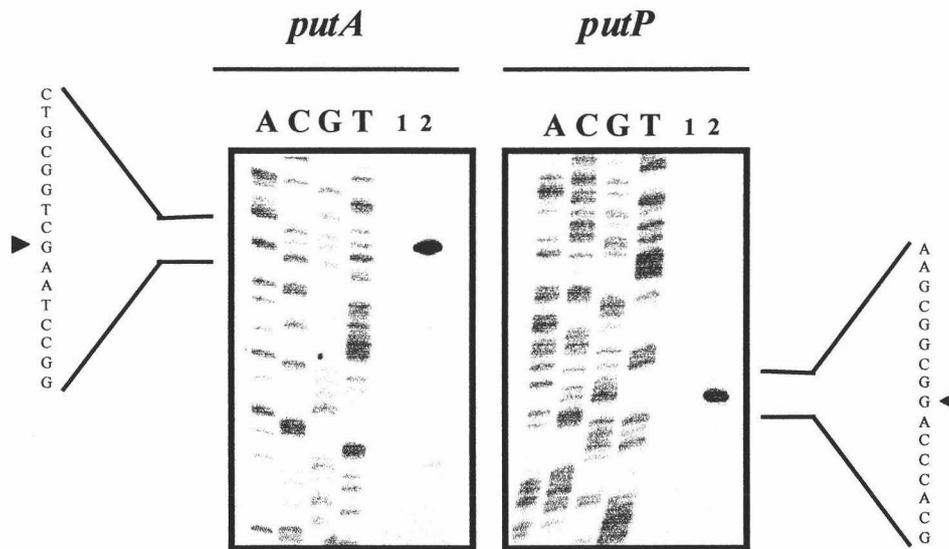


**Figura 30. Papel inductor del glutamato sobre el operón del catabolismo de la prolina.** Células de *P. putida* (pMIS5) y *P. putida* (pMIS12) cultivadas como se describe en el texto se incubaron en medio con succinato (fondo negro), en medio M9 succinato suplementado con prolina (fondo blanco) o en medio M9 succinato suplementado con glutamato (fondo rayado). Tras 2 h de incubación en estos medios se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

## 2. Caracterización de la expresión del operón del catabolismo de la prolina mediante determinación de los niveles de ARN mensajero.

### 2.1. Estudio de la inducción por prolina de los genes *putA* y *putP* de *P. putida* KT2440 y determinación del origen de transcripción de los mismos.

El estudio de la expresión de los genes *putA* y *putP* y la determinación de los orígenes de transcripción de los mismos se realizó mediante la técnica conocida como extensión reversa a partir de cebador (**apartado 12** de *Materiales y Métodos*). Para determinar el nivel de inducción de los genes *put* mediante esta técnica se cultivó *P. putida* en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato durante 12-14 h a 30°C, tras lo cual se diluyó en el mismo medio fresco hasta una turbidez a 66 nm de 0,4. Después de 2 h de incubación con agitación a 30°C, el cultivo se dividió en dos fracciones alícuotas; a una de las fracciones se añadió 20 mM de prolina, mientras que la otra permaneció como control negativo de la inducción. Tras 2 h más de incubación a 30°C se recogieron las células de los dos cultivos y se aisló el ARN total tal y como se detalla en el **apartado 12.1.** de *Materiales y Métodos*. Muestras que contenían 25µg de ARN total se extendieron a partir de los cebadores 12U1 y PEPS marcados previamente con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP]. Estos cebadores se diseñaron 310 y 200 pb corriente abajo del codón de inicio de la traducción de los genes *putA* y *putP* respectivamente y fueron complementarios a la secuencia codificante de cada gen. La electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida de los ADNc obtenidos tras la extensión se realizó en paralelo con una reacción de secuenciación del ADN situado corriente arriba del codón de inicio de la traducción de cada uno de los genes. Para esta secuenciación se usaron los mismos cebadores marcados radiactivamente que en la extensión y como molde el plásmido pLCR12 (**Figura 19**). La autorradiografía del gel obtenido (**Figura 31**) mostró una única banda de 345 pb de tamaño en el caso del gen *putA* y una única banda de 294 pb en el caso del gen *putP* en aquellos medios que contenían prolina. En las calles correspondientes a los medios sin prolina se observaron bandas de los mismos tamaños pero de una intensidad al menos 10 veces menor en el caso del gen *putA* y al menos 5 veces menor en el caso del gen *putP*.



**Figura 31. Determinación de los puntos de inicio de la transcripción de los genes *putA* y *putP* de *P. putida* KT2440 y estudio de la inducción en medios con prolina.** Se muestra el resultado de la extensión 25µg de ARN total con los cebadores 12U1 (panel *putA*) y PEPS (panel *putP*) de células cultivadas en presencia de 20 mM de prolina (calles 2) y en ausencia de prolina (calles 1). En la figura también se muestra el resultado de las secuenciaciones (calles T, G, C y A) de la zona existente entre los genes *putA* y *putP* con los cebadores 12U1 y PEPS usando como molde el plásmido pLCR12.

El punto de inicio de la transcripción de los genes *putA* y *putP* se pudo determinar mediante la comparación de los tamaños de las bandas obtenidas con las obtenidas en la secuenciación de la región intergénica. El punto de inicio de la transcripción del gen *putA* fue una citosina situada a 36 pb del codón de inicio de la traducción de este gen mientras que el inicio de la transcripción del gen *putP* fue una citosina situada a 60 pb del codón de inicio de la traducción tal y como se representan en la **Figura 32**. En posición 5' con respecto al origen de transcripción del gen *putA* se propuso la secuencia 5' GCCCTG-(N)<sub>17</sub>-AGTTCT 3' como la región promotora de dicho gen. En posición 5' con respecto al origen de transcripción del gen *putP* se propuso la secuencia 5' TTGCAC-(N)<sub>18</sub>-TAGCAT 3' como la región promotora de dicho gen.

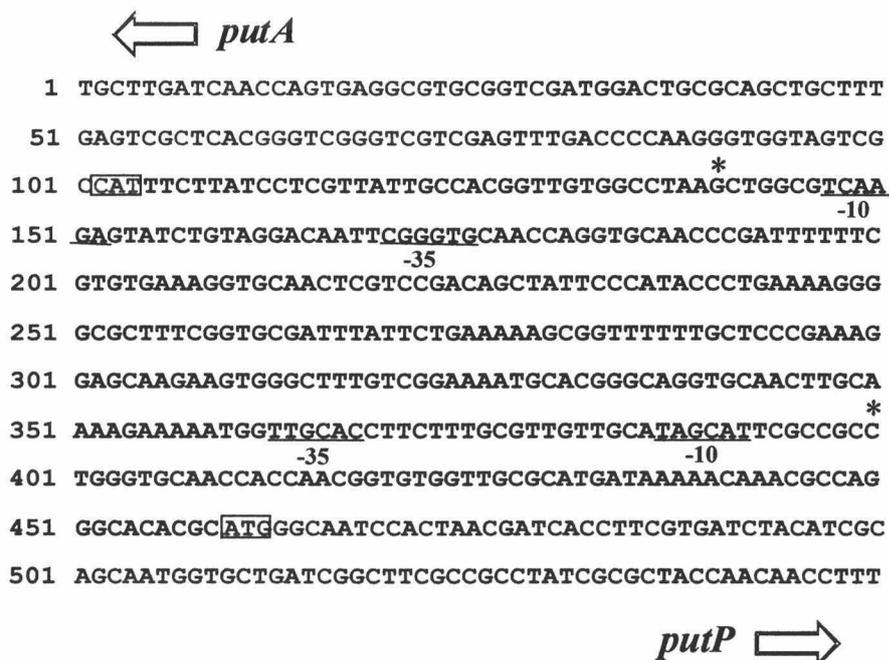
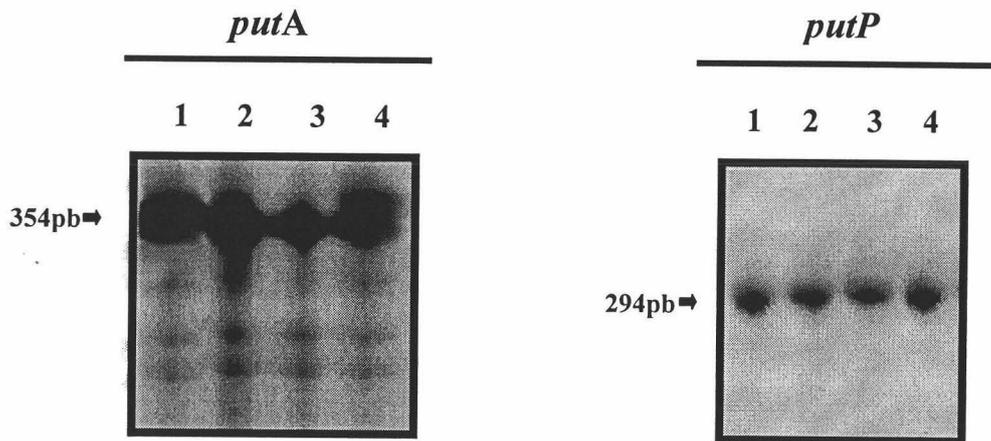


Figura 32. Representación de los inicios de transcripción y regiones promotoras de los genes *putA* y *putP* de *P. putida* KT2440. Se muestra la secuencia de ADN existente entre los genes *putA* y *putP* del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida*. En ella se señala el inicio de la secuencia codificante de cada gen (en color gris), los puntos de inicio de la transcripción en cada gen (asteriscos), así como las regiones promotoras -10 y -35 propuestas.

## 2.2. Expresión de los genes *putA* y *putP* de *P. putida* KT2440 en distintos medios de cultivo.

Con objeto de estudiar si la expresión de los genes *putA* y *putP* se afectaba por la presencia de fuentes de carbono y nitrógeno adicionales, se analizó el nivel de ARN mensajero obtenido de células de *P. putida* cultivadas con prolina en presencia de amonio y/o succinato. Para ello, un cultivo de *P. putida* en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato se diluyó hasta una turbidez de 0,4 en 30 mL de medio M8 con 20 mM de prolina, medio M9 con 20 mM de prolina, medio M8 con 20 mM de prolina y 20 mM de succinato y medio M9 con 20 mM prolina y 20 mM de succinato. Tras 2, 4 y 6 horas de agitación a 30°C se extrajo el ARN total de 5 mL de cada uno de los cultivos y se procedió a la extensión reversa de 24 µg de ARN con los cebadores 12U1 y PESP. La Figura 33 muestra la expresión de los genes *putA* y *putP* en células recogidas 2 h después de la inducción aunque el análisis se realizó también en células de cultivos recogidos 4 h y 6 h después. La expresión de los genes en células tomadas a las 4 horas de la inducción fue similar a la mostrada en la Figura 33, en cambio no se observó

expresión de los genes en células recogidas 6 h después de la inducción. Dado que la intensidad de las bandas fue similar en todos los medios se sugiere que la expresión de los genes *putA* y *putP* fue semejante independientemente de que junto a la prolina existiera en el medio una fuente adicional de carbono (medio M8 con prolina y succinato), de nitrógeno (medio M9 con prolina) o de ambas simultáneamente (medio M9 con prolina y succinato).



**Figura 33. Expresión de los genes *putA* y *putP* en distintos medios tras inducción con prolina.** Se muestra el resultado de la extensión de 24  $\mu$ g de ARN total obtenido a partir de células de *P. putida* cultivadas como se detalla en el texto en los medios M8 con 20 mM de prolina (calles 1), M9 con 20 mM de prolina (calles 2), M8 con 20 mM de prolina y succinato (calle 3) y M9 con 20 mM prolina y succinato (calles 4) usando los cebadores 12U1 (panel *putA*) y PESP (panel *putP*).

Con objeto de confirmar que la inducción de los genes *put* es independiente de la fuente de carbono adicionada, se realizó una extensión reversa de los cebadores 12U1 y PEPS a partir del ARN total extraído de células cultivadas en M9 con 20 mM de prolina y en presencia de una fuente de carbono distinta al succinato. La metodología del experimento fue similar a la descrita al comienzo de este apartado con la diferencia de que se analizó únicamente la expresión de los genes 2 horas después de la inducción y que se usaron los medios M9 con 20 mM de prolina más 20 mM de glucosa, glicina, glutámico, glicerol, fumárico, acetato, citrato ó 1% (p/v) de casaminoácidos en lugar de succinato. Para la extensión de los cebadores 12U1 y PESP se usaron muestras con 18  $\mu$ g de ARN total. Después de la separación mediante electroforesis en gel de acrilamida de los fragmentos extendidos, se procedió a la cuantificación de la actividad de cada una

de las bandas obtenidas. Los resultados de la cuantificación se recogen en la **Tabla 9**. Los resultados obtenidos sugieren que la expresión de los genes *put* de *P. putida* no se encuentra bajo represión catabólica ya que en todos los casos se obtuvo un nivel de expresión similar.

**Tabla 9. Cuantificación de la expresión de los genes *putA* y *putP* en medios M9 con prolina y una fuente de carbono adicional.** En la tabla se muestra el resultado de la cuantificación del ARN mensajero (en unidades relativas UR) obtenido a partir de células de *P. putida* cultivadas en medio mínimo M9 con 20 mM de prolina a los que se añadió una fuente de carbono adicional. La metodología empleada fue la misma a la descrita en el pie de la figura 6 y los valores de expresión relativa se cuantificaron mediante el empleo de un Molecular Imager modelo GS-525.

Fuente de carbono adicionada	Gen <i>putA</i> (UR)x10 <sup>3</sup>	Gen <i>putP</i> (UR)x10 <sup>3</sup>
-----	12	2.8
Glucosa (20 mM)	10	3.4
Glutámico (20 mM)	9	2.8
Glicerol (20 mM)	9	2.3
Glicina (20 mM)	11	2.5
Fumárico (20 mM)	8	3.4
Acetato (20 mM)	12	2.9
Citrato (20 mM)	8	3.3
Casaminoácidos (1% p/v)	9	3.1

### 2.3. Análisis de la expresión de los genes *putA* y *putP* en células cultivadas con distintas concentraciones de prolina mediante extensión reversa a partir de cebador.

En el apartado 1.3. de este capítulo se describió que la actividad  $\beta$ -galactosidasa en *P. putida* (pMIS5) y *P. putida* (pMIS12) fue similar independientemente de la cantidad de prolina adicionada al medio. Con objeto de confirmar estos resultados, se realizó un estudio similar para determinar la expresión de los genes *putA* y *putP* mediante la técnica de extensión de cebadores. Para ello, *P.*

*putida* KT2440 se cultivó en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato tal y como se describió en el apartado 2.1. de este capítulo dividiendo el cultivo en 4 fracciones alícuotas de 30 mL a las que se añadió 20, 2, 0'2 y 0'02 mM de prolina respectivamente. Tras 15, 30 y 60 minutos de incubación a 30°C se extrajo el ARN total del cual se hizo una extensión reversa con 20 µg y los cebadores 12U1 y PEPS (Figura 34). Los resultados obtenidos revelaron que 15' después de la inducción se detectó una única banda en todos los cultivos inducidos con prolina salvo en aquel al que se le añadió 0,02 mM de prolina. La expresión de los genes *putA* y *putP* era manifiesta treinta y sesenta minutos después de la adición del aminoácido sólo en aquellos medios a los que se añadió 2 y 20 mM de prolina.

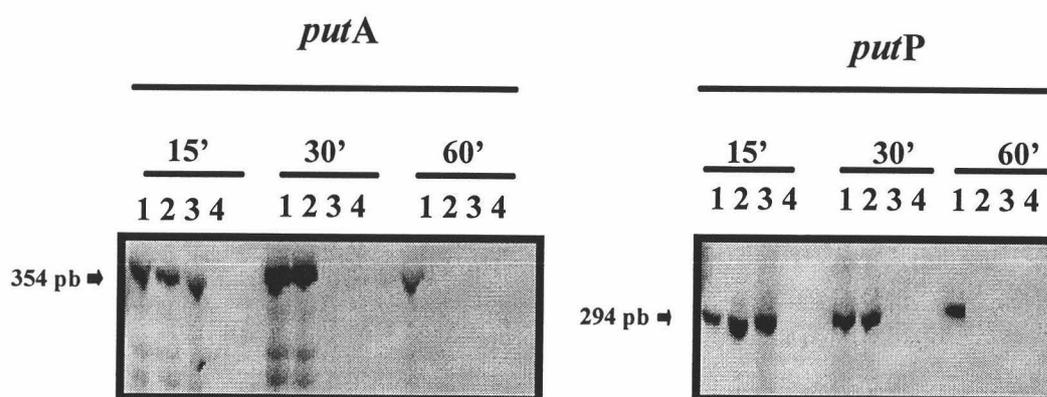
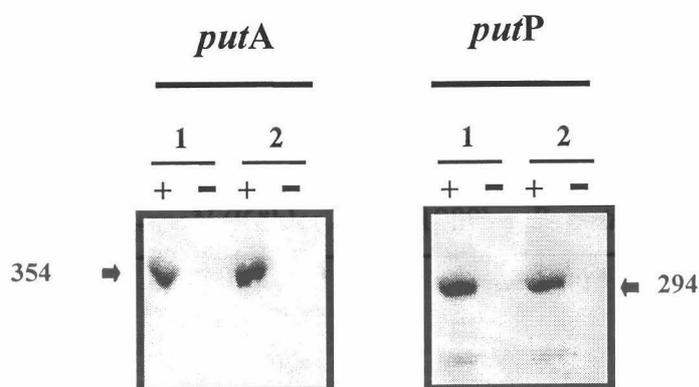


Figura 34. Expresión de los genes *putA* y *putP* en medios con distinta concentración de prolina. Un cultivo de *P. putida* KT2440 en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato se cultivó bajo las condiciones detalladas en el texto. Se realizaron extensiones reversas de 20 µg de ARN obtenidos a partir de células recogidas 15, 30 y 60 minutos después de la inducción con 20 mM (calles 1), 2 mM (calles 2), 0'2 mM (calles 3) y 0'02 mM (calles 4) de prolina con los cebadores 12U1 (panel *putA*) y PEPS (panel *putP*).

#### 2.4. Análisis de la participación de distintos factores transcripcionales en la expresión de los genes *putA* y *putP*.

El análisis de la región corriente arriba de los genes *putA* y *putP* reveló unas regiones similares a las reconocidas por el factor de transcripción  $\sigma^{70}$ . Dado que algunos promotores pueden transcribirse *in vivo* por los factores  $\sigma^{70}$  ó  $\sigma^{38}$  dependiendo de la fase de crecimiento (Jishage *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1993), se decidió comprobar si el factor  $\sigma^{38}$  intervenía en la transcripción de los genes *putA* y *putP* en fase estacionaria

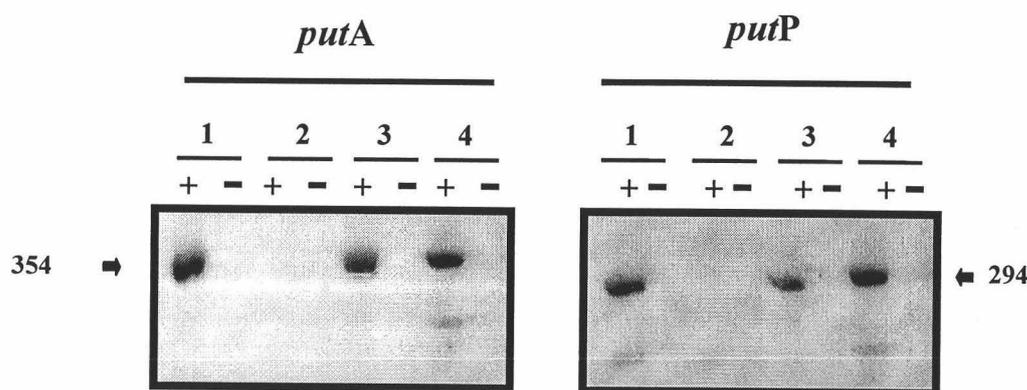
temprana mediante el uso de la cepa *P. putida* C1R1, un mutante *rpoS* de *P. putida* KT2440 (Ramos-González *et al.*, 1998). Para ello, se cultivaron a 30°C en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato células de *P. putida* deficientes en el factor  $\sigma^{38}$  y su isogénica silvestre hasta alcanzar la fase estacionaria temprana de crecimiento, momento en que los cultivos se dividieron en 2 fracciones alícuotas, a una de las cuales se añadió 20 mM de prolina mientras que la otra fracción permaneció como control negativo de la inducción. Quince minutos después de la adición de la prolina se extrajo el ARN total de los cultivos y se analizó el nivel de ARN mensajero de los genes *putA* y *putP*. El resultado de la extensión de 23  $\mu$ g de ARN total con los cebadores 12U1 y PESP se muestra en la **Figura 35** donde se observa que el mutante de *P. putida* deficiente en el factor  $\sigma^{38}$  presentó el mismo nivel de expresión en presencia de prolina que el que presentó la cepa silvestre.



**Figura 35. Análisis de la influencia del factor  $\sigma^{38}$  en la transcripción de los genes *putA* y *putP* de *P. putida*.** Las condiciones de cultivo de las cepas *P. putida* KT2440 (calles 1) y *P. putida* C1R1 (calles 2) se detallan en el texto. Se hizo una extensión a partir de los cebadores 12U1 y PEPS marcados radiactivamente del ARN total extraído de cultivos inducidos con 20 mM de prolina (símbolos +) y cultivos sin inducir (símbolos -).

La expresión de los genes del catabolismo de la prolina en enterobacterias depende del factor de transcripción  $\sigma^{54}$  (Macaluso *et al.*, 1990) y de la proteína denominada factor de integración del hospedador o proteína IHF. (Ostrovsky de Spicer *et al.*, 1991; O'Brien *et al.*, 1992). Con objeto de comprobar si la transcripción de los genes *put* en *P. putida* dependía del factor de transcripción  $\sigma^{54}$  o de la proteína IHF se analizó la expresión de los genes *putA* y *putP* en mutantes de *P. putida* deficientes en estas proteínas, *P. putida-rpoN* (Köhler *et al.*, 1989) y *P. putida* IHF3 (Marqués *et al.*,

1998) junto con la cepa silvestre, de la misma forma que la descrita para el mutante *rpoS*. Dos horas después de la inducción se extrajo el ARN total de cada cultivo y se hizo una extensión reversa de 28 µg de ARN a partir de los cebadores 12U1 y PEPS marcados radiactivamente. Tras la electroforesis del ADNc obtenido y revelado del gel se observó que los niveles basales e inducidos de los genes *putA* y *putP* en el mutante IHF fueron idénticos a los de la cepa silvestre (**Figura 36**). Por el contrario no se observó expresión de ninguno de los genes del operón en células cultivadas en presencia de prolina del mutante deficiente en el factor  $\sigma^{54}$ .

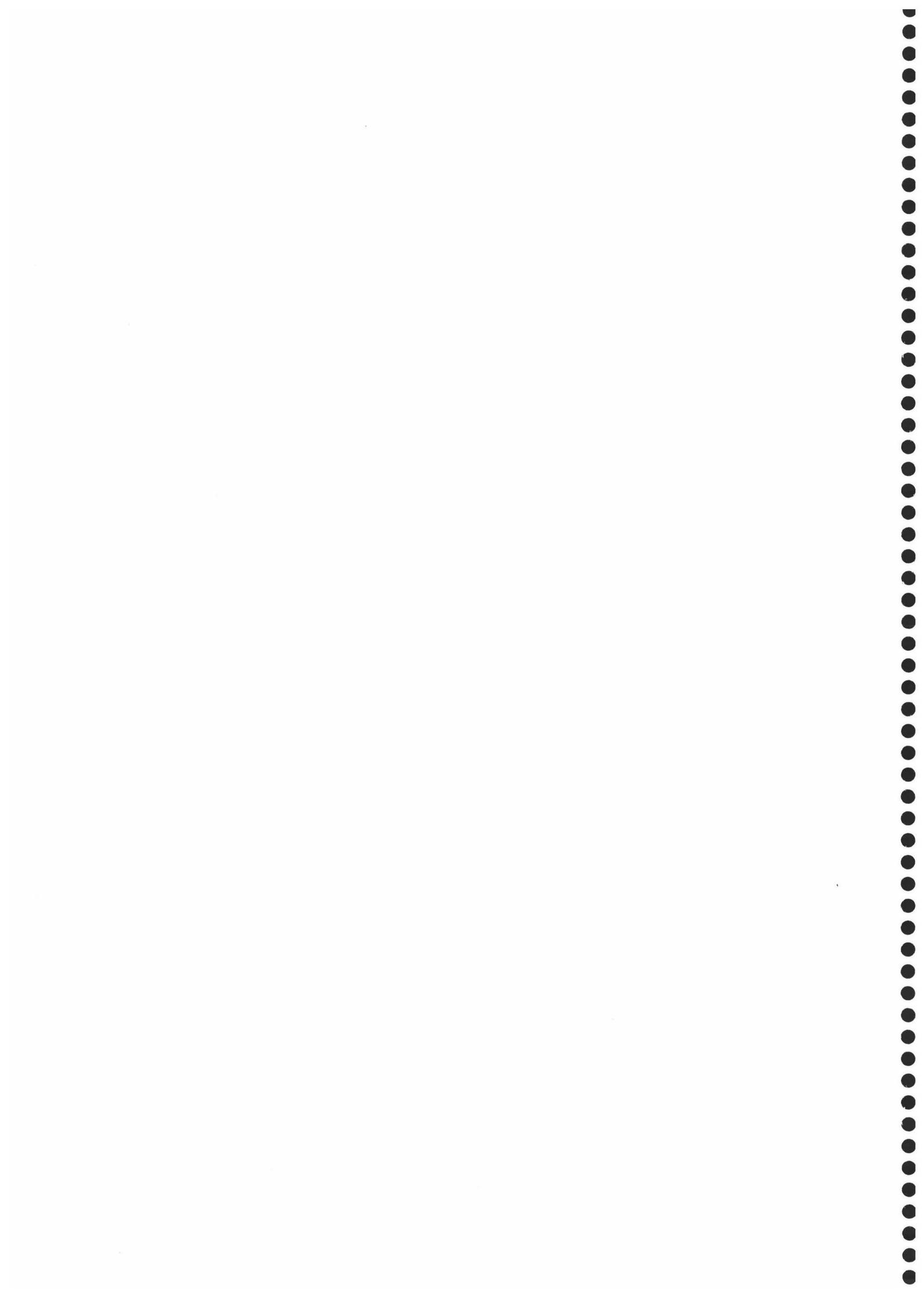


**Figura 36.** Análisis de la influencia del factor  $\sigma^{54}$  y las proteínas IHF y PtsN en la transcripción de los genes *putA* y *putP* de *P. putida*. Células de *P. putida* KT2440 (calles 1), *P. putida-rpoN* (calles 2), *P. putida* IHF 3 (calles 3) y *P. putida* MAD2 *ptsN*::Km (calles 4) se cultivaron en las condiciones descritas en el texto. Se extrajo el ARN total tanto a los cultivos inducidos (símbolos +) como a los no inducidos (símbolos -) y se realizó una extensión reversa a partir de los cebadores 12U1 y PEPS marcados radiactivamente.

Se ha descrito recientemente que el gen *rpoN* y los genes *pts* situados corriente abajo al gen *rpoN*, forman parte del mismo operón. (Cases *et al.*, 1999). Dado que el mutante deficiente en el factor  $\sigma^{54}$  se obtuvo mediante la inserción de un Tn5 en el gen *rpoN* no se podía descartar que la ausencia de expresión de los genes *put* en el fondo genético *rpoN* en condiciones de inducción se debiera a un efecto polar de la mutación. Por ello se analizó, de igual forma que se hizo con los mutantes  $\sigma^{54}$  y IHF, la expresión de los genes *putA* y *putP* en un mutante de *P. putida* MAD2 *ptsN*::Km construido

---

mediante inserción en el gen *ptsN* del gen de la kanamicina desprovisto de promotor y de parada de la transcripción (Cases *et al.*, 1999). La metodología para el análisis de la expresión de los genes *put* en el fondo *ptsN* fue igual a la utilizada con los mutantes *P. putida-rpoN* y *P. putida* IHF3 descrita anteriormente. El resultado de la extensión de 28  $\mu$ g de ARN total con los cebadores 12U1 y PESP se muestra en la **Figura 36**. Se observó que el nivel de expresión de los genes *putA* y *putP* en el mutante deficiente en la proteína PtsN fue similar que los determinados en la cepa silvestre.



## Capítulo III

### Obtención y caracterización de mutantes de *P. putida* KT2440 deficientes en el catabolismo de la prolina.

En el estudio de cualquier ruta metabólica es frecuente la obtención de mutantes deficientes en dicha ruta ya que la caracterización de ellos suele aportar información valiosa sobre el funcionamiento y la regulación de la misma. Como parte del estudio del catabolismo de la prolina en *P. putida* se obtuvieron un conjunto de mutantes deficientes en la utilización de prolina como fuente de carbono y de nitrógeno. Los resultados obtenidos se presentan en este capítulo y revelaron una variada información sobre la regulación del operón del catabolismo de la prolina en este organismo.

#### 1. Obtención de mutantes en el catabolismo de la prolina.

Los mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina se obtuvieron mediante dos métodos. El primero fue la inserción al azar de un transposón en el genoma de *P. putida* KT2440 y la posterior búsqueda de clones que presentaron deficiencias en el metabolismo de laprolina. El segundo fue la selección de cepas capaces de crecer en placas de medio mínimo en presencia de 3,4-L-dehidroprolina, análogo de la prolina tóxico para las células.

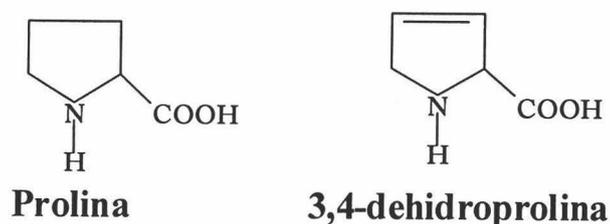
##### 1.1. Mutagénesis de *P. putida* KT2440 con mini-Tn5.

Para obtener mutantes de *P. putida* afectados en el catabolismo de la prolina se llevó a cabo una mutagénesis al azar mediante inserción del transposón mini-Tn5KmluxAB. Dicho proceso se realizó mediante conjugación triparental entre las cepas *P. putida* KT2440 como receptora, *E. coli* S17-1- $\lambda$ pir (pCK220) como donadora y HB101 (pRK600) como auxiliar. El plásmido pRK600 moviliza el plásmido suicida pCK220 portador del transposón miniTn5KmluxAB a cepas de *P. putida*. Tras la conjugación se seleccionaron 744 transconjugantes de *P. putida* en placas de medio rico LB con kanamicina y cloramfenicol con una frecuencia de  $10^{-6}$  transconjugantes por receptor. Tras ello se ensayó la capacidad de crecimiento de estos clones en placas de medio mínimo M9 con 20 mM de glucosa y M8 con 20 mM de prolina, obteniéndose 4

receptor. Tras ello se ensayó la capacidad de crecimiento de estos clones en placas de medio mínimo M9 con 20 mM de glucosa y M8 con 20 mM de prolina, obteniéndose 4 mutantes, denominados S14D2, S14D11, S15D3 y S16D2, que crecieron en medio mínimo M9 con 20 mM de glucosa pero que no crecieron (mutante S14D2) o presentaron un crecimiento retardado con respecto a la cepa silvestre (mutantes S14D11, S15D3 y S16D2) en medio mínimo M8 con 20 mM de prolina.

### 1.2. Selección de mutantes espontáneos resistentes a 3,4 dehidro D,L-prolina, un análogo tóxico de la prolina.

La 3,4-dehidro-D,L-prolina (3,4-DHP) es un compuesto con una estructura análoga a la prolina que posee una insaturación entre las posiciones 3 y 4 de su molécula (**Figura 37**). Dada la analogía estructural entre estos dos iminoácidos la 3,4-DHP es transportada al citoplasma por la proteína PutP, transportador natural de la prolina (Dila *et al.*, 1986). Una vez en el interior, la 3,4-DHP se incorpora en la biosíntesis proteica del organismo en lugar de la prolina provocando la pérdida de la estructura de las proteínas y su de funcionalidad (Fowden *et al.*, 1963; Morris *et al.*, 1972; Tristram *et al.*, 1968). En enterobacterias se ha demostrado que el crecimiento celular resulta fuertemente inhibido por la presencia en el medio de la 3,4-DHP y que la resistencia a este compuesto es concomitante a la aparición de mutaciones en el transportador principal de la prolina PutP (Ratzkin *et al.*, 1978a; Wood 1981).



**Figura 37.** Estructura de la prolina y su análogo tóxico la 3,4-dehidroprolina.

Anterior al inicio de este estudio se desconocía si la 3,4-DHP inhibía el crecimiento de *P. putida* KT2440, por esta razón se determinó en primer lugar la concentración de 3,4-DHP que prevenía el crecimiento de *P. putida* KT2440. Para ello se estrió una colonia de *P. putida* en placas de medio mínimo M9 con 20 mM de

*putida* presentó crecimiento mientras que en presencia de 50 ó 100 µg/mL de 3,4-DHP no creció.

Tras este ensayo se procedió a la obtención de mutantes de *P. putida* KT2440 resistentes a la 3,4-DHP. Para ello se sembraron 100 µL de un cultivo de *P. putida* en medio rico LB en fase exponencial tardía en 2 placas de medio mínimo M9 con 20 mM de succinato a las que se les había añadido 50 y 100 µg/mL de 3,4-DHP respectivamente. Tras 20-24 h de incubación a 30°C aparecieron colonias aisladas en ambas placas con una frecuencia de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$ . De entre todas las cepas resistentes a la 3,4-DHP se eligieron al azar una colonia de cada placa. La llamada *P. putida* PRO-21 toleró una concentración de 3,4-DHP de 50 µg/mL mientras que la llamada *P. putida* CRR216 toleró 100 µg/mL. Ambas cepas presentaron un crecimiento similar al de la cepa silvestre en placas de medio M9 con 20 mM de succinato pero no crecieron (PRO-21) o presentaron un crecimiento retrasado con respecto a la cepa silvestre (CRR216) en placas de medio M8 con 20 mM de prolina.

## **2. Caracterización de los mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina de *P. putida* KT2440.**

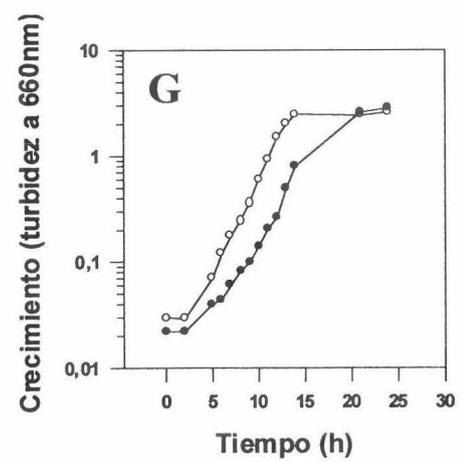
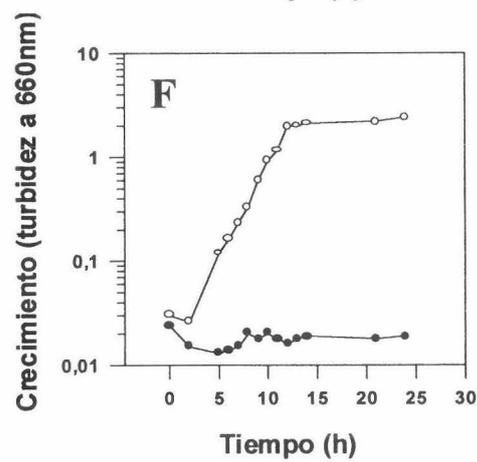
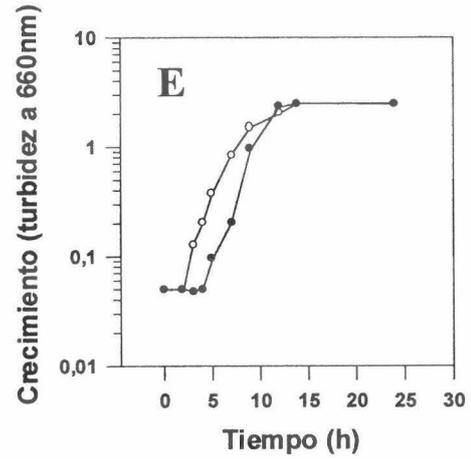
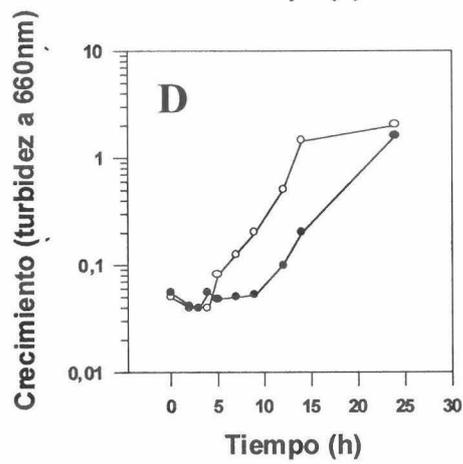
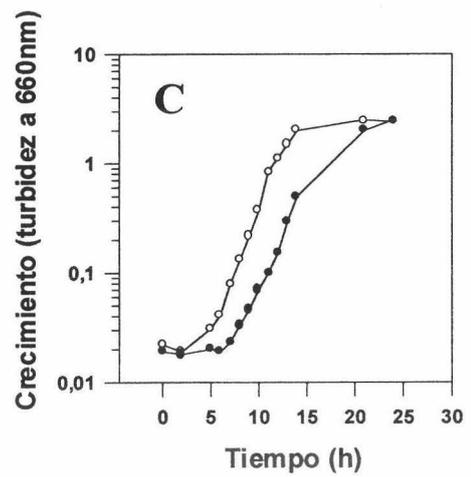
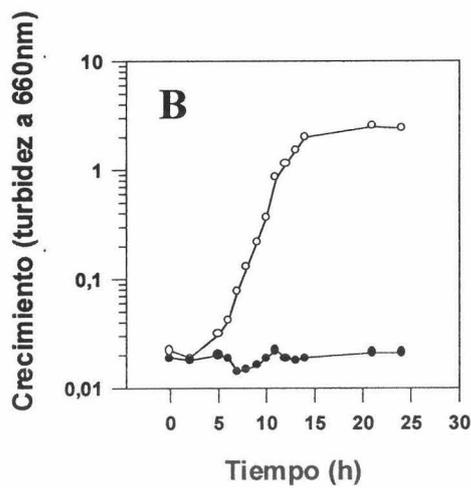
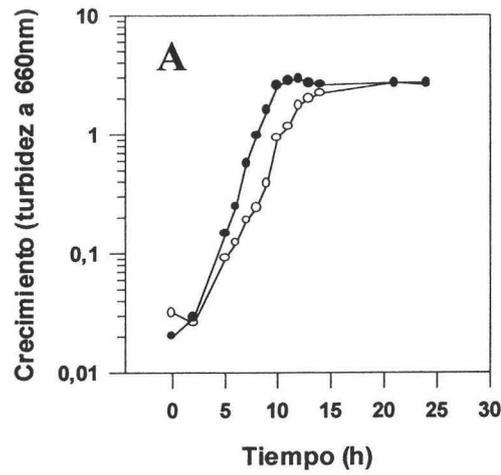
Tras la obtención de los mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina se diseñaron una serie de ensayos con objeto de caracterizar el comportamiento de cada uno, los cuales se exponen a continuación.

### **2.1. Crecimiento de los mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 en medio mínimo.**

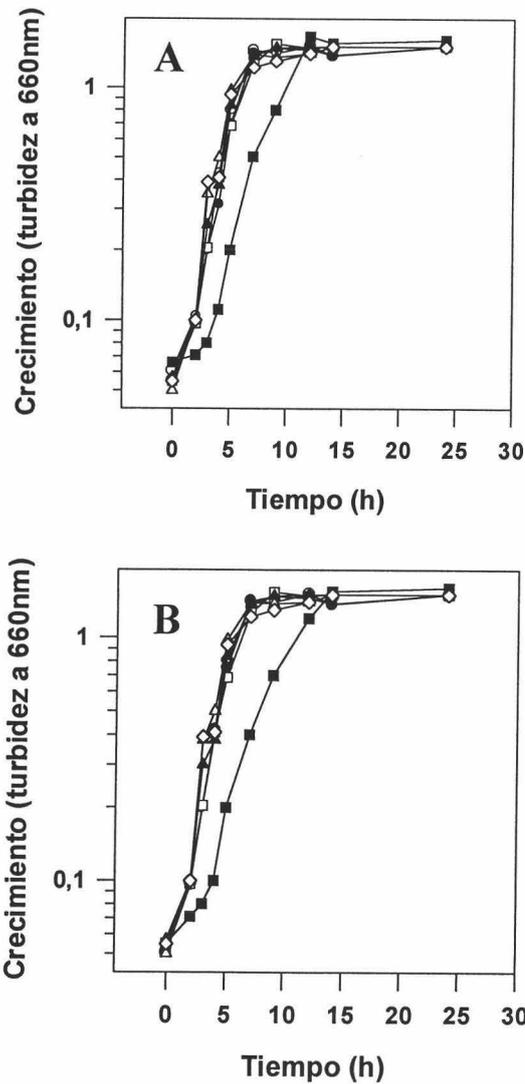
La primera aproximación en la caracterización de cada uno de los mutantes fue el análisis del crecimiento en medio mínimo líquido con prolina como única fuente de carbono y nitrógeno y en medio mínimo con glucosa y amonio. Para ello se cultivaron cada uno de los mutantes y la cepa silvestre en medio rico LB durante 12-14 h a 30°C, tras lo cual cada cultivo se diluyó hasta una turbidez a 660 nm de 0,05 en medio M9 con 20 mM de succinato y en medio M8 con 20 mM de prolina. El crecimiento de cada mutante en los dos medios de cultivo ensayados se determinó como el incremento de la turbidez a 660 nm de los cultivos. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura**

mutante en los dos medios de cultivo ensayados se determinó como el incremento de la turbidez a 660 nm de los cultivos. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 38**. Los mutantes en estudio, a excepción del mutante S15D3, presentaron tiempos de generación en medio M9 con glucosa que oscilaron entre 2 y 2,4 h, los cuales fueron similares al que presentó la cepa silvestre en dicho medio (2.1 h). El tiempo de generación del mutante S15D3 en dicho medio fue de 3,8 h, cerca del doble del que presentó la cepa KT2440. Por el contrario el comportamiento de los mutantes en medio M8 con prolina difirió del presentado por la cepa silvestre. Así, los mutantes S14D2 y PRO-21 no crecieron en este medio, mientras que el resto de los mutantes terminaron creciendo pero presentaron periodos de latencia (entre 5 y 10 h) y tiempos de generación (entre 3 y 4 h) superiores al de la cepa silvestre (1h de latencia y un tiempo de generación de 2,27 h).

Con objeto de comprobar si los mutantes en estudio eran sólo deficientes en el catabolismo de la prolina se ensayó el crecimiento de cada uno en medio mínimo con otras fuentes de carbono distintas a la glucosa. Los ensayos de crecimiento se realizaron de forma similar a las descritas anteriormente con la diferencia de que las fuentes de carbono utilizadas fueron el succinato y el glutamato. El seguimiento de la turbidez de cada cultivo (**Figuras 39A y 39B**) mostró un comportamiento similar de todos los mutantes al de la cepa silvestre en ambos medios con la excepción del mutante S15D3 que presentó de nuevo en estos medios una fase de latencia y un tiempo de generación superiores a los presentados por la cepa silvestre. De estos ensayos se concluyó que el mutante S15D3 presenta una deficiencia metabólica y por tanto genética que no está restringida a la utilización de prolina sino que afecta a otro nivel que debe ser común al metabolismo de distintas fuentes de carbono.



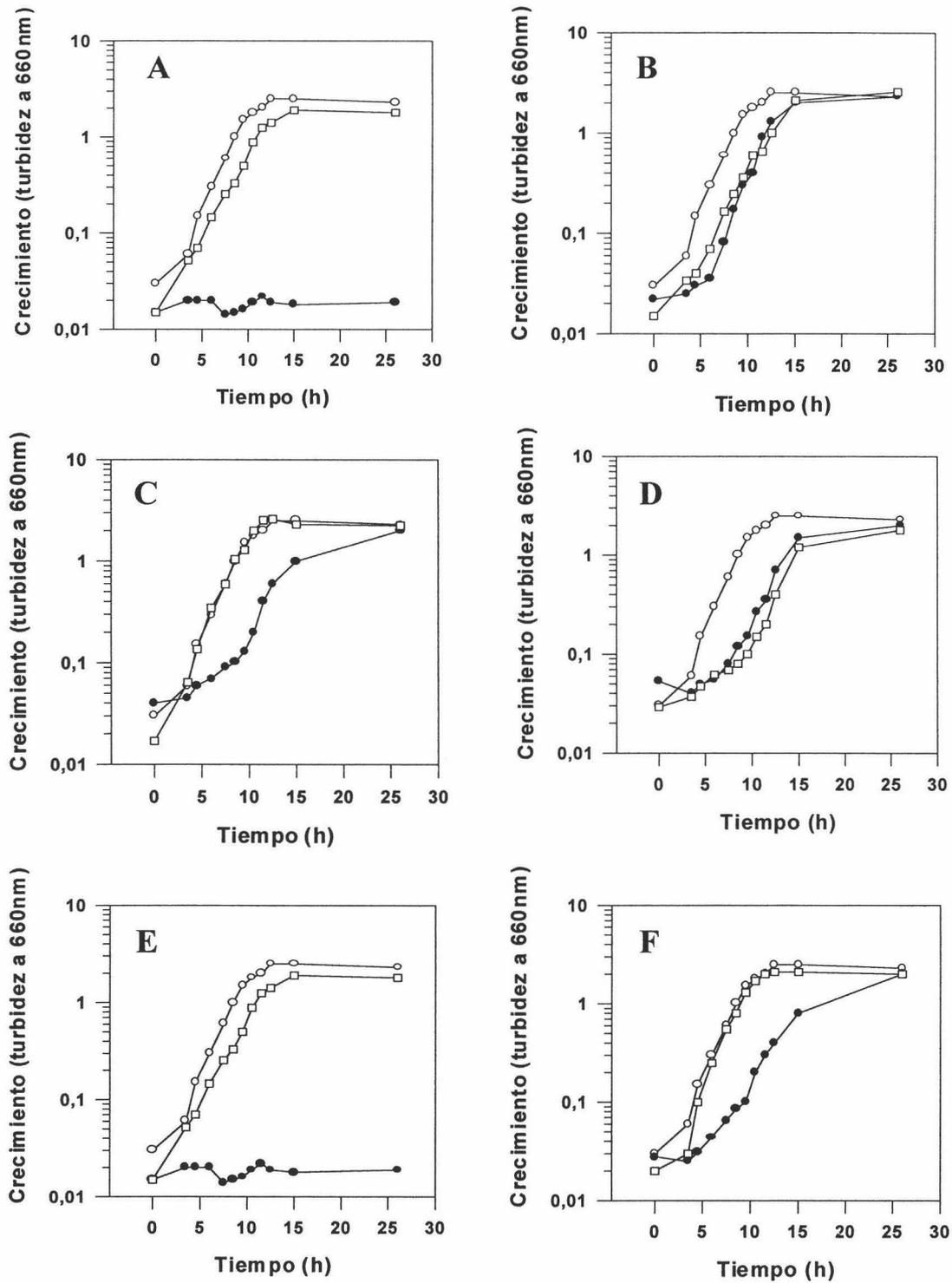
**Figura 38.** Crecimiento de distintas cepas de *P. putida* en medio M9 con 20 mM de glucosa y en medio M8 con 20 mM de prolina. Crecimiento de la cepa silvestre *P. putida* KT2440 (panel A) y de los mutantes S14D2 (panel B), S14D11 (panel C), S15D3 (panel D), S16D2 (panel E), PRO-21 (panel F), y CRR216 (panel G) en los medios M9 con 20 mM de glucosa (símbolos abiertos) y M8 con 20 mM de prolina (símbolos cerrados). Las condiciones de cultivo se detallan en el texto.



**Figura 39.** Crecimiento de distintas cepas de *P. putida* en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato y M9 con 20 mM de glutamato. Crecimiento de la cepa silvestre *P. putida* KT2440 (círculos abiertos) y de los mutantes S14D2 (círculos cerrados), S14D11 (cuadrados abiertos), S15D3 (cuadrados cerrados), S16D2 (triángulos abiertos), PRO-21 (triángulos cerrados) y CRR216 (rombos abiertos) en medio M9 con 20 mM de succinato (panel A) y M9 con 20 mM de glutamato (panel B). Las condiciones de cultivo se detallan en el texto.

## 2.2. Estudios de complementación de los mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 con el cósmido pCRR831.

Como se expuso en el capítulo I de esta Tesis Doctoral el cósmido pCRR831 contiene los genes *putA* y *putP* del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* KT2440. Con objeto de estudiar si los mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina recuperaban el fenotipo de la cepa silvestre mediante la introducción del cósmido pCRR831, se realizó una conjugación tripartita entre la cepa donadora *E. coli* RM2 (pCRR831), la cepa auxiliadora HB101 (pRK600) y cada uno de los mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 como cepas receptoras. Tras seleccionar los transconjugantes en medio rico LB con tetraciclina con una frecuencia de  $10^{-6}$  transconjugantes por receptor, se eligió un representante de cada conjugación para su posterior caracterización. Después de comprobar la existencia del cósmido pCRR831 en cada uno de los transconjugantes, mediante el método de lisis alcalina, se procedió a la caracterización de los mismos en medio mínimo. Para ello se cultivó la cepa silvestre *P. putida* KT2440, las cepas mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 y los transconjugantes S14D2 (pCRR831), S14D11 (pCRR831), S15D3 (pCRR831), S16D2 (pCRR831), PRO-21 (pCRR831) y CRR216 (pCRR831) en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato durante 10-12 h, tras lo cual cada cultivo se diluyó hasta una D.O.  $_{660\text{ nm}}$  de 0,05 en medio fresco M8 con 20 mM de prolina y se siguió la turbidez de cada cultivo a lo largo del tiempo (**Figura 40**). Se observó que los transconjugantes S14D2 (pCRR831) y PRO-21 (pCRR831) crecieron en medio mínimo con prolina como única fuente de carbono y de nitrógeno mientras que las cepas mutantes (carentes del cósmido pCRR831) no presentaron crecimiento alguno en este medio. La introducción del cósmido pCRR831 en los mutantes S15D3 y CRR216 restauró el fenotipo de crecimiento en medio mínimo M8 con prolina eliminándose la fase de latencia prolongada que presentaron los mutantes. Por el contrario la introducción del cósmido pCRR831 en los mutantes S14D11 y S16D2 no restauró hasta los niveles de la cepa silvestre la capacidad de crecimiento de éstos en el medio M8 con 20 mM de prolina, por lo que tanto los mutantes como sus correspondientes transconjugantes presentaron un crecimiento similar.



**Figura 40. Crecimiento de distintas cepas de *P. putida* en medio mínimo M8 con 20 mM de prolina.** En cada panel se muestra el crecimiento en medio mínimo M8 con 20 mM de prolina de la cepa silvestre *P. putida* KT2440 (círculos abiertos), del mutante (círculos cerrados) y del transconjugante correspondiente (cuadrados abiertos). Los paneles A, B, C, D, E y F corresponden a los mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 y a sus transconjugantes respectivamente. Las condiciones de cultivo se detallan en el texto.

### 2.3. Medida de la actividad prolina deshidrogenasa en la cepa silvestre *P. putida* KT2440 y en los mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216.

La actividad prolina deshidrogenasa es una de las dos actividades enzimáticas que presenta la proteína PutA y es la responsable de la transformación de la prolina en la pirrolina 5'-carboxilato tanto en eucariotas (Wang *et al.*, 1987; Hayward *et al.*, 1993) como en procariotas (Maloy 1987; Menzel *et al.* 1981b; Keuntje *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 1996). La medida de esta actividad en *P. putida* KT2440 y en los mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina tuvo un doble objetivo, el primero, la comprobación de que la proteína PutA de *P. putida* poseía la actividad PDH y el segundo, determinar si la deficiencia en la utilización de prolina en los mutantes se debía a una deficiencia en dicha actividad.

#### 2.3.1. Medida de la actividad prolina deshidrogenasa en *P. putida* KT2440.

La actividad prolina deshidrogenasa se determinó mediante una modificación del método propuesto por Dendinger *et al.*, (1970) el cual se describe en el **apartado 16** de los *Materiales y Métodos*. Para ello se cultivaron células de *P. putida* KT2440 en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato durante 10-12 horas a 30°C tras lo cual se diluyeron 100 veces en 10 mL de medio M9 con 20 mM de succinato y medio M9 con 20 mM de succinato y 20 mM de prolina. Cada cultivo se incubó a 30°C hasta alcanzar turbidez de 0,8, momento en el que se centrifugaron, se lavaron y se permeabilizaron con tolueno como se describió en el **apartado 16** de los *Materiales y Métodos*. Las células permeabilizadas se utilizaron en el ensayo de la actividad PDH, y la formación de pirrolina-5'-carboxilato se determinó a lo largo del tiempo. Los resultados de la **Figura 41** mostraron que sólo aquellas células que habían sido cultivadas en presencia de prolina presentaban actividad PDH.

A partir de la pendiente de la recta obtenida por regresión de mínimos cuadrados se determinó que la actividad prolina deshidrogenasa en *P. putida* fue de 177 nmoles de P5C por mg de proteína y minuto.

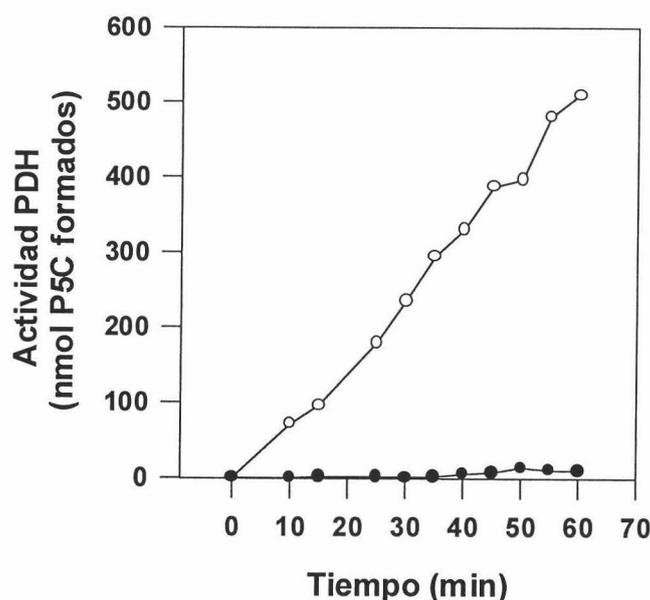


Figura 41. Actividad prolina deshidrogenasa en células de *P. putida* KT2440. La actividad prolina deshidrogenasa se determinó en células permeabilizadas cultivadas en medio M9 con 20 mM de succinato (círculos cerrados) y en medio M9 con 20 mM de succinato y 20 mM de prolina (círculos abiertos). La cantidad de prolina en cada extracto fue de 0,058 y 0,045 mg/mL respectivamente.

### 2.3.2. Medida de la actividad prolina deshidrogenasa en los mutantes S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 y en los clones S14D2 (pCRR831) y PRO-21 (pCRR831).

Una vez optimizada la medida de la actividad prolina deshidrogenasa en la cepa silvestre *P. putida* KT2440 se determinó dicha actividad en los mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina y en S14D2 (pCRR831) y PRO-21 (pCRR831), dos de los mutantes a los que la transferencia de dicho plásmido les restauró el crecimiento en prolina. Para estos ensayos, células de S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21, CRR216 y S14D2 (pCRR831) y PRO-21 (pCRR831), junto con la cepa silvestre KT2440 se cultivaron en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato y con 20 mM de prolina, y la actividad prolina deshidrogenasa se determinó en células permeabilizadas. Los valores de actividad de cada uno de los clones bajo se presentan en la **Tabla 10**, donde además se representa el valor porcentual de la actividad de cada mutante con respecto al valor de actividad de la cepa silvestre.

**Tabla 10. Actividad prolina deshidrogenasa de distintas cepas de *P. putida* KT2440 cultivadas en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato y 20 mM de prolina.**

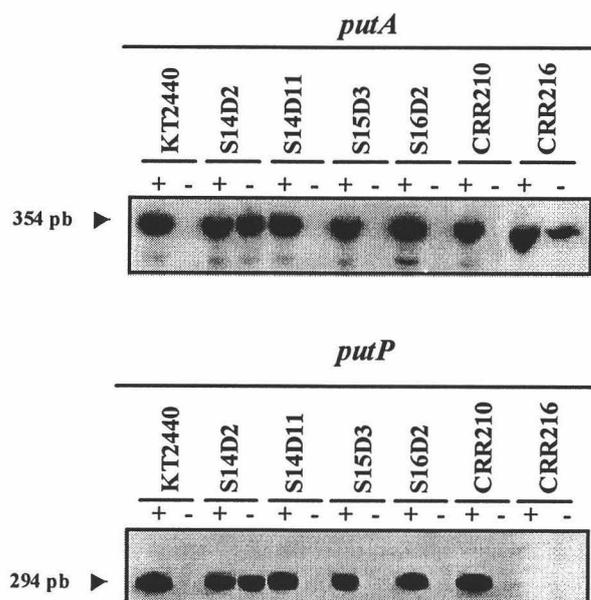
Cepa	Actividad PDH ( $\mu\text{molP5C}/\text{mg prot.} \times \text{min.}$ )	Porcentaje de actividad
KT2440	170	100
S14D2	9	5
S14D11	136	80
S15D3	151	89
S16D2	166	98
PRO-21	7	4
CRR216	178	109
S14D2 (pCRR831)	127	75
PRO-21 (pCRR831)	136	80

Los resultados obtenidos mostraron que la actividad PDH en los mutantes S14D2 y PRO-21 representó no más del 5% de la actividad de la cepa silvestre, mientras que en el resto de los mutantes los valores de actividad PDH oscilaron entre el 80 y 100% de la actividad de la cepa silvestre. La presencia del cósmido pCRR831 en los mutantes S14D2 y PRO-21 restauró los niveles de actividad PDH alcanzando unos valores entre el 75 y 80% de la actividad de la cepa silvestre.

#### **2.4. Expresión de los genes *putA* y *putP* en los mutantes de *P. putida* KT2440 deficientes en el catabolismo de la prolina.**

Con objeto de estudiar si los mutantes de *P. putida* deficientes en el catabolismo de la prolina presentaban afectada la transcripción de los genes del operón *put* se analizó, mediante la técnica de extensión reversa a partir de cebador, la expresión de los genes *putA* y *putP* en presencia y ausencia de prolina. Como control se utilizó la cepa silvestre cultivada en las mismas condiciones. La cepa KT2440 y sus mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 se cultivaron en medio M9 con 20 mM de

S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 se cultivaron en medio M9 con 20 mM de succinato durante 10-12 h tras lo cual los cultivos se diluyeron en el mismo medio fresco hasta una turbidez de 0,4. Dos horas después se dividió cada cultivo en 2 fracciones alícuotas a una de las cuales se le añadió 20 mM de prolina, permaneciendo la otra fracción como control negativo de la inducción. Tras incubar 2 h a 30°C y con agitación se recogieron 5 mL de cada cultivo y se extrajo el ARN total, el cual se utilizó como molde para el ensayo de la extensión reversa a partir de los cebadores 12U1 y PESP con objeto de analizar los niveles de los ARN mensajeros expresión de los genes *putA* y *putP* respectivamente. El resultado de las extensiones se representa en la **Figura 42** donde se observó que el patrón de expresión del gen *putA* en los mutantes S14D11, S15D3, S16D2 y PRO-21 fue similar al de la cepa silvestre, esto es, no se observó expresión en ausencia de prolina y se obtuvo alta expresión en condiciones de inducción. Por el contrario se observó que la expresión del gen *putA* en los mutantes S14D2 y CRR216 difería de la cepa silvestre en que la expresión del gen *putA* ocurría independientemente de la presencia de prolina ya que los niveles de expresión fueron similares en células cultivadas en el medio M9 con 20 mM de succinato y en el medio M9 con 20 mM de succinato y 20 mM de prolina.



**Figura 42.** Expresión de los genes *putA* y *putP* en los mutantes de *P. putida* deficientes en el catabolismo de la prolina. La figura muestra la expresión de los genes *putA* y *putP* de la cepa silvestre *P. putida* KT2440 y en los mutantes S14D2, S14D11, S15D3, S16D2, PRO-21 y CRR216 en los medios M9 con 20 mM de succinato y 20 mM de prolina (símbolos +) y M9 con 20 mM de succinato (símbolos -) bajo las condiciones detalladas en el texto.

En cuanto a la expresión del gen *putP*, se observó que los mutantes S14D11, S15D3, S16D2 y CRR216 fue similar a la de la cepa silvestre. En el mutante S14D2 se observó un comportamiento similar al observado en el gen *putA* ya que su expresión fue independiente de la presencia de prolina en el medio. Por el contrario, el mutante CRR216 no presentó expresión del gen *putP* en ninguna de las condiciones ensayadas.

### **3. Localización de las mutaciones que afectan al catabolismo de la prolina en los mutantes de *P. putida*.**

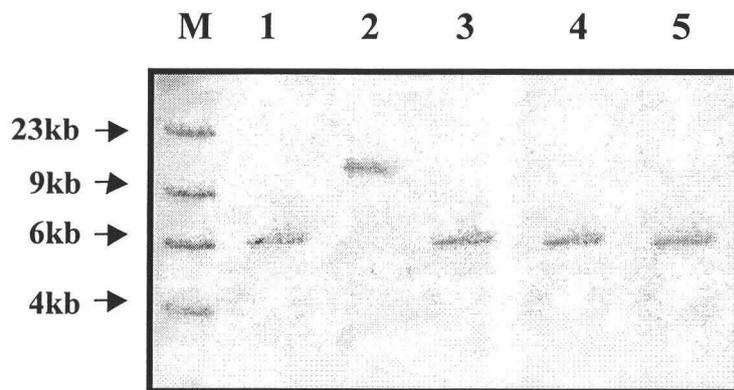
Tras la caracterización fenotípica de los mutantes en el catabolismo de la prolina en *P. putida* se decidió determinar la localización exacta de las mutaciones que afectaban a la utilización de prolina en cada uno de los mutantes bajo estudio. La estrategia seguida para la localización de la mutación varió en función del tipo de mutante que se estudiaba.

#### **3.1. Localización de la mutación que afecta a los mutantes obtenidos por mutagénesis al azar con el transposón mini-Tn5K*luxAB*.**

##### **3.1.1. Determinación de la localización del miniTn5 mediante hibridación.**

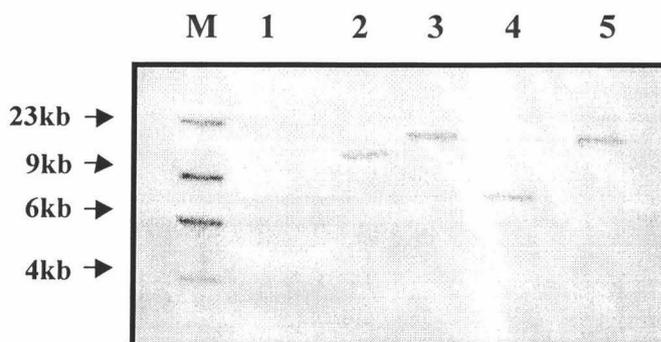
La inserción del mini-Tn5K*luxAB* en el cromosoma de *P. putida* KT2440, rindió los mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina S14D2, S14D11, S15D3 y S16D2, tal y como se describió en el **apartado 1.1** de este capítulo. Como primera aproximación en la localización de las mutaciones se decidió determinar mediante hibridación si alguno de los genes del operón del catabolismo de la prolina estaban afectados por la inserción del minitransposón. Para ello se realizó una digestión con *XhoI* de 10 µg de ADN cromosómico obtenido a partir de la cepa silvestre *P. putida* KT2440 y de los cuatro mutantes mencionados. La elección de esta enzima se basó en el hecho de que el transposón miniTn5K*luxAB* no presentó ninguna diana para esta enzima, lo que simplificó la localización del mismo. Tras la digestión y la separación electroforética se llevó a cabo una hibridación usando como sonda un fragmento de 2 kb marcado con digoxigenina resultante de la digestión del plásmido pCLR4 con *PstI*. El resultado de la hibridación (**Figura 43**) reveló que el

gen *putA* en el mutante S14D2 poseía un tamaño de aproximadamente 11 kb mientras que el resto de los mutantes y la cepa silvestre presentó un tamaño de 6 kb.



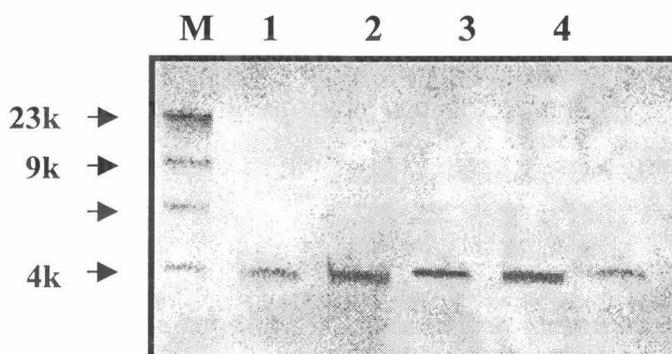
**Figura 43.** Hibridación de ADN cromosómico de cepas de *P. putida* usando como sonda el gen *putA* de *P. putida*. El ADN cromosómico digerido con *XhoI* de las cepas de *P. putida* KT2440 (calle 1), S14D2 (calle 2), S14D11 (calle 3), S15D3 (calle 4) y S16D2 (calle 5) se transfirió a una membrana de nilón tras la separación electroforética y se hibridó contra una sonda que contenía parte del gen *putA* de *P. putida*.

El aumento de tamaño de 4,7 kb que se observó en el mutante S14D2 en la **Figura 43** correspondió a la introducción del transposón miniTn5 en el gen *putA* tal y como se demostró mediante otra hibridación usando como sonda un fragmento que contuvo los genes *luxAB* y el gen que codifica para la resistencia a la kanamicina. Para ello una membrana obtenida de forma análoga a las anteriormente descritas se hibridó en condiciones estrictas con una sonda obtenida mediante marcaje de un fragmento de ADN de 4,7 kb producto de la digestión del plásmido pCK220 con *SalI*. El resultado de la hibridación (**Figura 44**) mostró que el tamaño del fragmento que contiene el transposón en el mutante S14D2 coincide con el tamaño del fragmento que contiene el gen *putA* (**Figura 43**). El resto de los mutantes presentaron señales positivas de distintos tamaños que no correspondieron en ningún caso a fragmentos que contenían los genes del operón del catabolismo de la prolina.



**Figura 44. Hibridación de ADN cromosómico de cepas de *P. putida* usando como sonda el mini-Tn5KmluxAB.** El ADN cromosómico digerido con *XhoI* de las cepas de *P. putida* KT2440 (calle 1), S14D2 (calle 2), S14D11 (calle 3), S15D3 (calle 4) y S16D2 (calle 5) se transfirió a una membrana de nilón tras su separación electroforética y se hibridó contra una sonda obtenida mediante marcaje con digoxigenina de un fragmento *SaII* de 4,7 Kb que contenía al gen que codifica para la resistencia a la kanamicina y los genes *luxAB*.

Una membrana obtenida de forma análoga a las anteriormente descritas se hibridó con una sonda que contenía parte del gen *putP* construida mediante el marcaje con digoxigenina de un fragmento de 1,2 kb obtenido por PCR con los cebadores 12U<sub>3</sub> y 12R<sub>7</sub> diseñados sobre la secuencia codificante del gen *putP*. El resultado de la hibridación de esta membrana en condiciones estrictas con la sonda del gen *putP* (Figura 45) mostró una señal positiva correspondiente a un fragmento *XhoI* de 4 kb tanto en la cepa silvestre como en cada uno de los mutantes lo que indicó que en ninguno de los mutantes se había producido la inserción del minitransposón en el gen *putP*.



**Figura 45. Hibridación de ADN cromosómico de cepas de *P. putida* usando como sonda el gen *putP* de *P. putida*.** El ADN cromosómico digerido con *XhoI* de las cepas de *P. putida* KT2440 (calle 1), S14D2 (calle 2), S14D11 (calle 3), S15D3 (calle 4) y S16D2 (calle 5) se transfirió a una membrana de nilón tras su separación electroforética, la cual se hibridó contra una sonda obtenida mediante marcaje con digoxigenina de un fragmento de 1 kb que contuvo parte del gen *putP* de *P. putida*.

### 3.1.2. Localización de la inserción del miniTn5 mediante secuenciación de las regiones adyacentes.

Para establecer la localización exacta del miniTn5 en el mutante S14D2 y el gen que estaba interrumpido en el resto de los mutantes se decidió secuenciar el ADN adyacente al extremo del minitransposón. Previa a la secuenciación fue necesaria la clonación del ADN cromosómico que flanqueaba al minitransposón con el objeto de facilitar la secuenciación efectiva de la región de interés.

#### 3.1.2.1. Clonación de la región de ADN adyacente al minitransposón miniTn5KmluxAB en distintos mutantes de *P. putida* KT2440.

El elemento transponible del minitransposón que se usó para la mutagénesis presentó tres dianas *Pst*I, una en el gen que confiere resistencia a kanamicina y otras dos en el gen *luxA* (Figura 46).

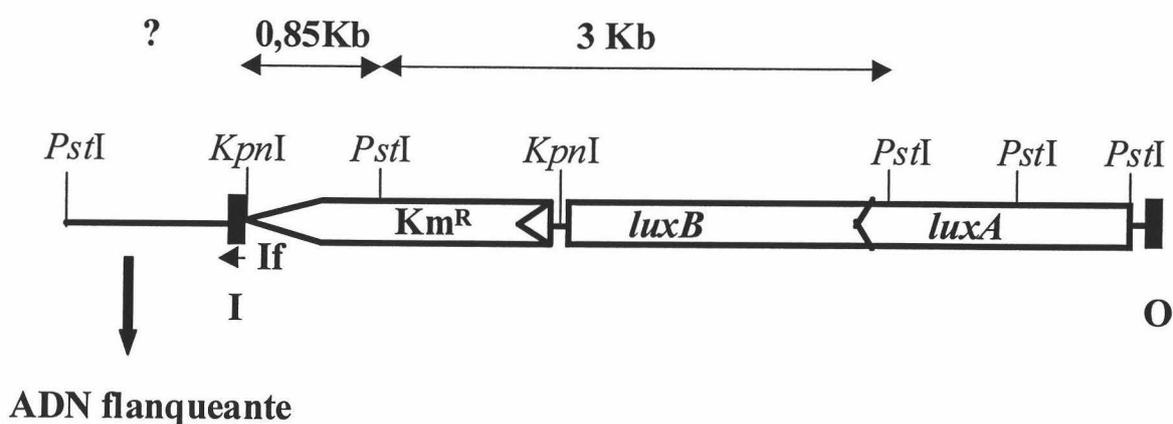
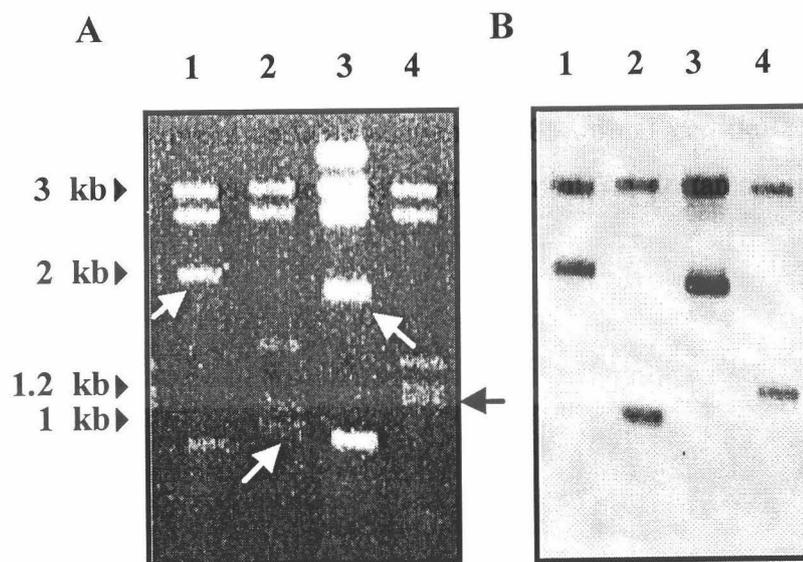


Figura 46. Localización de los sitios *Pst*I y *Kpn*I en el minitransposón miniTn5 KmluxAB insertado en el ADN cromosómico. El mapa muestra las posiciones de los sitios *Pst*I y *Kpn*I en el elemento transponible miniTn5KmluxAB una vez insertado en el cromosoma. El sitio *Pst*I situado más a la izquierda del esquema corresponde a un sitio *Pst*I hipotético perteneciente al ADN cromosómico que flanquea al elemento de inserción y situado a una distancia desconocida del extremo I del miniTn5.

Para la clonación del ADN que flanquea al miniTn5 se realizó una restricción parcial con la enzima *Pst*I (Ausubel *et al.*, 1999) del ADN cromosómico obtenido de los mutantes S14D2, S14D11, S15D3 y S16D2. El producto de las restricciones parciales se

transformó en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . De cada una de las transformaciones se seleccionó un clon resistente a Km para su posterior caracterización y secuenciación. Los plásmido recombinantes obtenidos se denominaron pS14D2-Km, pS14D11-Km, pS15D3-Km y pS16D2-Km los cuales portaban el ADN flanqueante al minitransposón de los mutantes S14D2, S14D11, S15D3 y S16D2 respectivamente. Una vez obtenidos se estimó mediante hibridación el tamaño del ADN cromosómico adyacente al minitransposón que existía en los plásmidos obtenidos. Para ello se digirió cada uno de los plásmidos con *Pst*I y tras electroforesis de los fragmentos resultantes se realizó una transferencia a una membrana de nilón cargada positivamente. Dicha membrana se hibridó con una sonda del gen que confiere resistencia a la kanamicina obtenida por marcaje con digoxigenina de un fragmento *Kpn*I de 1,5 kb obtenido a partir del plásmido pCK220. Los resultados obtenidos (**Figura 47**) mostraron que cada plásmido presentó dos fragmentos que fueron positivos en la hibridación, uno de 3 kb común a todos los plásmidos, y otro de tamaño variable que fue de 2 kb en el mutante S14D2, de 1,05 kb en el S14D11, de 1,9 kb en el S15D3 y de 1,2 kb en el S16D2. El fragmento común a todos los plásmidos correspondió al fragmento *Pst*I de 3 kb que contiene parte del gen de la kanamicina, el gen *luxB* y parte del gen *luxA* (**Figura 46**). Los fragmentos de tamaño variable contienen 0,85 kb del gen de la kanamicina y un fragmento de ADN cromosómico adyacente al miniTn5 de tamaño diferente en cada mutante.



**Figura 47. Localización de los fragmentos *PstI* que contienen el ADN flanqueante de los mutantes S14D2, S14D11, S15D3 y S16D2.** Los plásmidos pS14D2-Km, pS14D11-Km, pS15D3-Km y pS16D2-Km se digirieron con *PstI* y tras separación electroforética se tiñeron con bromuro de etidio (panel A). El ADN del gel del panel A se transfirió a una membrana y se hibridó contra una del gen de la kanamicina (panel B). Sobre la figura se señalan mediante una flecha los fragmentos *PstI* que contienen el ADN cromosómico que flanquea al minitransposón.

### **3.1.2.2. Secuenciación y análisis del ADN flanqueante al miniTn5 en cada uno de los mutantes deficientes en el catabolismo de la prolina.**

Tras la obtención de los plásmidos recombinantes portadores del ADN flanqueante al miniT5 se secuenciaron a partir del cebador If diseñado en el extremo I del minitransposón (**Figura 46**). La secuencia resultante se comparó con la base de datos TIGR BLAST. Esta base de datos contiene la secuencia completa del genoma de *P. putida* KT2440 (5 de septiembre de 2000), lo que permite, conocida una secuencia, obtener al menos 1 kb corriente arriba y otra corriente abajo de la secuencia dada. La secuencia obtenida de esta base de datos se comparó mediante el programa BLAST con las bases de datos existentes, lo que proporcionó información sobre los genes o proteínas similares que contenía dicha secuencia. El resultado de las comparaciones se expone a continuación.

#### **3.1.2.2.1. Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante S14D2.**

El plásmido pS14D2Km contiene clonado un fragmento de 1,95 kb de las cuales 1,1 kb corresponden al ADN cromosómico adyacente al minitransposón en el mutante S14D2. La secuencia nucleotídica de este fragmento se comparó con la base de datos TIGR BLAST de donde se obtuvo una secuencia de 3,1 kb perteneciente a un fragmento de ADN denominado “contig 31”. Esta secuencia se comparó mediante el programa BLAST con las existentes en las bases de datos resultando que fue similar a secuencias que codificaban para la enzima prolina deshidrogenasa, como era de esperar, confirmando así los resultados obtenidos mediante de hibridación en el apartado anterior. Una vez obtenida esta información se localizó la inserción del minitransposón en el mutante S14D2 a 1635 pb del codón de inicio de la traducción del gen *putA*.

### 3.1.2.2.2. Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante S15D3.

El plásmido pS15D3Km contiene clonado un fragmento de 1,9 kb de las cuales 1,1 kb corresponden al ADN cromosómico flanqueante al minitransposón en el mutante S15D3. La secuencia nucleotídica de este fragmento se trató de forma análoga a las anteriormente descritas y se obtuvo una secuencia de 2,9 kb perteneciente a un fragmento de ADN denominado por la base de datos TIGR BLAST como “contig 10760”. El resultado de la comparación utilizando el programa BLAST no reveló secuencias similares a la secuencia en estudio por lo que no se pudo establecer una hipótesis sobre la posible función del gen que estaba interrumpido por el minitransposón en el mutante S15D3.

### 3.1.2.2.3. Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante S14D11.

El plásmido pS14D11Km contiene clonado un fragmento de 1,05 kb de las cuales 0,2 kb corresponden al ADN cromosómico adyacente al minitransposón en el mutante S14D11. La secuencia nucleotídica de este fragmento se comparó con la base de datos TIGR BLAST de donde se obtuvo una secuencia de 2,2 kb perteneciente a un fragmento de ADN denominado “contig 10801”. Esta secuencia se comparó mediante el programa BLAST con las existentes en las bases de datos obteniéndose que era similar a secuencias que codifican para diversos reguladores transcripcionales de la familia NtrC. En la **Tabla 11** se detallan algunos de ellos, junto con el organismo al que pertenecen y su porcentaje de identidad con la secuencia en estudio y el nº de acceso a la bases de datos GenBank.

**Tabla 11. Proteínas similares a la codificada por la secuencia de ADN flanqueante al miniTn5 en el mutante S14D11.** La tabla recoge la información sobre porcentaje de identidad, organismo al que pertenece y nº de acceso a la base de datos GenBank de las proteínas homólogas a la secuencia adyacente al minitransposón miniTn5 en el mutante S14D11.

Proteína	Porcentaje de identidad	Organismo	Nº de acceso (GenBank)
NifA	78%	<i>Alcaligenes faecalis</i>	AF155934
PilR	44%	<i>Myxococcus xanthus</i>	L39904

NtrC	44%	<i>Herbaspirillum seronedicae</i>	AF082873
HYDG	41%	<i>S. typhimurium</i>	AF170176
ATOC	40%	<i>E. coli</i>	AE000311
AlgB	38%	<i>P. aeruginosa</i>	M62902

### 3.1.2.2.4. Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante S16D2.

El plásmido pS16D2Km contiene clonado un fragmento de aproximadamente 1,2 kb de las cuales 0,4 kb corresponden al ADN cromosómico adyacente al minitransposón en el mutante S16D2. La secuencia nucleotídica de este fragmento también se comparó con la base de datos TIGR BLAST de donde se obtuvo una secuencia de 2,4 kb perteneciente a un fragmento de ADN denominado “contig 10801”. Esta secuencia se comparó mediante el programa BLAST con las existentes en las bases de datos obteniéndose que era similar a secuencias que codifican para diversas proteínas sensoras del tipo de las histidín kinasas. En la **Tabla 12** se recogen algunas de esas proteínas junto al organismo al que pertenecen, su porcentaje de identidad y n° de acceso.

**Tabla 12. Proteínas similares a la codificada por el ADN flanqueante al miniTn5 en el mutante S16D2.** La tabla recoge la información sobre porcentaje de identidad, organismo al que pertenece y n° de acceso a la base de datos GenBank de las proteínas homólogas a la secuencia adyacente al minitransposón miniTn5 en el mutante S16D2.

Proteína	Porcentaje de identidad	Organismo	N° de acceso (GenBank)
HYDH	31%	<i>E. coli</i>	AE000473
CvgSY	30%	<i>P. syringae</i>	AF001355
EspA	28%	<i>Myxococcus xanthus</i>	AF181079
PilS	27%	<i>Myxococcus xanthus</i>	L39904
CckA	27%	<i>Caulobacter crescentus</i>	M62902
NtrB	25%	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X03146
ATOS	24%	<i>E. coli</i>	AE000311

### 3.2. Localización de la mutación en los mutantes resistentes a la 3,4 dehidroprolina.

Los mutantes PRO-21 y CRR216 se obtuvieron como resistentes al análogo tóxico de la prolina 3,4-DHP tal y como se describió en el **apartado 1.2.** de este capítulo. Se ha descrito anteriormente que la resistencia a 3,4-DHP suele deberse a una alteración en la secuencia aminoacídica de la proteína PutP que imposibilita el transporte de la 3,4 DHP al interior celular (Ratzkin *et al.*, 1978a; Wood *et al.*, 1981). Por tanto, lo esperado en los mutantes PRO-21 y CRR216 era que la proteína PutP presentara una o varias mutaciones en su secuencia de forma que explicara su fenotipo de resistencia a la 3,4DHP.

#### 3.2.1. Localización de la mutación en el mutante CRR216.

Pese a la predicción de que el mutante CRR216 contuviera una mutación en el transportador de la prolina, datos anteriores apuntaban hacia la hipótesis de que no era una pérdida de funcionalidad del transportador sino la ausencia de expresión del gen *putP* lo que producía la resistencia a la 3,4-DHP en esta cepa. Como se mostró en la **Figura 42** el mutante CRR216 no presentó expresión alguna del gen *putP* en presencia de prolina, lo que indujo a la búsqueda de la mutación en la región promotora de este mutante. Para ello se amplificó mediante PCR un fragmento de 910 pb a partir de los cebadores 12U<sub>1</sub> y PESP usando como molde ADN cromosómico extraído del mutante CRR216 con una temperatura de hibridación de 60°C. Dicho fragmento se secuenció mediante el uso de los cebadores empleados para la amplificación y la secuencia resultante se comparó con la de la cepa silvestre obtenida previamente y mostrada en la **Figura 32**. El resultado de la comparación de estas dos secuencias (**Figura 48**) mostró que el mutante CRR216 poseía una pequeña delección de 10 nucleótidos situados a 210 y 76 pb corriente arriba del sitio +1 los genes *putP* y *putA* respectivamente. La secuencia delecionada, cuya secuencia fue CAGGTGCAAC (**Figura 48**), formó parte de un motivo de 8 pb de secuencia GGTGCAAC el cual se encontró 5 veces repetido y una vez en su forma complementaria, a lo largo de la región comprendida entre el inicio de la traducción de los genes *putA* y *putP*.



tamaño mediante el uso de las parejas de cebadores SU<sub>7</sub>-SU<sub>2</sub>, SU<sub>5</sub>-4R<sub>1</sub> y 4RU<sub>2</sub>-12UR<sub>4</sub> (Figura 49). La comparación de la secuencia obtenida de estos fragmentos con la de la cepa silvestre mostró que en el gen *putA* del mutante PRO-21 existió un cambio de una guanina por una adenina en el fragmento amplificado por los cebadores SU<sub>7</sub> y SU<sub>2</sub> lo que produjo un cambio del glutámico 896 por una lisina en la secuencia aminoacídica de la proteína PutA. Este cambio se localizó dentro del dominio de la actividad pirrolina-5'-carboxilato deshidrogenasa según la predicción propuesta en el apartado 4.1. del capítulo I (Figura 24).

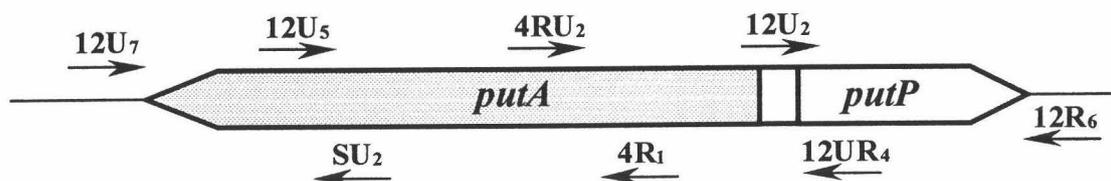
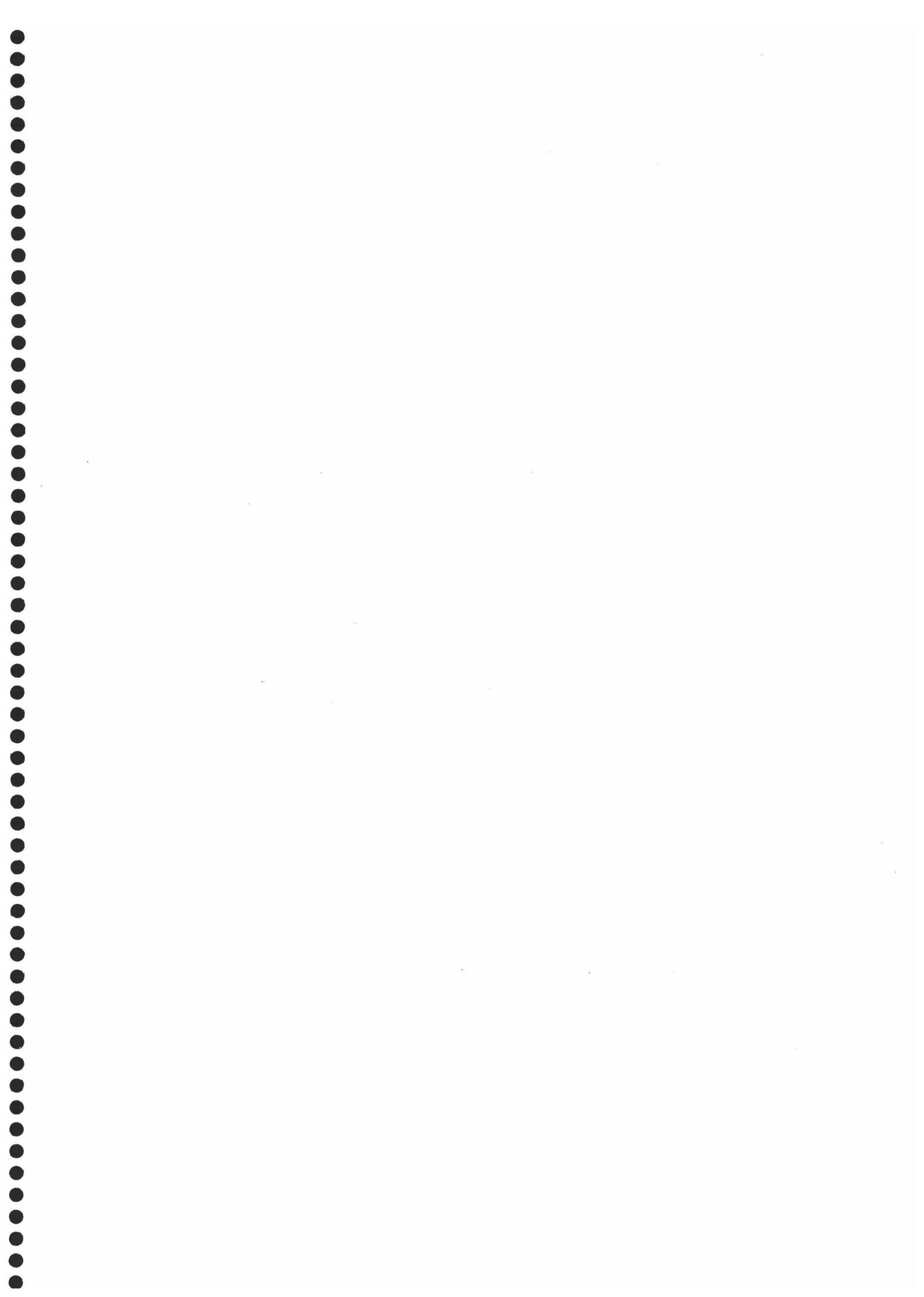


Figura 49. Localización de los cebadores utilizados en la amplificación del operón del catabolismo de la prolina. Se muestra mediante una flecha la localización y dirección en sentido 5'→3' de los cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes *putA* y *putP* del mutante PRO-21.



## Capítulo IV

### **Primeras aproximaciones en la construcción de una cepa de *P. putida* KT2440 portadora de un sistema activo de contención biológica dependiente de prolina.**

Como se mencionó en la introducción de esta Tesis Doctoral, *P. putida* KT2440 es un buen colonizador de la rizosfera de plantas además de ser una cepa adecuada para su manipulación genética, hechos que hacen que este microorganismo sea de interés para su uso en rizorremediación. Pero como se expuso anteriormente, la rizorremediación implica la liberación de organismos en ocasiones modificados genéticamente, por lo que puede ser necesario dotar a la célula de un sistema de contención de forma que cuando finalice la vida de la planta a cuya raíz se encuentra asociada, la célula induzca su propia muerte evitando así su permanencia en el medio ambiente.

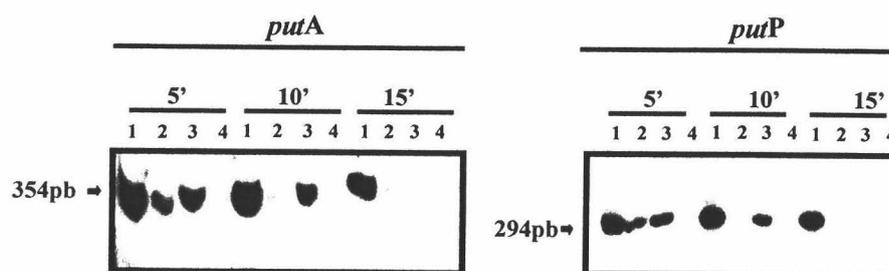
Por motivos detallados en la introducción, se eligió la prolina como señal química para un sistema de contención biológica de forma que su ausencia desencadenara la muerte celular. Para cumplir este objetivo era necesaria la construcción de un elemento regulador del sistema de contención que respondiera a prolina. Al estudiar los promotores del operón *put* de *P. putida* se observó que ambos eran inducibles por prolina por lo que parecieron candidatos idóneos para mediar la expresión de gen *lacI* conforme al esquema presentado en la **Figura 11** de la *Introducción* en el que se presentaban las bases del modelo de contención biológica mediado por prolina.

#### **1. Inducción de la expresión de los genes *put* por exudados de raíz de plantas de maíz.**

Como se mencionó en la introducción, las raíces de plantas exudan una compleja mezcla de compuestos orgánicos de entre los cuales los aminoácidos representan un grupo importante. Muchos autores han demostrado que la prolina está presente en estos exudados (Vancura *et al.*, 1965; Verslues *et al.*, 1999), pero al comenzar este estudio no se habían realizado ensayos que permitiesen discernir si la cantidad de prolina

presente en un exudado sería suficiente para inducir los genes *put* en un microorganismo. Con objeto de aclarar esta situación en *P. putida* KT2440, se realizó un análisis de la expresión de los genes *putA* y *putP* en células expuestas a exudados radiculares obtenidos mediante cultivos hidropónicos de plantas de maíz (**apartado 17** de *Materiales y Métodos*). En este ensayo se procedió como sigue: primero *P. putida* KT2440 se cultivó en 100 mL de medio mínimo M9 con 20 mM de succinato durante 12-14 h, tras lo cual el cultivo se lavó con medio M8 y se resuspendió en un décimo del volumen inicial. La suspensión celular se utilizó para inocular, hasta una turbidez de 0,7 de D.O.<sub>660 nm</sub>, los siguientes medios: 1) M9 con 20 mM de succinato y 0,2 mM de prolina; 2) exudados radiculares obtenidos en M9 durante 3 días; 3) exudados radiculares obtenidos en M9 durante 7 días y 4) medio M9 con 20 mM de succinato. Tras 5', 10' y 15' de incubación a 30°C se recogieron fracciones alícuotas de 5 mL de cada suspensión celular y se procedió a la extracción del ARN total. Se extendieron aproximadamente 28µg de ARN total con los cebadores 12U1 y PESP con objeto de determinar la expresión de los genes *putA* y *putP* respectivamente. Tras la electroforesis de los fragmentos obtenidos (**Figura 50**) se observó que 5' después de la inducción, los genes *put* se expresaron en los medios con 0,2 mM de prolina y de los exudados de raíz de maíz, lo que indicó que la cantidad de prolina presente en ellos era suficiente para la activación de los promotores  $P_{putA}$  y  $P_{putP}$ . Diez minutos después de la inducción sólo se observó expresión de los genes *put* en células en el medio con 0,2 mM de prolina y con los exudados recogidos durante 7 días. Por el contrario, no se observó expresión en aquellas células que se habían incubado con los exudados recogidos durante 3 días, probablemente debido a que la prolina se había agotado como consecuencia del metabolismo celular. Trascorridos 15' desde la inducción sólo se observó expresión en el medio que contenía 0,2 mM de prolina.

Tras comprobar que la prolina exudada por las raíces de plantas de maíz es suficiente para inducir la expresión de los promotores de los genes *putA* y *putP*, se comenzó con la construcción del sistema de contención dependiente de prolina.



**Figura 50. Expresión de los genes *putA* y *putP* en presencia de exudados radiculares de plantas de maíz.** Un cultivo de *P. putida* KT2442 en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato se diluyó como se describe en el texto en medios que contenían M9 con 0,2 mM de prolina (calles 1), exudados radiculares obtenidos durante 3 días (calles 2), exudados radiculares obtenidos durante 7 días (calles 3) y en medio M9 con 20 mM de succinato (calles 4). Las figuras muestran el patrón de expresión de los genes *putA* y *putP* en los distintos medios a lo largo del tiempo.

## 2. Diseño y construcción de un sistema activo de contención biológica en *P. putida* KT2440.

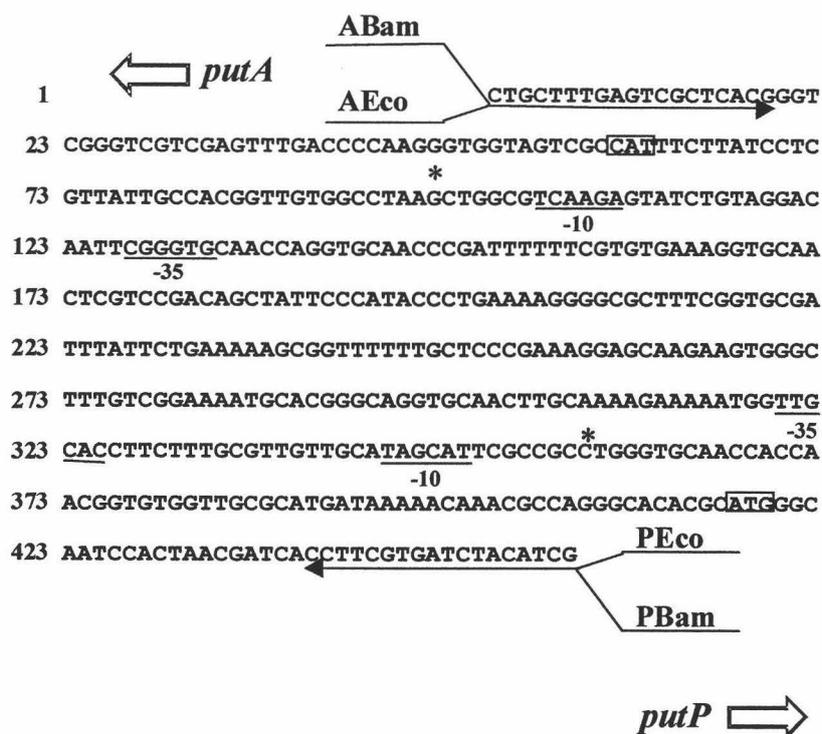
Como se mencionó en la introducción, un sistema de contención biológica consta de dos elementos, un elemento matador que expresa una proteína letal para la célula y un elemento regulador que controla la expresión del gen matador. El elemento matador seleccionado para la construcción de una cepa contenida dependiente de prolina fue el gen *E* existente en el vector pMCC31 construido por la Doctora Ronchel (Ronchel *et al.*, 1995; Ronchel *et al.*, 1998) (Figura 16). El plásmido pMCC31 contiene una fusión transcripcional del promotor sintético  $P_{AI-04/03}$  (Lanzer *et al.*, 1988) al gen *E* del fago  $\Phi X174$ . El promotor  $P_{AI-04/03}$  es un derivado del promotor natural  $P_{lac}$  el cual presenta unos niveles de represión por la proteína LacI 7 veces superiores a los que presenta  $P_{lac}$ .

### 2.1. Construcción de una cepa de *P. putida* portadora del elemento regulador del sistema de contención.

#### 2.1.1. Construcción de las fusiones transcripcionales $P_{putA}::lacI$ y $P_{putP}::lacI$ .

Para la construcción del elemento regulador del sistema de contención se fusionaron los promotores del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* KT2440 al gen *lacI*. Se construyeron dos fusiones transcripcionales, una entre el gen

*lacI* y el promotor  $P_{putA}$  y otra entre el *lacI* y el promotor  $P_{putP}$ . Como se describió en capítulos anteriores, la región existente entre los genes *putA* y *putP* es esencial para la regulación del operón ya que en ella se sitúan las regiones de unión de la proteína PutA al ADN, lo que permite la represión del operón cuando no existe prolina en el medio. A esta región se le denominó región promotora-reguladora, término que describe las dos funciones que realiza. Dado que esta región es esencial para la regulación, se fusionó toda ella al gen *lacI*. Para el caso de la fusión  $P_{putA}::lacI$ , la región promotora-reguladora se amplificó mediante con los cebadores PEco y ABam (Figura 51), los cuales tenían diseñadas en sus extremos secuencias diana para las enzimas *EcoRI* y *BamHI* respectivamente. Se usaron 10 ng de ADN cromosómico de *P. putida* KT2440 como molde en la reacción de amplificación. Por otro lado, el gen *lacI* se amplificó mediante PCR a partir de los cebadores LacI3 y LacI5, usando como molde ADN cromosómico de la cepa de *E. coli* JM109. De igual forma, en los extremos de los cebadores LacI3 y LacI5 existían secuencias diana para las enzimas *BamHI* y *XbaI* respectivamente.



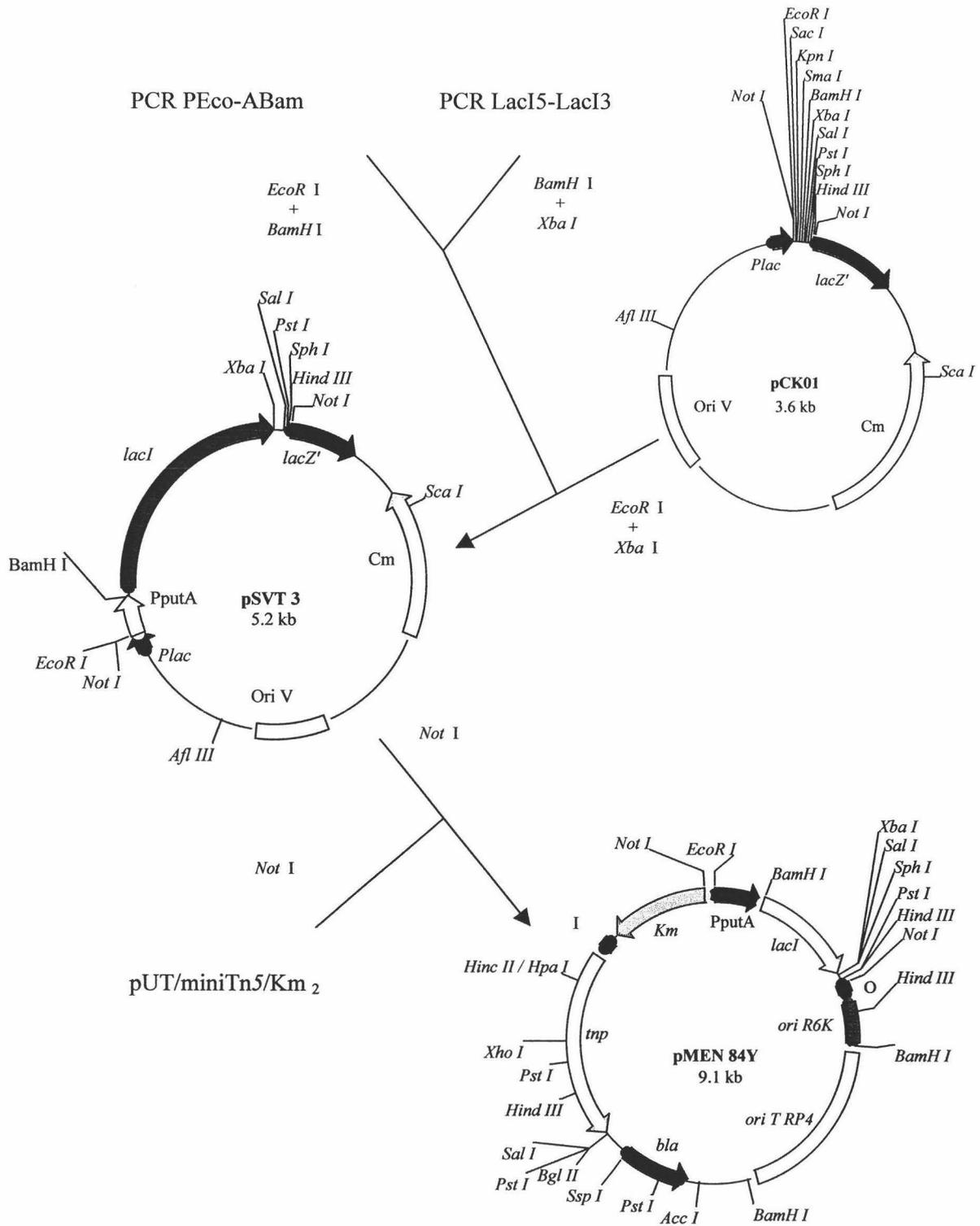
**Figura 51. Localización de los cebadores ABam, AEco, PBam y PEco.** La figura muestra la localización de los cebadores empleados utilizados para la amplificación de la región promotora-reguladora del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* KT2440. Los cebadores ABam y AEco están diseñados sobre la secuencia codificante del gen *putA* y poseen en su extremo 5' una secuencia diana para las enzimas *BamHI* y *EcoRI* respectivamente. Los cebadores PBam y PEco están diseñados sobre la secuencia codificante del gen *putP* y poseen en sus extremos 5' una secuencia diana para las enzimas *BamHI* y *EcoRI* respectivamente.

Los fragmentos obtenidos se digirieron con las enzimas correspondientes, *EcoRI* y *BamHI* en el caso del fragmento que contenía la región promotora-reguladora y *XbaI* y *BamHI* en el caso del fragmento que contenía el gen *lacI*. Los dos fragmentos se ligaron entre sí y a su vez al plásmido pCK01 previamente digerido con *EcoRI* y *XbaI*. El producto de la ligación se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y los plásmidos recombinantes se seleccionaron en medio rico LB con Cm y X-gal. Posteriormente, y con objeto de comprobar que los plásmidos recombinantes obtenidos poseían la fusión  $P_{putA}::lacI$ , se realizó una PCR de colonia usando los cebadores LacI3 y PEco. Uno de los clones que portaba la fusión  $P_{putA}::lacI$  correcta se eligió al azar y al plásmido se le denominó pSVT3 (**Figura 52**).

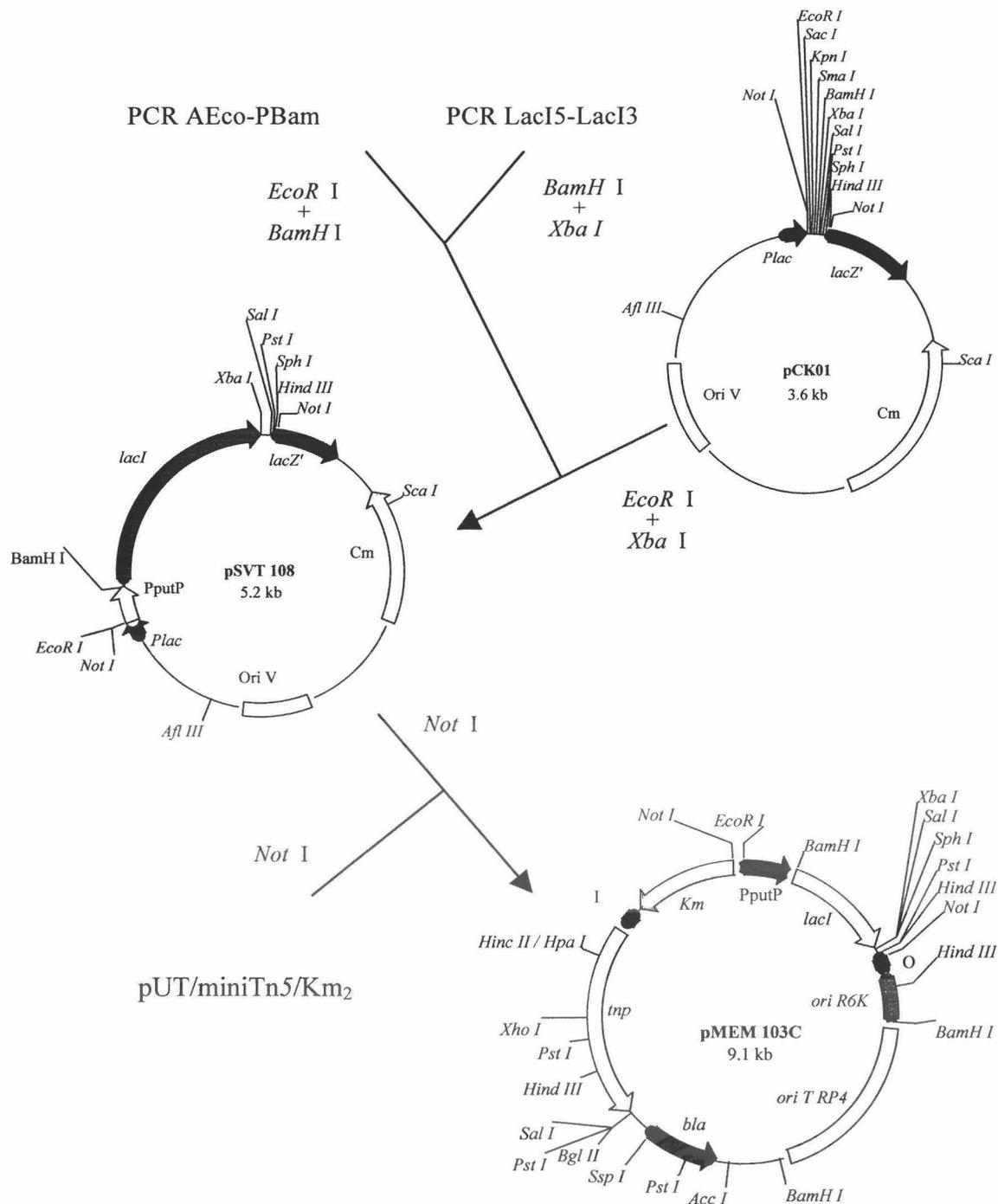
La fusión  $P_{putP}::lacI$  se realizó de forma similar a la fusión  $P_{putA}::lacI$  con la diferencia de que la amplificación de la región promotora-reguladora se realizó con los cebadores AEco y PBam (**Figura 51**). La fusión  $P_{putP}::lacI$  se comprobó utilizando los cebadores ABam y LacI3 y el plásmido seleccionado se pSVT108 (**Figura 53**).

### 2.1.2. Clonación del elemento regulador en un vector de transferencia.

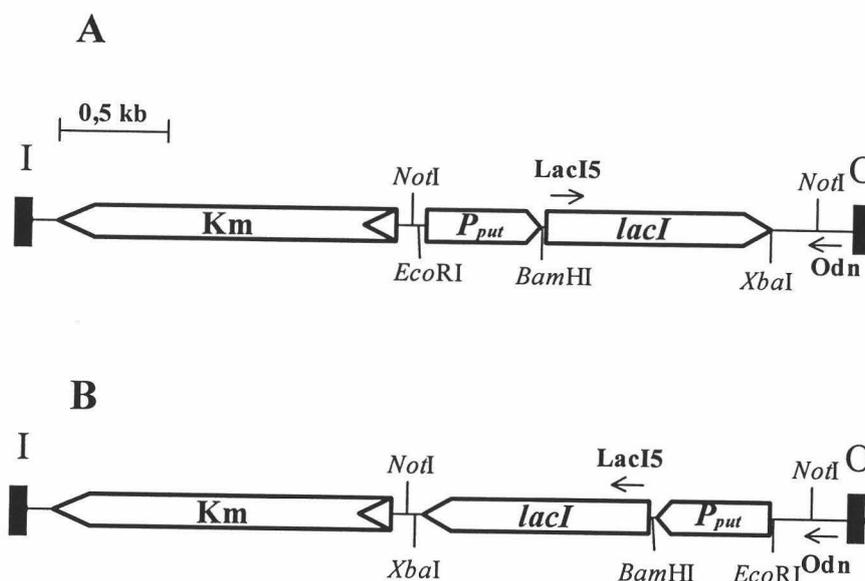
Con objeto transferir el elemento regulador del sistema de contención al cromosoma de *P. putida* KT2440 se subclonaron en el sitio *NotI* del vector de transferencia pUT/miniTn5/Km<sub>2</sub> (de Lorenzo *et al.*, 1990) las fusiones transcripcionales  $P_{putA}::lacI$  y  $P_{putP}::lacI$ . Para ello, los plásmidos pSVT3 y pSVT108 se digirieron con *NotI* y los fragmentos de 1,6 kb obtenidos que contenían las fusiones  $P_{putA}::lacI$  y  $P_{putP}::lacI$  se ligaron por separado al vector pUT/miniTn5/Km<sub>2</sub> previamente digerido con la misma enzima. El producto de la ligación se transformó en la cepa *E. coli* Mv1190  $\lambda$ pir y los transformantes se seleccionaron en placas de medio rico LB con Km y Ap. De las dos posibles orientaciones del inserto (**Figura 54**) se seleccionaron mediante PCR de colonia aquellas que amplificaban con los cebadores Odn y LacI5 (**Figura 54A**). Del resultado de la selección se obtuvieron los plásmidos pMEM84Y (**Figura 52**) y pMEM103C (**Figura 53**).



**Figura 52. Construcción de los plásmidos pSVT3 y pMEM84Y.** La construcción de los plásmidos pSVT3 y pMEM84Y portadores de la fusión *P<sub>putA</sub>::lacI* se detalla en el texto. En la figura se indican los genes que confieren resistencia a la kanamicina (Km) y al cloramfenicol (Cm) además de los genes que codifican para la transposasa (*tnp*), el origen de replicación (*ori R6K*) y el origen de transferencia (*ori T RP4*). Los bordes del miniTn5 se indican por las letras I (izquierdo) y O (derecho).



**Figura 53. Construcción de los plásmidos pSVT108 y pMEM103C.** La construcción de los plásmidos pSVT108 y pMEM103C portadores de la fusión  $P_{pup}::lacI$  se detalla en el texto. En la figura se indican los genes que confieren resistencia a la kanamicina (Km) y al cloramfenicol (Cm) además de los genes que codifican para la transposasa (*tnp*), el origen de replicación (*ori R6K*) y el origen de transferencia (*ori T RP4*). Los bordes del miniTn5 se indican por las letras I (izquierdo) y O (derecho).



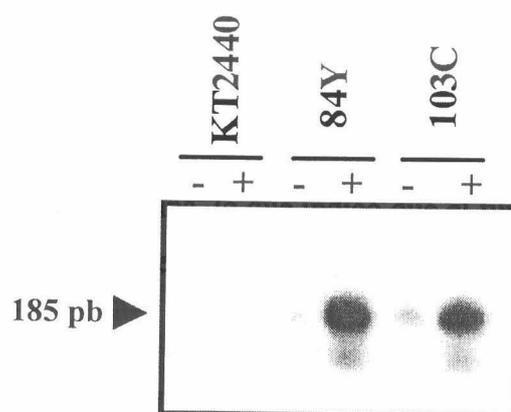
**Figura 54.** Disposición de las dos posibles orientaciones en el clonaje de las fusiones  $P_{put}::lacI$  en el vector de transferencia pUT/miniTn5/Km<sub>2</sub>. En la figura se muestra la localización de los extremos del miniTn5 señalados como I y O, la disposición del gen de resistencia a la Km y las dos posibles orientaciones del fragmento  $NoI$  que contiene la fusión de cualquiera de los promotores  $put$  con el gen  $lacI$ . De igual forma se muestran la disposición de los cebadores  $LacI5$  y  $Odn$  utilizados para la selección de la orientación mostrada en el panel A.

### 2.1.3. Construcción de una cepa de *P. putida* portadora del elemento regulador del sistema de contención dependiente de prolina.

Una vez obtenidos los plásmidos pMEM84Y y pMEM103C, los cuales portaban las fusiones  $P_{putA}::lacI$  y  $P_{putP}::lacI$  respectivamente, se procedió a la transferencia de dichas fusiones al cromosoma de *P. putida* KT2440 con objeto de que fueran estables y estuvieran en monocopia. Debido a que los plásmidos pMEM84Y y pMEM103C son suicidas en *Pseudomonas*, la introducción de los mismos en dicha cepa mediante conjugación tripartita tuvo como consecuencia la transferencia de las fusiones al cromosoma de la bacteria. La conjugación se realizó entre las cepas donadoras *E. coli* Mv1190  $\lambda$ pir (pMEM84Y o pMEM103C), la cepa receptora *P. putida* KT2440 y la cepa auxiliadora *E. coli* HB101 (RK600). Tras 8-10 horas a 30°C los transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo M9 con 5 mM de benzoato y Km con una frecuencia del orden de  $10^{-5}$  transconjugantes por receptor. De cada una de las conjugaciones se seleccionó un clon al azar a los que se les denominó *P. putida* 84Y (portadora de la fusión  $P_{putA}::lacI$ ) y *P. putida* 103C (portadora de la fusión  $P_{putP}::lacI$ ).

## 2.2. Expresión del gen *lacI* en presencia y ausencia de prolina.

Con objeto de comprobar que las fusiones  $P_{putA}::lacI$  y  $P_{putP}::lacI$  funcionaban de forma correcta y que la expresión del gen *lacI* en las cepas *P. putida* 84Y y *P. putida* 103C era dependiente de la presencia de prolina, se realizó una extensión reversa a partir de cebador. Para ello, las cepas *P. putida* KT2440, 84Y y 103C se cultivaron en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato durante 10-12 h, tras lo cual se diluyeron en el mismo medio mínimo fresco hasta una turbidez de 0,4. Dos horas después, cada cultivo se dividió en dos fracciones alícuotas, a una de ellas se le añadió prolina hasta una concentración de 20 mM mientras que la otra fracción permaneció sin inducir. Dos horas después de la inducción se recogieron los cultivos y se extrajo el ARN total. Se realizó una extensión reversa a partir del cebador LacI4, diseñado a 62 pb del inicio de la traducción del gen *lacI*, usando como molde 24  $\mu$ g de ARN total. Tras electroforesis de los fragmentos obtenidos en la extensión (**Figura 55**) se observó que el gen *lacI* se expresó en las cepas *P. putida* 84Y y 103C pero no en la cepa KT2440 tal y como era de esperar dado que *Pseudomonas* carece de este gen. Se observó que la expresión del gen *lacI* en las cepas 84Y y 103C en ausencia de prolina tenía lugar a un bajo nivel basal pero era inducible por prolina, lo que indicó que el funcionamiento de las fusiones  $P_{putA}::lacI$  y  $P_{putP}::lacI$  era el esperado.



**Figura 55.** ADNc resultante de la expresión del gen *lacI* en las cepas *P. putida* KT2440, 84Y y 103C. Se muestra el producto del ADNc de 185 bases resultante de la expresión del gen *lacI* en la cepa silvestre (KT2440) y las cepas portadoras de las fusiones  $P_{putA}::lacI$  (84Y) y  $P_{putP}::lacI$  (103C) en presencia (+) y ausencia (-) de prolina.

### 2.3 Construcción de una cepa de *P. putida* KT2440 portadora del sistema de contención biológica dependiente de prolina.

Una vez construidas las cepas de *P. putida* portadoras de los elementos reguladores  $P_{putA}::lacI$  y  $P_{putP}::lacI$  se introdujo el elemento matador con objeto de obtener una cepa contenida de *P. putida* KT2440 dependiente de prolina. Como se mencionó anteriormente el elemento matador utilizado fue el existente en el plásmido pMCC31 que contiene el gen suicida *E* del fago  $\phi$ X174 expresado desde el promotor  $P_{AI-03/04}$  en el vector de transferencia pJMSB4 (**Figura 16** de *Materiales y Métodos*). La transferencia del plásmido pMCC31 se realizó mediante electroporación de 500 ng de plásmido pMCC31 en las cepas *P. putida* 84Y y 103C. En la preparación de las células electrocompetentes se tuvo la precaución de cultivarlas en presencia de 40 mM de prolina con objeto de asegurar la expresión del gen *lacI* de manera que en el momento de la entrada del plásmido pMCC31 hubiese suficiente cantidad de LacI que inhibiera la expresión del gen *E* desde el promotor  $P_{AI-03/04}$ . Tras el choque eléctrico las células se incubaron 1 h en medio LB con 40 mM de prolina, y posteriormente se sembraron en placas de LB con 40 mM de prolina, Km y telurito potásico (Tel). Cien de los transconjugantes obtenidos se sembraron en los medios M9 con 20 mM de glucosa, M9 con 20 mM de glucosa y 40 mM de prolina, LB y LB con 5 mM de IPTG, todos ellos suplementados con Km y Tel, con objeto de estudiar su comportamiento.

Tras 24 h de incubación a 30°C no se observó crecimiento alguno en el medio LB con 5 mM de IPTG, sin embargo en todos los demás casos se observó fuerte crecimiento. El comportamiento esperado según nuestro diseño teórico era que no existiera crecimiento en el medio M9 con 20 mM de glucosa ya que carecía de prolina para inducir la expresión del gen *lacI* pero el resultado no fue ese. Dado que las cepas morían en presencia de IPTG se descartó que el elemento matador no fuera funcional. La explicación más sencilla para explicar la supervivencia de las cepas en ausencia de prolina era que la expresión basal de los promotores del operón *put* observada en la **Figura 55** fuera suficientemente alta para sintetizar una cantidad de proteína LacI que reprimiese la expresión del gen matador (ver **Figura 55**). Este hecho hizo necesario el planteamiento de nuevas alternativas en la construcción del sistema de contención.

### 3. Mejora del sistema activo de contención biológica.

Si la hipótesis propuesta era correcta, el hecho de que las cepas obtenidas sobrevivieran en ausencia de prolina era debido a la alta expresión basal de los promotores  $P_{putA}$  y  $P_{putP}$  por lo que cualquier mejora diseñada en el elemento regulador del sistema de contención debía estar enfocada en la disminución de dicha expresión basal.

Como se demostró en el capítulo anterior mediante el estudio del mutante S14D2, la proteína PutA juega un papel fundamental en la represión de la expresión del operón *put*, tal y como ocurre en otros organismos. Dado que los dos elementos más importantes que intervienen en la regulación del operón *put* son la región promotora-reguladora y la proteína PutA, se diseñaron estrategias de mejora del sistema de contención enfocadas a ambos elementos. Una de las estrategias adoptada fue la mutagénesis de la región promotora-reguladora con el objeto de provocar un cambio en su secuencia que disminuyera de manera ideal la expresión basal del promotor pero no la inducible. La otra estrategia propuesta a considerar era aumentar la cantidad de proteína PutA en la célula con el objeto de favorecer la unión del regulador PutA a la región promotora-reguladora.

#### 3.1. Mutagénesis de la región de ADN comprendido entre los genes *putA* y *putP*.

##### 3.1.1 Obtención de regiones promotoras-reguladoras mutantes con niveles basales de expresión menores que la silvestre.

Para la obtención de regiones promotoras-reguladoras con un menor nivel basal de expresión que el presentado por la región silvestre se utilizó la técnica de amplificación por PCR en condiciones mutagénicas descrita en el apartado 14.2. de los *Materiales y Métodos*. Usando 10 ng de ADN cromosómico de *P. putida* KT2440 como molde se amplificaron un conjunto de fragmentos mutantes de 0,5 kb a partir de los cebadores AEco y PEco, los cuales tenían diseñados una diana *EcoRI* en sus extremos 5' para facilitar su posterior clonaje. Tras la digestión con *EcoRI*, el fragmento se ligó al plásmido pMP220 previamente digerido con *EcoRI*, la mezcla de ligación se transformó

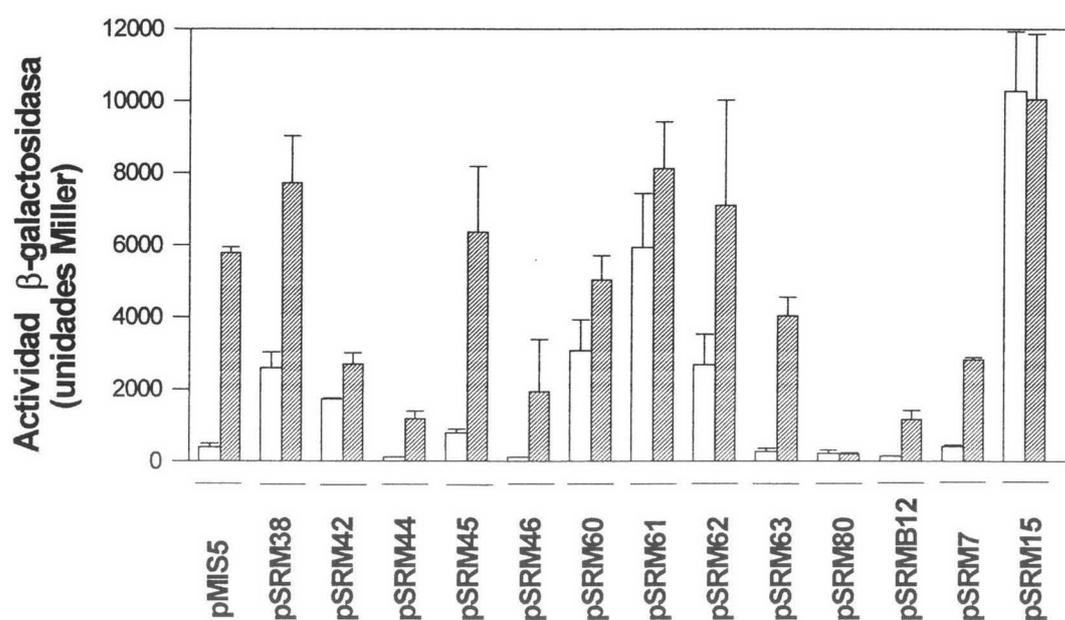
en *P. putida* mediante electroporación y los transformantes se seleccionaron en medio LB con Tc y X-gal. Todos aquellos clones que presentaron coloración azul se seleccionaron para su posterior caracterización, que consistió en el análisis de la orientación de la región promotora-reguladora clonada en pMP220 y en la medida de su actividad  $\beta$ -galactosidasa. La identificación de la orientación del inserto en cada uno de los plásmidos mutantes seleccionados se realizó mediante PCR de colonia con las parejas de cebadores AEco-OSLacZ y PEco-OSLacZ usando una temperatura de hibridación de 60 y 52°C respectivamente. De los 41 plásmidos recombinantes obtenidos, 13 contuvieron la fusión  $P_{putA}::lacZ$  y 27 la fusión  $P_{putP}::lacZ$ .

Una vez identificada la orientación del inserto, se analizó la expresión de cada uno de los promotores mutantes mediante medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa y se comparó con la expresión de los promotores silvestres. Para ello, se cultivaron células de *P. putida* portadoras de cada uno de los plásmidos recombinantes (pSRM<sub>i</sub>) y las cepas control *P. putida* (pMIS5) y *P. putida* (pMIS12) en medio LB con Tc durante 12-14 h, tras lo cual, se diluyeron los cultivos en medio mínimo M9 con 20 mM de succinato. Después de 3 h de incubación a 30°C, cada cultivo se dividió en dos fracciones alícuotas de 2 mL, a una de las cuales se le añadió prolina hasta una concentración final de 20 mM mientras que la otra no se indujo. Dos horas después de la inducción se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de los cultivos como se describió en el **apartado 15** de los *Materiales y Métodos*. La actividad  $\beta$ -galactosidasa de los plásmidos recombinantes ensayados (**Figuras 56 y 57**) resultó ser muy diferente a la actividad presentada por los plásmidos silvestres. A grandes rasgos, el comportamiento de los promotores mutantes se pudo agrupar en tres grupos:

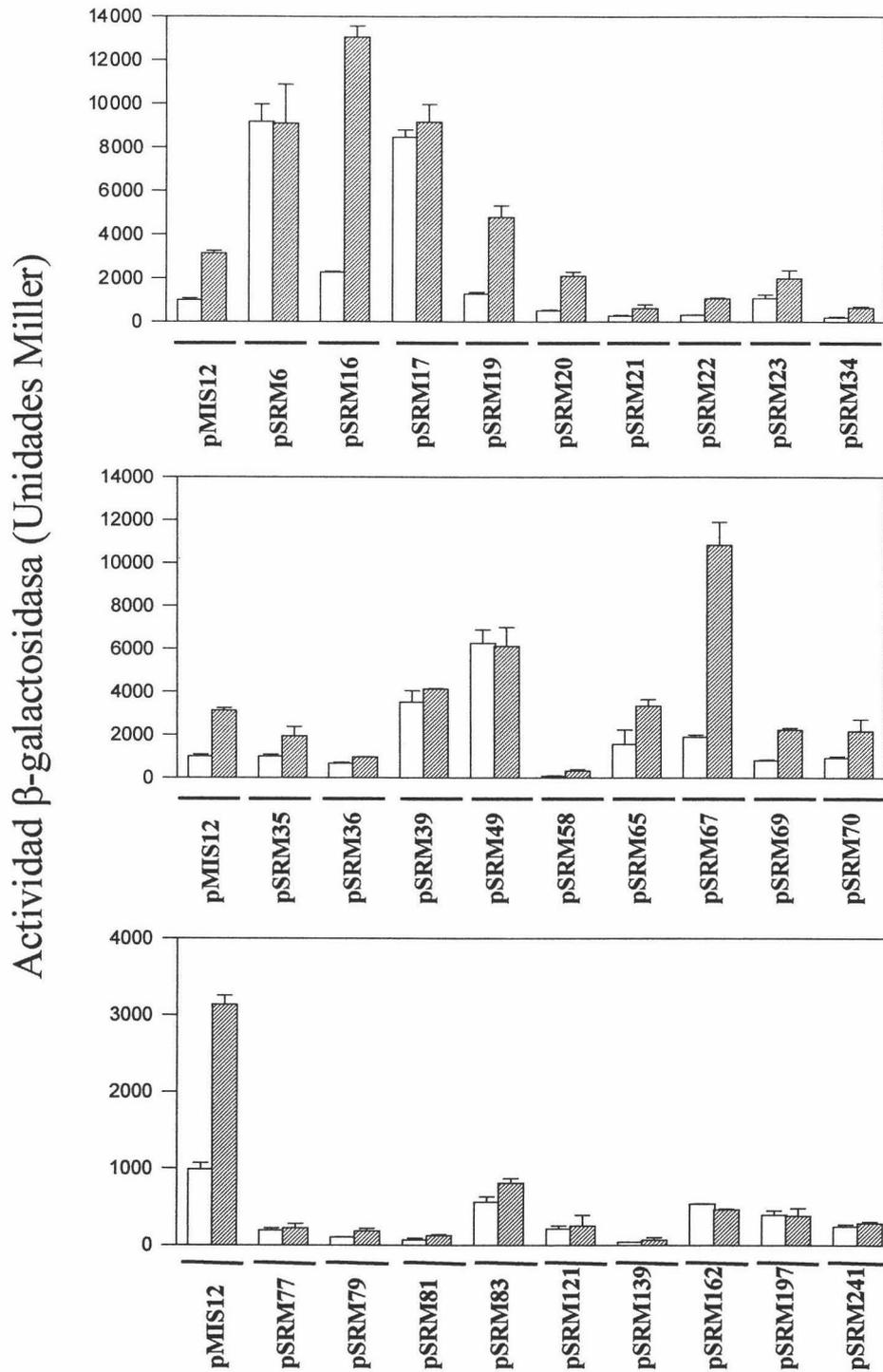
- Uno de los grupos englobó a aquellos promotores mutantes que habían perdido la capacidad de expresarse a consecuencia de las mutaciones acumuladas. Este fue el caso de los promotores contenidos en los plásmidos pSRM22, pSRM21, pSRM39, pSRM43, pSRM58, pSRM77, pSRM79, pSRM80, pSRM81 y pSRM134.
- Otro grupo lo constituyeron aquellos promotores mutantes que presentaron una expresión basal muy alta, en ocasiones similar a la expresión en

condiciones de inducción. Este fue el caso de los plásmidos pSRM6, pSRM6, pSRM15, pSRM17, pSRM39, pSRM49 y pSRM61.

- El resto de los plásmidos no perdieron su capacidad de inducción ya que presentaron bajos niveles de expresión en ausencia de prolina y altos niveles de expresión en presencia de prolina, aunque los valores mostrados diferían de los de los promotores silvestres.



**Figura 56. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de distintas fusiones  $P_{putA}::lacZ$ .** La figura muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa de cepas de *P. putida* KT2440 portadoras de los plásmidos recombinantes con las fusiones  $P_{putA}::lacZ$  de la región promotora-reguladora silvestre (pMIS5) y de las mutantes (pSRMi) en ausencia (barras blancas) y en presencia (barras rayadas) de prolina.



**Figura 57. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de distintas fusiones  $P_{putP}::lacZ$ .** La figura muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa de cepas de *P. putida* KT2440 portadoras de los plásmidos recombinantes con las fusiones  $P_{putP}::lacZ$  de la región promotora-reguladora silvestre (pMIS5) y de las mutantes (pSRMi) en ausencia (barras blancas) y en presencia (barras rayadas) de prolina.

Para la construcción del elemento regulador del sistema de contención fueron de interés aquellas regiones promotoras-reguladoras mutantes que conservaron la capacidad de inducción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa pero que poseían una actividad basal menor que la región silvestre. Este fue el caso la región existente en el plásmido pSRM44, la cual presentó una actividad basal 4 veces menor que la región silvestre. Esta región, denominada  $P_{put44}$ , fue seleccionada para la construcción del elemento regulador del sistema de contención.

### **3.1.2. Construcción de un nuevo sistema de contención biológica con un elemento regulador basado en la fusión $P_{put44}::lacI$ .**

#### **3.1.2.1. Construcción de la fusión $P_{put44}::lacI$ .**

La construcción de la fusión transcripcional  $P_{put44}::lacI$  se realizó de forma análoga a las fusiones descritas en el **apartado 2.1.1** de este capítulo. El gen *lacI* se amplificó de igual forma que la descrita en dicho apartado. La región promotora-reguladora se amplificó a partir del plásmido pSRM44 con los cebadores PEco y ABam. El fragmento de PCR que contenía el gen *lacI* se digirió con *XbaI* y *BamHI*, mientras que el fragmento que contenía la región promotora-reguladora  $P_{put44}$  se digirió con *EcoRI* y *BamHI*. Ambos fragmentos se ligaron al vector pCK01 previamente digerido con *EcoRI* y *XbaI*. El producto de la ligación se transformó en *E. coli* DH5 $\alpha$  y los transformantes se seleccionaron en medio LB con Cm y X-gal. A las colonias blancas obtenidas se les comprobó la existencia de la fusión  $P_{put44}::lacI$  mediante PCR de colonia usando los cebadores PEco y LacI3. De los plásmidos que resultaron positivos se seleccionó uno al azar que se denominó pSVT44 el cual se utilizó para la construcción del elemento regulador del sistema de contención.

#### **3.1.2.2. Clonación de la fusión $P_{put44}::lacI$ en un vector de transferencia y construcción de una cepa de *P. putida* portadora en el cromosoma de dicha fusión.**

La transferencia de la fusión  $P_{put44}::lacI$  al vector pUT/miniTn5/Km<sub>2</sub> se realizó de forma similar a la descrita en el **apartado 2.1.2** usando el plásmido pSVT44 en vez de los plásmidos pSVT3 y pSVT108. El plásmido de transferencia resultante se

denominó pMEM44C el cual se transfirió a *P. putida* mediante conjugación tripartita tal y como se describe en el **apartado 2.1.3.** obteniéndose la cepa *P. putida* 44C.

### **3.1.2.3. Construcción de una cepa suicida basada en el elemento regulador $P_{put44}::lacI$ .**

El elemento matador presente en el plásmido pMCC31 se transfirió al cromosoma de *P. putida* 44C mediante electroporación, de forma similar a la descrita en el **apartado 2.2.** A los clones seleccionados se les ensayó su capacidad de crecimiento en los medios M9 con 20 mM de glucosa, M9 con 20 mM de glucosa y 40 mM de prolina, LB y LB con 5 mM de IPTG. Tras 24 h de incubación observó crecimiento en todos los medios con excepción del medio que contenía IPTG.

De este resultado se concluye que la disminución de la expresión basal conseguida con la fusión  $P_{put44}::lacI$  con respecto a la fusión silvestre  $P_{putA}::LacI$  no es suficiente para evitar la presencia del represor LacI en ausencia de prolina, por lo que se hace necesario el planteamiento de una nueva alternativa para la mejora del sistema de contención biológica.

### **3.2. Estudio del efecto del aumento de la dosis de la proteína PutA en la expresión de los promotores $P_{put}$ .**

Como se ha citado anteriormente la proteína PutA juega un papel fundamental en la regulación de los promotores *put* gracias a la capacidad que tiene esta proteína de unirse a la región de ADN existente entre los genes *putA* y *putP*. El nivel basal de expresión que se observa en los genes *put* puede deberse a que la cantidad de proteína PutA en la célula sea limitante por lo que se permite un cierto nivel de expresión. Si esta hipótesis fuese correcta, el sistema de contención biológica se podría mejorar aumentando la cantidad de proteína PutA en la célula. Con objeto de comprobar esta hipótesis se analizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de los plásmidos pMIS5 y pMIS12 en el mutante CRR216 el cual presenta una expresión del gen *putA* muy superior a la de la cepa silvestre en ausencia de prolina. Para ello se cultivaron células de *P. putida* KT2440 y CRR216 portadoras de los plásmidos pMIS5 y pMIS12 en medio LB con Tc durante 10-12 h, las cuales se diluyeron 100 veces en 4 mL de medio mínimo M9 con

20 mM de succinato y después de 5 h de incubación se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa de los cultivos. Los resultados obtenidos revelaron que la expresión del gen *lacZ* en los plásmidos pMIS5 y pMIS12 fue menor en la cepa CRR216 que en la cepa silvestre (Figura 58). Así, la expresión basal del promotor *putA* en el mutante CRR216 se redujo en un 90% con respecto a la actividad de la cepa silvestre mientras que la expresión basal del promotor *putP* lo hizo en un 75%.

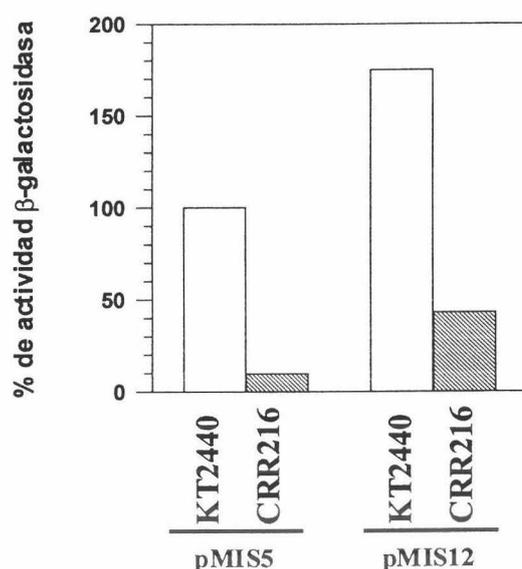
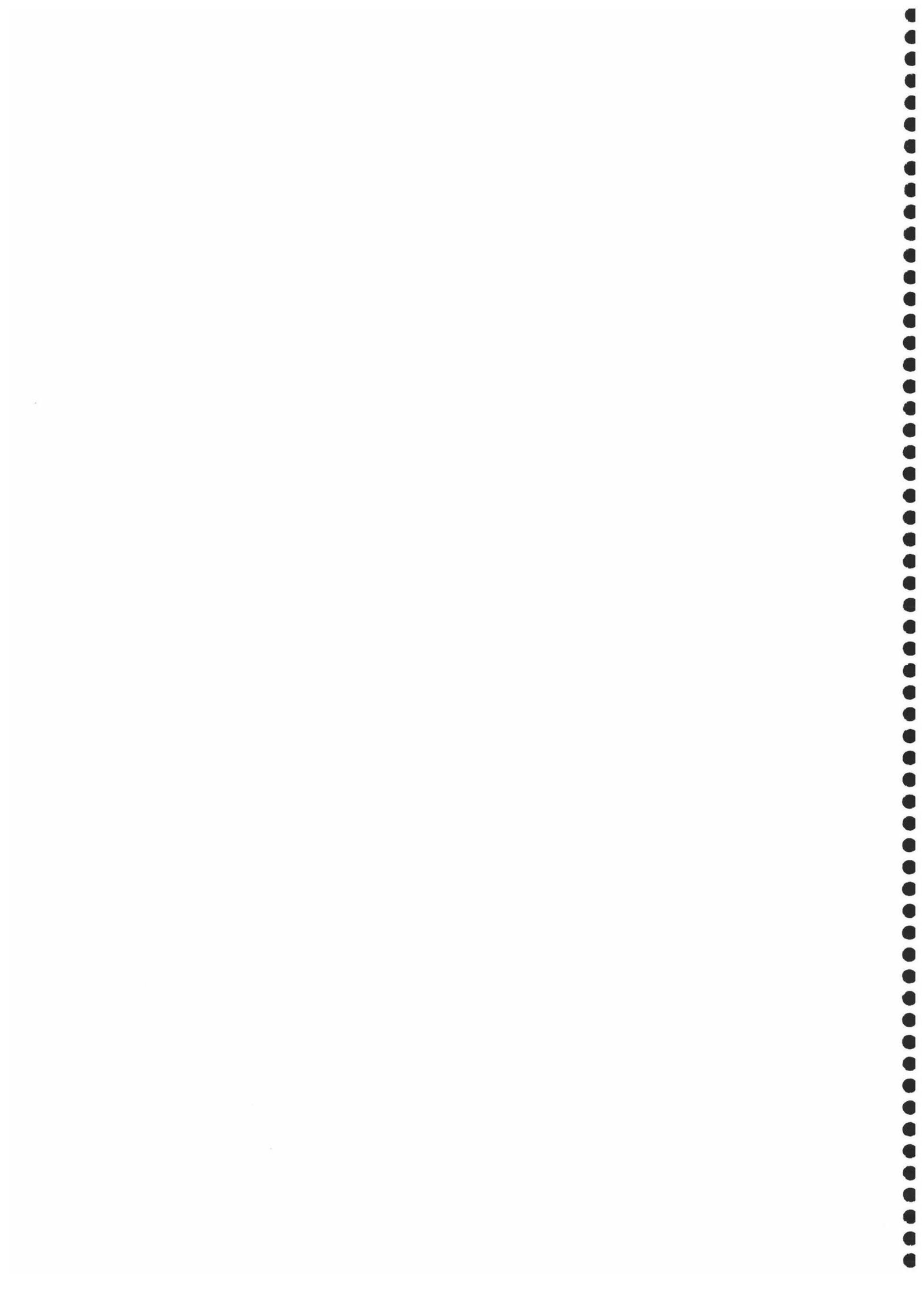
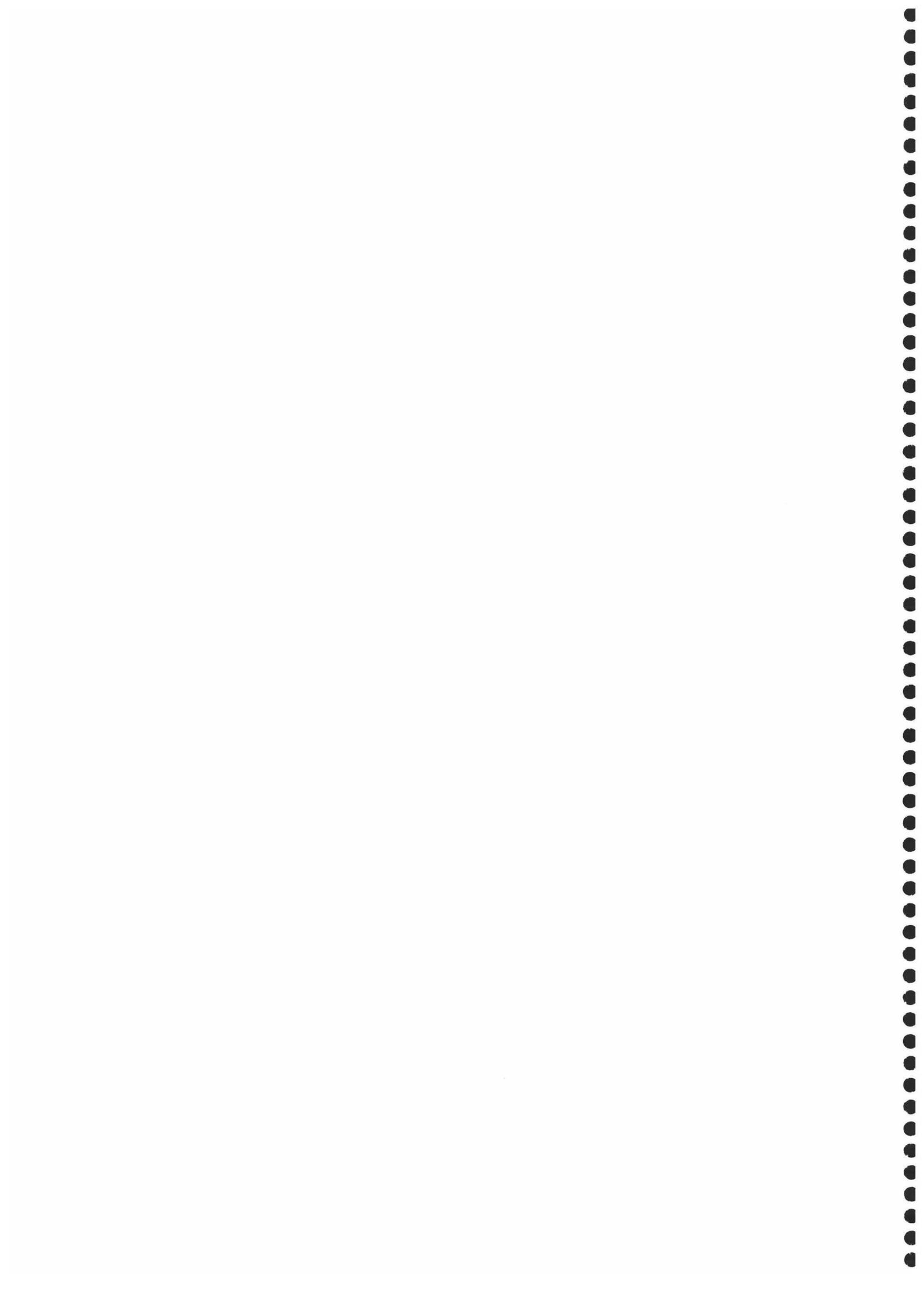


Figura 58. Expresiones basales de los promotores *putA* y *putP* en distintas cepas de *P. putida*. La figura muestra el porcentaje de actividad que mostraron los promotores  $P_{putA}$  (pMIS5) y  $P_{putP}$  (pMIS12) en las cepas KT2440 y CRR216. Los valores de actividad se expresaron mediante porcentaje asignando el valor del 100% a la expresión del promotor  $P_{putA}$  en la cepa silvestre.

Esto demuestra que la hipótesis formulada es correcta, es decir, el aumento de la cantidad de proteína PutA en la célula provoca que la expresión basal de los promotores *put* sea menor. Esto abre la posibilidad de que el/los sistemas de contención construidos anteriormente pueden ser funcionales en una cepa de *P. putida* que como el mutante CRR216 exprese de forma constitutiva la proteína PutA.



DISCUSIÓN



En las últimas décadas, las aplicaciones biotecnológicas en el campo de la agricultura, ganadería, medicina, farmacología, industria alimenticia, etc., han experimentado un desarrollo espectacular debido a que proporcionan soluciones a muchas de las necesidades de la sociedad actual. En muchas de las aplicaciones biotecnológicas es frecuente el uso de microorganismos, dada su facilidad de cultivo, su amplia capacidad de adaptación y su relativamente facilidad de manipulación genética. Aunque en algunos de estos procesos se hace uso de microorganismos de origen natural, en otros se emplean microorganismos que han sido manipulados genéticamente con el fin de mejorar las prestaciones que reportan los naturales o para conferirles nuevas capacidades.

La puesta en práctica de algunas aplicaciones biotecnológicas implica en ocasiones la liberación de organismos modificados genéticamente al medio ambiente, lo que ha generado serias preocupaciones debido a los limitados conocimientos que se poseen sobre el comportamiento de los mismos en hábitats naturales (Ramos *et al.*, 1995). Así mismo tampoco se pueden predecir los posibles efectos que dichas liberaciones podrían tener sobre las poblaciones de microorganismos indígenas. En las ocasiones en las que podría ser necesaria la liberación de un microorganismo manipulado genéticamente, el empleo de sistemas activos de contención biológica se ha propuesto como solución para el control de la supervivencia y muerte del mismo. Esta estrategia consiste en proveer a los microorganismos a liberar de un sistema genético que desencadene la muerte celular una vez terminada la función para la que han sido diseñados. Precisamente esta ha sido una de las líneas de investigación desarrollada en nuestro grupo desde hace años, la construcción de microorganismos dotados de tales sistemas de contención (Contreras *et al.*, 1991; Ronchel *et al.*, 1995; Ronchel *et al.*, 1998; Molina *et al.*, 1998).

El objetivo principal que promovió el comienzo de esta Tesis Doctoral fue la construcción de una cepa de *P. putida* dotada de un sistema de contención biológica cuya supervivencia estuviera asociada a la presencia de una señal química proveniente las raíces de plantas, de forma que el microorganismo que lo portara quedara confinado a las zonas sometidas a la acción de las raíces y que cuando la planta finalizara su ciclo

vital, la célula muriera. Como se justificó en la *Introducción* de este trabajo, la prolina pareció ser un buen candidato para ser la señal química a la que respondiera el sistema de contención, por lo que se hizo necesaria la búsqueda de elementos reguladores que respondieran a prolina. Aunque no se disponía de información sobre el sistema del catabolismo de la prolina en *P. putida* al inicio de este estudio, se había reportado que las rutas catabólicas de la prolina en muchos microorganismos como enterobacterias (Allen *et al.*, 1993, Ling *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1995), rhizobiacea (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1995; Straub *et al.*, 1996) y *Rhodobacter* (Keuntje *et al.*, 1995) eran inducibles por este compuesto. Por esto se decidió estudiar si la utilización de prolina era un proceso inducible en *P. putida*, para en el caso de serlo, adoptar los posibles promotores del operón *put* de *P. putida* para la construcción de un sistema de contención biológica.

### **1. El operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* está estructurado de forma similar al de enterobacterias.**

*P. putida* KT2440 utiliza eficientemente la prolina como única fuente de carbono, nitrógeno o carbono y nitrógeno, (**Figura 17**) aunque comparando los tiempos de generación en cada uno de los medios ensayados se puede afirmar que *P. putida* utiliza más eficientemente la prolina como fuente de nitrógeno que como fuente de carbono. El crecimiento de este microorganismo a expensas de prolina implicó la existencia de una maquinaria genética y enzimática responsable de su catabolismo, por lo que se planteó la búsqueda de los genes implicados en dicho proceso.

El hallazgo de que el cósmido pCRR831 procedente de una genoteca de *P. putida* KT2440 restauraba la capacidad de utilización de prolina a un mutante de *E. coli* con una delección en los genes *put* (Wood *et al.*, 1981) reveló la existencia en *P. putida* de genes con una función análoga a los genes *put* de *E. coli*. Casos similares de complementación se han descrito en la bibliografía entre los genes *put* de *E. coli* y *K. aerogenes* (Chen *et al.*, 1991), *E. coli* y *Bradyrhizobium japonicum* (Straub *et al.*, 1996) e incluso entre eucariotas (Kiyosue *et al.*, 1996). La subclonación de los genes *put* de *P. putida* en los plásmidos pLCR4, pLCR12 y pSLH4, la posterior secuenciación de los insertos y la comparación de las secuencias obtenidas con las existentes en las bases de datos revelaron que la estructura, disposición y tamaño de los genes que intervienen en

el catabolismo de la prolina en *P. putida* fue similar a la encontrada en enterobacterias. En estos microorganismos el gen *putA* presenta un tamaño aproximado de 4 kb y codifica una proteína que presenta las dos actividades enzimáticas necesarias para la conversión de la prolina a glutamato: la prolina deshidrogenasa y la pirrolidina-5'-carboxilato deshidrogenasa (Chen *et al.*, 1991; Graham *et al.*, 1984; Hanada *et al.*, 1985; Hahn *et al.*, 1988). El gen *putP* posee un tamaño aproximado de 1,5 kb y codifica para una proteína de membrana que transporta prolina al citoplasma.

La organización génica encontrada en *P. putida* y enterobacterias contrasta con la encontrada en *A. tumefaciens*, *B. japonicum* o *R. capsulatus* en donde contiguo al gen *putA* no se encuentra el gen *putP* sino el gen *putR* que codifica para un regulador transcripcional, perteneciente a la familia Lrp de reguladores transcripcionales (Willins *et al.*, 1991), necesario para la expresión del gen *putA*.

La comparación de la proteína PutA de *P. putida* KT2440 con otras proteínas homólogas disponibles en las bases de datos (**Figura 24**) reveló un alto grado de identidad, siendo superior al 50% (**Tabla 7**). La proteína PutA de *P. putida*, al igual que la de otros microorganismos (Ling *et al.*, 1994; Straub *et al.*, 1998), posee dos dominios bien diferenciados que corresponden a las actividades enzimáticas prolina deshidrogenasa (PDH) y pirrolina-5'-carboxilato deshidrogenasa (P5CDH). En dichos dominios se localizan las secuencias consenso definidas para la unión de los cofactores FAD (Baker *et al.*, 1992) y NAD<sup>+</sup> (Hempel *et al.*, 1993) esenciales para el funcionamiento de las actividades PDH y P5CDH respectivamente.

La composición aminoacídica de la proteína PutP de *P. putida* KT2440 presentó un carácter fuertemente apolar tal y como indicó su perfil de hidrofobicidad (**Figura 26**). Esto, unido al alto grado de homología de la proteína con transportadores de la prolina y otros transportadores dependientes de Na<sup>+</sup> y al análisis de su secuencia primaria en la que se predice una estructura secundaria con 12 dominios transmembrana, indujo a la afirmación de que la proteína PutP es la proteína responsable de la entrada de prolina en la célula, aunque no se descarta la existencia de otros transportadores secundarios como existen en enterobacterias (Ekena *et al.*, 1990; Liao *et al.*, 1997). La hipótesis de la existencia de un segundo transportador de la

prolina en *P. putida* estuvo apoyada por el comportamiento observado en el mutante CRR216. Este mutante fue incapaz de expresar el gen *putP* en presencia de prolina (**Figura 42**) debido a una delección localizada en la región promotora-reguladora (**Figura 48**). Este mutante en principio sería incapaz de transportar la prolina al citoplasma, pero en las curvas de crecimiento realizadas en medio mínimo con prolina como única fuente de carbono y de nitrógeno se observó crecimiento (**Figura 38G**), lo que induce a postular la existencia de un segundo transportador de la prolina en *P. putida*. La naturaleza de este hipotético transportador está pendiente de estudio pero podría ser del mismo tipo que los descritos en enterobacterias. En *S. typhimurium*, a parte del transportador PutP se han localizado dos transportadores más para prolina codificados por los genes *proZ* y *proY*, los cuales no son específicos para este compuesto pero que lo transportan eficientemente como para permitir el crecimiento de mutantes PutP<sup>-</sup> (Ekena *et al.*, 1990; Liao *et al.*, 1997).

## **2. Los promotores de los genes *put* se localizan en la región de ADN existente entre los genes *putA* y *putP*.**

En enterobacterias, la región de ADN comprendida entre los genes *putA* y *putP* del operón del catabolismo de la prolina alberga las regiones promotoras de ambos genes, los cuales se transcriben divergentemente (Maloy *et al.*, 1983; Hahn *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1991). Dada la homología estructural que presentó el operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* con el de enterobacterias se inició la búsqueda de los promotores en la región existente entre los genes *putA* y *putP* de *P. putida*. La técnica de extensión reversa a partir de cebador permitió determinar el origen de transcripción de los genes *put*, encontrándose en ambos casos una única señal (**Figura 31**), que indicó la existencia de un único promotor para cada gen. Estos resultados contrastaron con los descritos en enterobacterias en que el gen *putP* se expresa desde tres promotores en el caso de *S. typhimurium* (Hahn *et al.*, 1988), dos promotores en el caso de *K. aerogenes* (Chen *et al.*, 1991) y cinco promotores en el caso *E. coli* (Nakao *et al.*, 1987), al contrario de lo que ocurre con el gen *putA*, el cual posee un solo promotor.

El inicio de la transcripción para el gen *putA* correspondió a la citosina situada 36 pb corriente arriba al inicio de la traducción del gen. En el caso gen *putP* el inicio de la transcripción se localizó en una citosina situada 60 pb corriente arriba al inicio de la traducción del gen. La región promotora propuesta para el gen *putA* de *P. putida* (**Figura 32**), presentó una secuencia (CACCCG-N<sub>17</sub>-TCTTGA) que compartió cierta homología con la secuencia consenso TTG(A/C)CA-N<sub>17-18</sub>-(C/T)(G/A)TTAT propuesta por Roland y colaboradores (1992) para promotores dependientes del factor de transcripción  $\sigma^{70}$  en *P. putida*, siendo coincidentes 2 nucleótidos en la región -35 y de 3 nucleótidos en la región -10. En la región promotora propuesta para el gen *putP*, (TTGCAC-N<sub>18</sub>-TAGCAT) la coincidencia con la secuencia consenso para promotores dependientes del factor  $\sigma^{70}$  fue mayor, siendo 4 nucleótidos coincidentes de los 6 propuestos como consenso para la región -10 y otros 4 de 6 para la región -35. Estos resultados parecieron indicar que los promotores del operón *put* en *P. putida* son dependientes del factor de transcripción  $\sigma^{70}$  al igual que ocurre en enterobacterias (Chen *et al.*, 1991). Pero la demostración inequívoca de la intervención del factor  $\sigma^{70}$  en la transcripción de los genes *put* vendría dado por el análisis de los niveles del ARN mensajero de estos genes obtenidos en un mutante  $\sigma^{70}$ . Desafortunadamente el factor  $\sigma^{70}$  interviene de forma directa o indirecta en la transcripción de la mayoría de los genes bacterianos, por lo que un mutante nulo en este gen es inviable. En la bibliografía está descrita la construcción de una cepa de *E. coli* que presenta una delección interna en el gen *rpoD* de forma que el factor  $\sigma^{70}$  que codifica es inestable a 42°C, eliminándose la síntesis de los ARNm de los promotores  $\sigma^{70}$ -dependientes entre 10 y 20 minutos después del aumento de la temperatura (Harris *et al.*, 1978; Nakamura *et al.*, 1983). Desgraciadamente no existe una cepa de *P. putida* equivalente a este mutante termosensible, el cual sería necesario para la demostración inequívoca de que los genes *putA* y *putP* de *P. putida* son dependientes de  $\sigma^{70}$ .

Dado que está descrito que algunos promotores pueden transcribirse *in vivo* por los factores  $\sigma^{70}$  ó  $\sigma^{38}$  dependiendo de la fase de crecimiento (Jishage *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1993) y dado a que si se disponía de un mutante de *P. putida* en el factor de transcripción  $\sigma^{38}$  se realizó un estudio de la expresión de los genes *put* en fase estacionaria temprana (**Figura 35**) con objeto de averiguar si los promotores  $P_{putA}$  y

$P_{putP}$  eran dependientes de este factor de transcripción. El resultado de este estudio mostró que la expresión de *putA* y *putP* fue similar en el mutante RpoS y en la cepa silvestre, de lo que se dedujo que el factor  $\sigma^{38}$  no está implicado en la transcripción de los genes *put* en fase estacionaria.

### 3. Los genes del operón *put* de *P. putida* son inducibles por prolina.

El estudio de la expresión de los genes *putA* y *putP* de *P. putida* se abordó desde dos metodologías distintas. Una consistió en el estudio de la actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenida de las fusiones transcripcionales construidas entre el gen reportero '*lacZ*' y cada una de las regiones promotoras del operón *put* y la otra consistió en el análisis del nivel de ARNm correspondiente a cada uno de los genes.

El seguimiento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas de *P. putida* portadoras de las fusiones transcripcionales  $P_{putA}::lacZ$  (pMIS5) y  $P_{putP}::lacZ$  (pMIS12), mostró que la expresión de los promotores del operón del catabolismo de la prolina fue mayor en los medios donde la prolina estaba presente (**Figura 28**). Esto sugirió que los genes *putA* y *putP* de *P. putida* eran inducibles por prolina al igual que ocurre enterobacterias (Maloy *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1991) y otros microorganismos. A esta misma conclusión se llegó al observar los niveles de ARN mensajero de los genes *putA* y *putP* en medios con y sin prolina (**Figura 31**).

Usando las dos técnicas anteriormente mencionadas se pudo observar que los promotores  $P_{putA}$  y  $P_{putP}$  poseen un nivel basal de expresión independiente de la presencia del inductor. Este hecho podría responder a la necesidad fisiológica de la existencia de ciertos niveles de proteínas PutA y PutP en la célula para el correcto funcionamiento del operón del catabolismo de la prolina. La expresión basal del gen *putP* permitiría a la célula tener un nivel de transportador suficiente para introducir la prolina con objeto de desencadenar la posterior inducción del operón. Por otro lado, la expresión basal del gen *putA* permitiría la existencia de la cantidad necesaria de proteína PutA para reprimir el operón del catabolismo de la prolina en ausencia de la misma. Este mismo comportamiento está descrito en todos los operones del catabolismo de la prolina descritos hasta el momento.

Comparando los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa entre las construcciones  $P_{putA}::lacZ$  y  $P_{putP}::lacZ$  se observó que aunque los dos genes del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* fueron inducibles, el grado de expresión y de inducción que presentó cada uno fue diferente. Los resultados mostraron que el gen *putA* presentó 10 veces más expresión en presencia de prolina que en ausencia, mientras que el del gen *putP* presentó 2,6 veces más expresión. Además se observó que el promotor  $P_{putA}$  de *P. putida* es más fuerte que el promotor  $P_{putP}$  hecho que es consecuencia de que el nivel de inducción es 4 veces superior que el de  $P_{putP}$  y que su nivel de expresión basal es 2 veces inferior.

La inducción que experimentaron los promotores  $P_{putA}$  y  $P_{putP}$  fue independiente de la cantidad de prolina presente en el medio, ya que la actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenida en cultivos de *P. putida* (pMIS5) y *P. putida* (pMIS12) fue similar en el intervalo de concentraciones de prolina ensayados, que osciló entre 5 mM y 100 mM. Este resultado se confirmó con el obtenido mediante la medida del nivel de ARN mensajero en células cultivadas con concentraciones de 20 a 0,2 mM de prolina (**Figura 34**) en donde se observó que la expresión de los genes *put* fue similar independientemente de la cantidad de prolina existente en el medio y el único efecto que tuvo la cantidad de prolina adicionada al medio fue el tiempo que persistió la expresión. Estos resultados están de acuerdo con el modelo de regulación del operón *put* propuesto para enterobacterias (Ostrovsky *et al.*, 1991; Ostrovsky *et al.*, 1993) en el que la presencia de prolina produce un cambio conformacional en la proteína PutA que provoca la liberación de la región de ADN existente entre los genes *putA* y *putP*, permitiendo que ambos promotores se expresen a un nivel máximo. Cuando la prolina es consumida por la célula, la proteína PutA vuelve a sufrir un cambio conformacional de forma que aumenta su afinidad por la región de ADN a la que se une, provocando la represión del operón.

Además de observar que la expresión de los genes *put* de *P. putida* fue independiente de la cantidad de prolina existente en el medio, las medidas del nivel de ARN mensajero mostraron que la expresión de los genes *putA* y *putP* en *P. putida* no estuvo afectada por la presencia de otras fuentes de carbono y de nitrógeno adicionadas al medio de cultivo junto a la prolina (**Figura 33**) y (**Tabla 9**). Estos resultados

contrastan con los descritos en *P. aeruginosa* en los que se observa que la expresión de los genes *put* están sujetos a fenómenos de represión catabólica siempre que en el medio exista amonio (Meile *et al.*, 1982).

Si se admite que en *P. putida* la prolina se oxida hasta glutamato como ocurre en enterobacterias (Melz *et al.*, 1976) y que de aquí sigue la ruta de degradación del mismo, se planteó la duda de si el glutamato o alguno de los compuestos producto de su oxidación pudieran tener un efecto sobre la expresión del operón *put*. Para despejar esta incógnita se estudió la expresión de los promotores  $P_{putA}$  y  $P_{putP}$  en presencia y ausencia de glutamato (**Figura 30**). Los resultados mostraron que este compuesto no tiene ningún efecto sobre la expresión del operón *put*.

#### **4. La proteína PutA de *P. putida* posee un papel regulador de la expresión del operón *put*.**

Uno de los mutantes obtenidos mediante mutagénesis al azar con el minitransposón miniTn5*luxABK*m, el mutante S14D2, presentó interrumpido el gen *putA* (**Figura 43 y 44**). Una consecuencia directa de esta interrupción fue que la proteína PutA no se sintetizó correctamente, lo que incapacitó al mutante a utilizar prolina (**Figura 38B**). La actividad PDH en éste mutante fue nula (**Tabla 10**) dado que la proteína PutA no existía, observándose un restablecimiento de dicha actividad cuando a la cepa se le suministró en *trans* una copia del gen silvestre mediante la introducción del cósmido pCRR831 (**Tabla 10**). El análisis de los niveles de ARN mensajero de los genes del operón *put* en el mutante S14D2 en presencia y en ausencia de prolina (**Figura 42**) mostró que la expresión fue independiente de la existencia de prolina en el medio. Este hecho tiene fácil explicación si se admite que la proteína PutA de *P. putida*, además de poseer las dos actividades enzimáticas descritas anteriormente posee también un papel regulador, tal y como ocurre en enterobacterias (Menzel *et al.*, 1981c; Maloy *et al.*, 1983), en *R. capsulatus* (Keuntje *et al.*, 1995) y en *S. meliloti* (Soto *et al.*, 2000). La carencia de proteína PutA en el mutante S14D2 provoca que la célula sea incapaz de reprimir la expresión de los genes *put* en ausencia de prolina mediante su unión con la región de ADN existente entre los genes *putA* y *putP*.

### **5. La función enzimática y reguladora de la proteína PutA son dos funciones independientes.**

El mutante Pro-21, aislado como resistente al análogo 3,4-dehidroprolina, presentó una mutación en el gen *putA* que se tradujo en un cambio de secuencia en la proteína PutA del glutámico 896 a lisina. En este mutante, la actividad PDH fue nula (**Tabla 10**), lo que tuvo como consecuencia que fuera incapaz de crecer a expensas de prolina (**Figura 38F**). El crecimiento y la actividad que se recuperaron cuando se suministró en *trans* una copia silvestre del gen *putA* mediante la introducción del cósmido pCRR831 (**Figura 40E**). El análisis de la expresión de los genes *put* en este mutante (**Figura 42**) mostró que la mutación en la proteína PutA no afectó a la regulación del operón, ya que los niveles de expresión de los genes *put* en presencia y en ausencia de prolina fueron similares a los de la cepa silvestre. Por este motivo, se puede afirmar que la función reguladora y la función catalítica de la proteína PutA de *P. putida* son independientes la una de la otra. Esto contrasta con los resultados descritos por Muro-Pastor y colaboradores (1995) en *S. typhimurium*, en los que se demostró, mediante el aislamiento de varios mutantes superrepresores, que la actividad PDH era esencial para el mantenimiento de la función reguladora de la proteína PutA.

### **5. El factor $\sigma^{54}$ interviene de forma indirecta en la transcripción de los genes *put* mientras que el factor IHF no interviene en la represión del operón.**

Se sabe que las enterobacterias utilizan prolina como única fuente de nitrógeno y que su catabolismo depende de la activación del sistema general de regulación del nitrógeno (Magasanik *et al.*, 1978). La expresión del operón *put* de enterobacterias depende del factor  $\sigma^{54}$  aunque esta dependencia es indirecta y se establece gracias a la proteína NAC (Bender *et al.*, 1991) (**Figura 7**). Por esta razón se estudió si el operón *put* de *P. putida* dependía del factor de transcripción  $\sigma^{54}$  mediante la determinación de los niveles de ARN mensajero de los genes *put* en un mutante *rpoN* (**Figura 36**). Del estudio se concluyó que existía una dependencia clara del factor  $\sigma^{54}$  en la transcripción de los genes *putA* y *putP*, pero el análisis de las secuencias corriente arriba del inicio de transcripción de cada uno de los genes *put* no presentó similitud alguna con las secuencias consenso -12/-24 (TGGC-N8-TGC(T/A)) típicas de promotores dependientes del factor  $\sigma^{54}$  las cuales están altamente conservadas (Barrios *et al.*, 1999).

A la luz de estos resultados se plantea la hipótesis de la existencia en *P. putida* de una proteína reguladora con la misma función que la proteína NAC de la cual dependiera en última instancia la transcripción de los genes *put* de *P. putida* y que su expresión fuera dependiente del factor  $\sigma^{54}$ .

Se sabe que en enterobacterias la proteína IHF interviene en la regulación de la expresión del operón de la prolina (O'Brien *et al.*, 1992). La proteína IHF facilita la represión del operón en ausencia de prolina por medio de la formación de un dobléz en el ADN comprendido entre los genes *putA* y *putP*. Con objeto de comprobar la influencia de la proteína IHF en la expresión del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* se determinaron los niveles de ARN mensajero en un mutante de *P. putida* deficiente en la proteína IHF tanto en presencia como en ausencia de prolina (**Figura 36**). Los resultados mostraron que los niveles basales e inducidos de los genes *putA* y *putP* en un mutante IHF fueron similares a los existentes en la cepa silvestre de lo que se dedujo que la proteína IHF no interviene en la regulación de la expresión de los genes *put* de *P. putida*.

#### **6. El operón del catabolismo de la prolina podría estar integrado en un mecanismo de regulación superior.**

Los mutantes S14D11 y S16D2, obtenidos mediante inserción del minitn5*luxABK*m, presentaron un crecimiento anómalo con respecto a la cepa silvestre en el medio M8 con 20 mM de prolina. El mutante S14D11 presentó en este medio un tiempo de generación 1,4 veces superior y una fase de latencia 1,5 veces superior a las presentadas por la cepa silvestre (**Figura 38C**). En el caso del mutante S16D2, el tiempo de generación fue 2 veces superior y la fase de latencia 1,9 veces superior a los valores presentados por a cepa silvestre (**Figura 38E**). El comportamiento anómalo que presentaron estos mutantes está restringido a este medio mínimo ya que en otros medios ensayados (M9 con glucosa, M9 con succinato y M9 con glutamato) el crecimiento de estos mutantes fue similar al de la cepa silvestre (**Figura 39**). En los estudios de complementación con el cósmido pCRR831 (**Figuras 40B y D**) se observó que la introducción de este cósmido no restablecía el fenotipo de la cepa silvestre, lo que

indicaba que la mutación no se localizó ni en el operón del catabolismo de la prolina ni en las proximidades.

Los resultados de secuenciación mostraron que las secuencias flanqueantes al miniTn5 en los mutantes S14D11 y S16D2 estaban contenidas dentro del mismo fragmento de ADN cromosómico denominado por la base de datos TIGR BLAST como “contig 10801” (**apartados 3.1.2.2.3. y 3.1.2.2.4. del capítulo III**). El análisis de parte de la secuencia del contig 10801 (5 kb) mediante el programa DNA Straider, el cual identifica los posibles marcos de lectura abierta (ORF) en las 6 fases de lectura, mostró que entre el nucleótido 127 y el nucleótido 4546 del fragmento existía una ORF en la fase de lectura +1 (**Figura 59**). Al localizar el punto exacto de la inserción de los transposones dentro de la secuencia del contig 10801 se observó que las inserciones distaban 1421 pb la una de la otra. La secuencia existente entre los dos puntos de inserción de los minitransposones no presentó ninguna parada de la traducción de lo que se dedujo que los mutantes S14D11 y S16D2 presentaban interrumpida la misma proteína. El análisis de la secuencia del fragmento de 5 kb mediante el programa BLAST mostró que la secuencia comprendida entre los nucleótidos 1700 y 3000 codifica una secuencia aminiacídica homóloga a las proteínas sensoras del tipo de las histidín kinasas (**Tabla 12**), y que la secuencia comprendida entre los nucleótidos 3000 y 4550 codifica una secuencia aminoacídica homóloga a reguladores transcripcionales de la familia NtrC (**Tabla 11**) (**Figura 59**). Por el contrario, la secuencia comprendida entre los nucleótidos 1 y 1700 no codificó ninguna secuencia aminoacídica de función conocida. La homología que presentó esta hipotética proteína con las proteínas del tipo de las histidín kinasas y de los activadores transcripcionales fue elevada, tal y como se muestra en el alineamiento realizado (**Figura 60**) entre la metionina 429 de la hipotética proteína y los reguladores transcripcionales y proteínas sensoras de las **Tablas 11 y 12**.



```

NtrC : ----- : -
pilR : ----- : -
AlgB : ----- : -

          *          160          *          180          *          200          *
Pils : WAAAASALCFGALVMGSQLLDGAS-----GGLM : 152
NtrB : -----MATGTLPDAGQILNSLI-----NSIL : 21
AtoS : VMRTNTPLVYSGRQVRGDIINSMLPIERNGEILGYIWANELTEDIR-----RQAWKMDVRIIVLTLTGL : 200
CckA : GVAGSSLFAALVQARQGMAGMGLS-----AGGT : 150
CvgSY : -----IIEAVAERNVLADVNGTN-----AFIH : 101
HdyH : -----PGVLWFAVTDAGQGVIIHNSN-----PGM : 110
EspA : RFSKREVLEQREEQLRQALTAARVGIWDWNAQSGRVTWSEQVDRLLGLPVGKLSGRAMELSEVVHPADLP : 201
ORF12 : EFATQLAKPLGAKAAQKEVEQALRDLYLPFD-----ERRPYALRRLRD : 607
Nifa : ----- : -
HYDG : ----- : -
AtoC : ----- : -
NtrC : ----- : -
pilR : ----- : -
AlgB : ----- : -

          220          *          240          *          260          *          280
Pils : PPTRVLFVVLGNSLALGLIAVLSGY-----LSRQLSATGGALSAR---E---ADLQRLGRLQQ : 204
NtrB : LVDDDLAVHYANPAAQQLLAQSS-----RKLFGT-----P-----LP : 53
AtoS : LISLLLIVLFSRRLSANIDIITDGLST-LAQNIPTRLPQLPGEMGQISQS---VNNLAQALRETRTLND : 265
CckA : DYTAKVSRLAGGRLMIRLAPIVVAEP-----VVEDASPAPVAERAAP---PPSSLDAPAGASPFGA : 208
CvgSY : VVDCNFRWMAINGAALREFERLFG-----VRPQVGDN-----ML : 135
HdyH : VGKSLYSPSEMHQLNPGPQERWR-----RVDVAANGETVP-----AL : 147
EspA : RVSEVLGAALEKKTQVDVEYRIEPQGSGRWVWSCGDVLCASGAPARVTGTVMIDITARKLAEQELHRQS : 271
ORF12 : RIEANLSGLMGPSVAQDMVETFLPYKSGNENYVTEIDIHFIESRLEDYHSR---LTGLAAEILDALRRYHR : 673
Nifa : ----- : -
HYDG : ----- : -
AtoC : ----- : -
NtrC : ----- : -
pilR : ----- : -
AlgB : ----- : -

          *          300          *          320          *          340          *
Pils : QILSSMPSGLATCDAQRRTVYVNPAGCGILOVDPTQVA VEVALLPGVSVLAPR--SP-----RSEL : 265
NtrB : ELISYFS-----LN-----I LMQESLAAGQGFTDN-----EV : 81
AtoS : LIIENAADGVIAIDRQGDVTTMNPAAEVITGYQRHELQV QPYSMLFDNTQFYSPV--LDTLEHGTEHVAL : 333
CckA : ALLEGLEP-----FTSRVLETNPALTTMTG---AKA VLFGLDIDAASRAEAE--TRLNEGRAGPYEV : 266
CvgSY : DLDDDRPQ-----SKADLERRWTR-----ALA EEFAESVSFSDSNDPA--S-----HFEI : 179
HdyH : EIYRQFQP-----LFGMRG-----H MRGHGMARSANDEPA--KQTIFFIAFDASEL : 192
EspA : LIFESIYDGVVITDLGGGIIIDWNSSAERMFRQKSEAL QTLFSVLHPDEPDRLTGLVLTALDKQGRWSG : 341
ORF12 : QTLQELPMGVCSLAKDQEILMWNKAMEELTGIAAKHVV SRLVTVIDEFWRGLLQG--FIN-VPDEHLHKQ : 869
Nifa : ----- : -
HYDG : ----- : -
AtoC : ----- : -
NtrC : ----- : -
pilR : ----- : -
AlgB : ----- : -

          360          *          380          *          400          *          420
Pils : VVGKGAKRRIIGLSVTPLEGE-----PGALLMVFQDLTQLRRMEDDLKRADRLASLGA SAQL ELR : 329
NtrB : TLVIDGRSHILSETAQLRP-----EGYILLEMAPMDNQRRLSQEQLQHAQQIAARD VRGL EIK : 143
AtoS : EISFPGRDRITIELSVTTSRIHN-THGEMIGALVIFSDLTARKETQRRMAQAERLATLGE MAGV EVR : 402
CckA : RLARDP-SRIAHLYLYRAEG-----RLVAYMIDVSEQKQIELQLSQAQKMQAIGQ AGGV DFN : 326
CvgSY : RYSTLRNAQQAIGAYLFAY-----DVSERLREQERLSQAEELRQSQKMEAVGQ TGGI DFN : 240
HdyH : AATQAREWRNTLIVLSALAAVL-LAT-LLAFFWHQRYQRSHRELLDAMKRKEKLVAMGH AAGV EIR : 260
EspA : ELEFKRHGDGTTWCESVVVPLRDSEGRAIANIMVHRDTERKQLQAHLVVADRLASVGT GAGV EIN : 411
ORF12 : RLALDQPRWLNHKAIDEPL-APG-NSGLVLLVEDLTETQALEDKLVHSERIASIGR AAGV EIG : 937
Nifa : ----- : -
HYDG : ----- : -
AtoC : ----- : -
NtrC : ----- : -
pilR : ----- : -
AlgB : ----- : -

```

```

          *           440           *           460           *           480           *
Pils : PLASMRG-----SAQLLAQDARD--DVAQKLTNIMLRESDRLARLVEEFLRFA---RPPVPSLRRVP : 386
NtrB : PLGGLRG-----AAQLLSKALPD--PALMEYTKVIEQADRLRNLDVDRLLG-----PQHPPGMHVTE : 197
AtoS : PLTAIRG-----YVQILRQQTSD--PIHQEYLSVVLKEIDSINKVIQQLLEFS---RPRHSQWQQVS : 459
CckA : LLTAIQLR-----LDELLHRHPVG--DPSYEGLEIRQTGVRAADLVRKLLAFS---RKQTVQREVLD : 384
CvgSY: LLTGITGS-----LELLKTRVSOGRFNELDRIYGAQDASKRAASLTHRLLAFS---RRQTLDPKPV : 300
HdyH : PLSSIKGL-----AKYFAERTPAG--GESHELAQVMAKEADRLNRVSELELV---KPAHLTLQTVN : 318
EspA : PLAYMLVNLHLIREGLERLESQAPAAPVASLQQLVRETAEGAERIATIVRDLKVFAR--GEQETRLMPVD : 479
ORF12: PITGIACL-----AQNLEEREEDD--GEIIESSQILDQTKRVSRIVQSLMSFAHAGGSHQNSEEPVC : 998
NifA : ----- : -
HYDG : ----- : -
AtoC : ----- : -
NtrC : ----- : -
pilR : ----- : -
AlgB : ----- : -

```

```

          500           *           520           *           540           *           560
Pils : LASLVTETMDMLRVDPDLARDVREVTAPEPLPVS-VDPDQLRQVLIINLVRNGFLAAGPRG----- : 445
NtrB : SIHKVAERVVKLVSMELPDNVKLVDRDYDPSLPELPHDPDQIEQVLLNIVRNALQALGPEGGEITLRTA : 267
AtoS : LNALVEETLVLVQTAGVQARVDFISELDNELSPINADRELLKQVLLNLLINAVQAIISARG----- : 519
CckA : LGELISEFEVLLR-RLLEDVKLITDYGRDLQVRAADKQSOLETAVMNLAVNARDAVRAAKGGGVVIRTA : 453
CvgSY: VNRLVIGMEELIR-RTVGPHTVEVVTSGVLWSTFI DAPQLENALLNLCINARDAMPGRG---ITIETA : 366
HdyH : LNDIITHSLNLSVSDAQSRQREIQLRFTANETLKRIQADPDRLTQVLLNLYLNAIHAIGRQ----- : 378
EspA : VRRAVELACKMAD-NVIRHRARLVTEFEPVAPVE-ASESRLCQVFLNLLNAAQAIPEEGTPG----- : 540
ORF12: LAEVAQDAIGLLALNRRNFVQFFNLCDPDHWAE-GDPQRLAQVLIINLLSNARDA SPPGS----- : 1058
NifA : ----- : -
HYDG : ----- : -
AtoC : ----- : -
NtrC : ----- : -
pilR : ----- : -
AlgB : ----- : -

```

```

          *           580           *           600           *           620           *
Pils : -----EVKVALTRS-ENEARIRIWDSCGGSITEEMMGLHFEPFFTTTR--DGGTGLGLSTAHSIIRAHGGS : 506
NtrB : -----FQLTLHGVRV-RLAARIDVEDNGPGIPSHLQDTLFYPMVSGR--EGGTGLGLSIARSLIDQHSCK : 329
AtoS : -----KIRIQTWQYSDSQQAISIEDNCGGIDLSLQKIFDPFFTTK--ASGTGLGLALSQRINAHQGD : 581
CckA : RLTRDEAIQLGFPAADGDTAFIEVSDDGPGIPPDVMGKIFDPFFTTKPVGEGTGLGLATVYGIKQSDGW : 523
CvgSY: NRWIDERSQSRLDIPGQYLSLCSVSDTGTGMSPEVINRAFDPFPTTKPLGQGTGLGLSMVYGFVRQSGGQ : 436
HdyH : -----TISVEAKESGTRDVIITVTDGKGIAPDQLEAIFTPYFTTK--ADGTGLGLAVVQNIIEQHGA : 440
EspA : ---VEHEIRVVIRAGEKDRVVVEVRDTGMGMGQEVLGRI FDPFFTTKPVGVGTGLGLSICHGIIESMGGS : 607
ORF12: ---AVRVRSEVN-EHTVDLIVEDEGSGIPKNIMDRLEFPFFTTKDPGEGTGLGLALVYSIVEEHYQ : 1121
NifA : ----- : -
HYDG : ----- : -
AtoC : ----- : -
NtrC : ----- : -
pilR : ----- : -
AlgB : ----- : -

```

```

          640           *           660           *           680           *           700
Pils : IRVRSNRDE---GTEFVVGLEPL----- : 525
NtrB : IEFTSWPG---HTEFSVYLPK----- : 349
AtoS : IRVASLPGY---GATFTLILPINPQGNQTV----- : 608
CckA : IHVHSRPN---GAAFRIFLPVYEAPAGAVAVQVAEPAKPRARLDL SGAGRI L FVEDEDAVRSVAARL : 589
CvgSY: VRIYSEPDQ---GTNMCLYLRHYVGAPEEIEAADAAGSAP-----VQERTVMIVDDEPTIRMLVAEV : 497
HdyH : IKVKSIEGK---GAVFTIWLPIARQQD----- : 465
EspA : IQAESPEGR---GSTFRVVLCAATRELEVLPRLSATMQANVR-----ARILVVDDEPNVTLALQRS : 665
ORF12: ITIDSPADIERQGRTRIRVTLPRHVRRPLKFETVERIESMP-----HILIVEDETIIRSA LRLLER : 1184
NifA : ----- : -
HYDG : -----MIRGKIDILVDDDDVSHCTILQALLRG : 27
AtoC : -----MTAINRILIVDDEDNVRRLSTAFAL : 26
NtrC : -----MQRGIAWIVDDDDSSIRWVLERALTG : 25
pilR : -----MGSRGHILVVDDELSMREYLELLQR : 26
AlgB : -----METTSEKQGRILLVDDDESAILRTRFRYCLE : 30

```

```

          *           720           *           740           *           760           *
Pils : ----- : -
NtrB : ----- : -
AtoS : ----- : -
CckA : LRARGYEVLEAADGEEALIIAENAGTIDLLISDVIMPG-IDGPTLLKKARGYLGTAP--VMFISGYAEA : 656
CvgSY: LEDQGYIPIEAGEGASALKVLES DAR-IDLLVTDVGLPGGMNGRQLADAARIIRPDLK--VLFITGYAEN : 564
HdyH : ----- : -
EspA : LAADHEVSTANS--AQALRLVSDGGRFDLILCDVMPG-MTGMDLYHELGRCAPEQAGRMVFTGGAF : 732
ORF12: NQYQVSEAGSVQEAQERFSIATFDLIVSDLRLPGAPG----TELIKLGQGTPVLIMTSYASLRS AVDSMK : 1250
Nifa : -----PGFDLIVSDLRLPGAPG----TELIKLAEGTPVLIMTSYASLRSAVDSMK : 46
HYDG : WGYNVALAYS GHDALAQVREKVFDDLVLCDVRMAEMDGIATLKEIKALNPAIPIILIMTAFSSVETAVEALK : 97
AtoC : QGFETHCANNRGTALHLFADIHPDVVLMDIRPEMDGIKALKEMRSHETRTPVILMTAYAEVETAVEALR : 96
NtrC : AGLSCTTFESGNEVLDALTTKTPDVLLSDIRMPGMDGLALLKQIKQRHPMLPVIIMTAHSDLDAVSAVQ : 95
pilR : EGYSVTSVASVKAACDVLALDGVLDLIVSDLKLGTGSGLDVLRRAARARSASPEVVLITAYGTPAAAVEAMR : 96
AlgB : EGYSVATASSAPQAEALLQRQVFDLCLDLRLGEDNGLDVLQMRVQAPWMRVVIIVTAHSAVDTAVDAMQ : 100

```

```

          780           *           800           *           820           *           840
Pils : ----- : -
NtrB : ----- : -
AtoS : ----- : -
CckA : EFSDDLLEGETGVTFLPKPIDIKTLAERVKQQLQAA----- : 691
CvgSY: AIIINGHLDPGMWVLT KPFTMEAFASRIYEMIERED----- : 600
HdyH : ----- : -
EspA : PRTVSFLRDVFNAKIAKPLDLMQLRELVGRSAEAGR----- : 768
ORF12: MGAVDYIAKPFHDHDEMLQAVARILDRONAPAAAPPAEPRASNGKATASDKGSAATANGEIGIIGSCQPM : 1320
Nifa : MGAVDYIAKPFHDHDEMLQTVARILQDHOQS--AAALAQ--SRGNGSAPS--DAA--QGDIGIIGHCAPM : 108
HYDG : AGALDYLIKPLDFDLRQETLEKALAHRET-----GAELPSA--SAA---QFGMIGSSPAM : 148
AtoC : CGAFDYVIKPFDLDELNLIVQRALQLQSMK-----KEIRHLHQALSTSWQWGHILTNSPAM : 152
NtrC : QGAFDYLPKPFIDEAVALVDRAISHYQEQ-----QQRNAPINSPT---ADIGERPAM : 147
pilR : EGAYDYICKPFEDNEELRLLVQKALEKRTLRL-----QENSGLRARLFP--GLDGAVGQSERM : 150
AlgB : AGAVDYLVKPCSPDQLRLAAAKQLEVRQLT-----ARLEALEDEVRR--QGDGLESHSPAM : 154

```

```

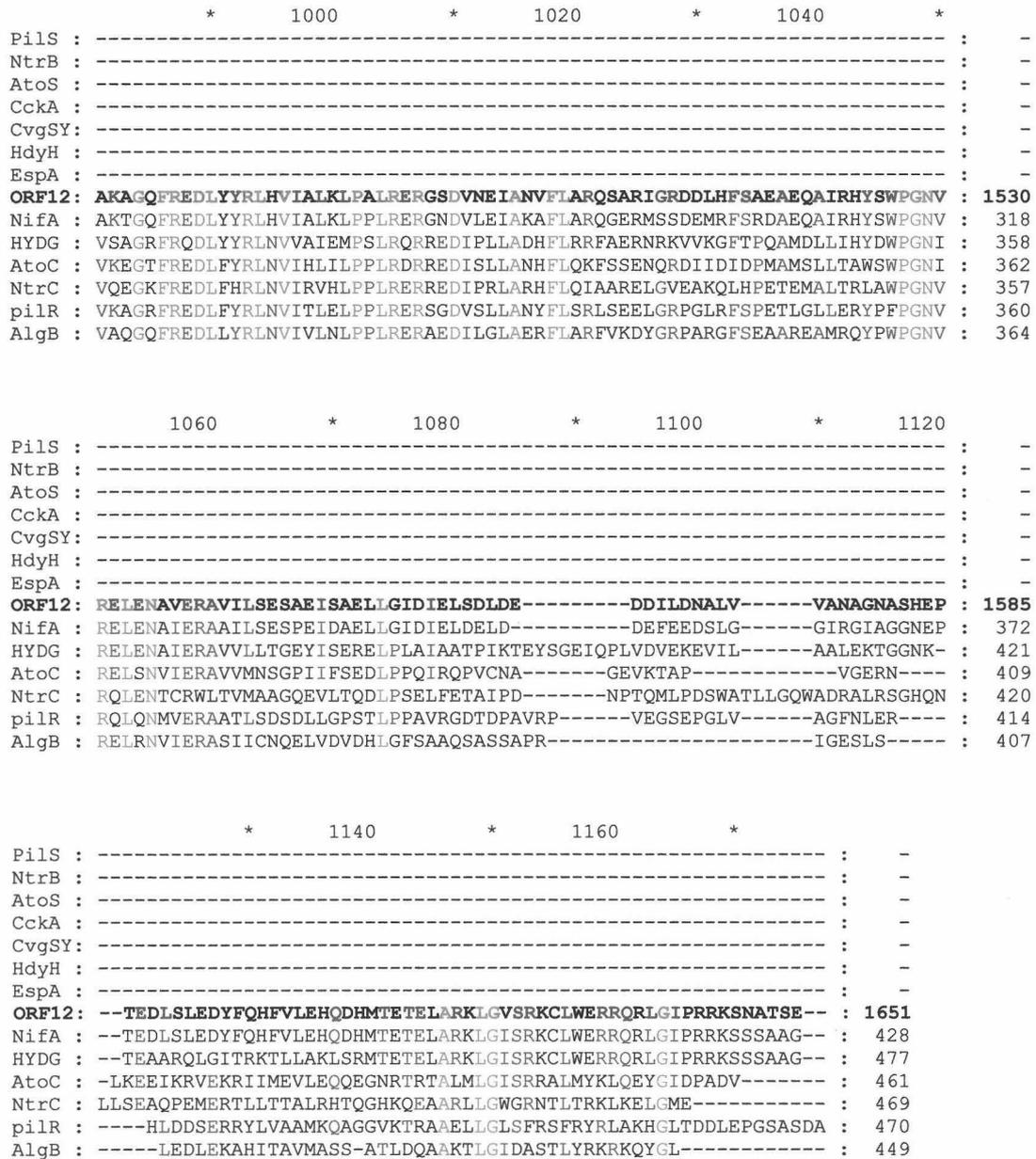
          *           860           *           880           *           900           *
Pils : ----- : -
NtrB : ----- : -
AtoS : ----- : -
CckA : ----- : -
CvgSY: ----- : -
HdyH : ----- : -
EspA : ----- : -
ORF12: QDMYSKIRKVAPTDSNV IQ E T ELV R L NLSR AKA MISV CAaipETLI EK : 1390
Nifa : QDLFSKIRKVAPTDSNV IQ E T ELV R L NLSR AKA MISV CAaipETLI EK : 178
HYDG : QHLLNETAMVAPSDATV IH D T ELV R L ACSA SDR LVTL CAALNESLL EK : 218
AtoC : MDICKDTAKIALSQASV IS E T ELI R I YNSR AKG FIKV CAALPESLL EK : 222
NtrC : QDVFRIIIGRLSRSSISV IN E T ELV H L RHSP AKA FIAL MAaipKDLI EK : 217
pilR : QAVWALVEKVASGRSTV VT E T ELV R I MRGT AAR FLPF CAALNEGTL VK : 220
AlgB : AAVLETARQVAATDANI IL E S GEL R I TWSK ARK QVTI CPSLTAELM SR : 224

```

```

          920           *           940           *           960           *           980
Pils : ----- : -
NtrB : ----- : -
AtoS : ----- : -
CckA : ----- : -
CvgSY: ----- : -
HdyH : ----- : -
EspA : ----- : -
ORF12: SAGRA LVEA DG LF I ELPLEA AR VLQEGEIRRV SVQSQKVDV LI HRD KNL : 1460
Nifa : SAGRA LVEA DG LF I ELPLEA AR VLQEGEIRRV SVQSQKVDV LI HRD KTL : 248
HYDG : DKRRE RFVE DG LF I DISPLM VR AIQEREVQRV SNOTISVDV LI HRD AEE : 288
AtoC : QTLRQ LFER NE LL I EMPLVL AK ILQEREFERI GHQTIKVDI II NRD QAM : 292
NtrC : NTVRQ RFEQ DG LF I DMPLDV TR VLADGQFYRV GYAPVKVDV II HQN ELR : 287
pilR : TTRS LLVA GD VM V EMPLAT VK VLQERKVKPV SAAEIPFQA VI NRR EAE : 290
AlgB : TESTL RVSQ DG LF I DFPLTL PK FIQDKEYERV DPVTRRADV IL NRD GAM : 294

```



**Figura 60. Alineamiento múltiple de la hipotética proteína desde la metionina 429 con proteínas sensoras y reguladores transcripcionales.** La figura muestra el resultado de la unión de los alineamientos múltiples que se realizaron con la ORF comprendida entre los nucleótidos 1286 y 4546 del fragmento de 5 kb perteneciente al contig 10801 de *P. putida* (mostrada en negrita) y las proteínas sensoras y reguladores transcripcionales recogidas en las Tablas 11 y 12. En color rojo se muestran las posiciones conservadas en el 100% de las secuencias alineadas y en color azul las conservadas en al menos en el 60% de las secuencias alineadas.

Las proteínas del tipo de las histidín kinasas y los reguladores transcripcionales mencionados anteriormente son sistemas de regulación de dos componentes que actúan conjuntos para la activación de la transcripción de numerosos genes. Este es el caso de las proteínas NtrB/NtrC, que activan la transcripción de multitud genes relacionados

con el metabolismo del nitrógeno (Magasanik *et al.*, 1982; Wedel *et al.*, 1995; He *et al.*, 1997), las proteínas PilS/PilR, que actúan sobre la transcripción de los genes de síntesis de flagelos (Wu *et al.*, 1995), las proteínas AtoS/AtoC, que activan la transcripción de los genes responsables de la degradación de ácidos grasos de cadena corta (Jenkins *et al.*, 1987), las proteínas HydH/HydG que activan la transcripción de un hidrogenasa de *E. coli* (Stoker *et al.*, 1989), etc.,. Pero hasta la fecha no se conoce ningún sistema regulador de la transcripción de este tipo que sea llevado a cabo por una única proteína como parece estar ocurriendo en el caso del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida*, lo que hace que el futuro estudio de la misma sea de un gran interés.

### **8. Construcciones preliminares en el desarrollo de un sistema activo de contención biológica dependiente de prolina.**

Estudios anteriores realizados en nuestro grupo de investigación habían mostrado que la supervivencia de cepas modificadas genéticamente derivadas de *P. putida* mt-2 en condiciones medioambientales quedaba restringida a suelos donde existía un aporte de nutrientes, como es el caso de la rizosfera (Molina *et al.*, 1998). Este comportamiento reveló la existencia de un efecto protector de la rizosfera en la supervivencia de las cepas modificadas genéticamente. Por esta razón se realizó el diseño de un sistema activo de contención biológica asociado a la raíz de plantas de maíz. Este sistema permitiría al microorganismo manipulado genéticamente sobrevivir adecuadamente y ser metabólicamente activo para la realización de la función para el cual estaba diseñado y a la vez que se aseguraría su muerte una vez terminada la vida de la planta evitando así la dispersión incontrolada del microorganismo en el medio ambiente.

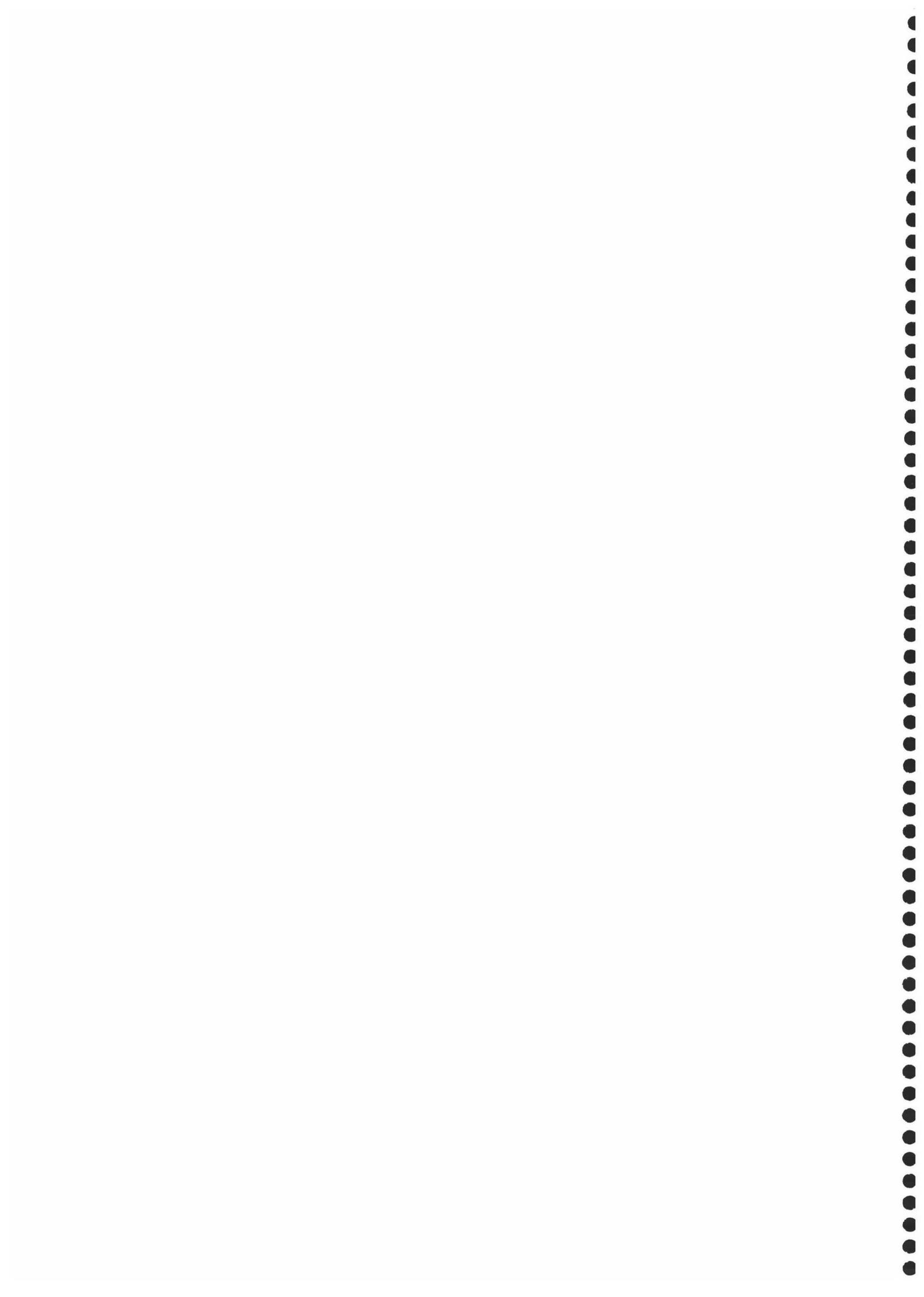
Por razones anteriormente citadas, la prolina fue elegida como señal química para la regulación de la supervivencia de la cepa contenida de forma que la presencia de este compuesto en las inmediaciones de la célula provocara la represión del elemento matador del sistema de contención. El diseño de una cepa de *P. putida* portadora de un sistema de contención biológica estuvo basado en un promotor dependiente de prolina, la función reguladora de la proteína PutA y la acción letal del producto de gen *E* del fago  $\phi$ X174.

El elemento regulador del sistema de contención diseñado consistió en la fusión del represor *lacI* a cada uno de los promotores del operón del catabolismo de la prolina, los cuales habían sido estudiados y de los que se sabía que eran inducibles por prolina. Tras la transferencia de las fusiones realizadas al cromosoma de *P. putida* KT2440 se comprobó que la expresión del gen *lacI* en las cepas portadoras del elemento regulador del sistema de contención era dependiente de la presencia de prolina en el medio (**Figura 55**). Tras la introducción del elemento matador basado en la fusión del promotor *P<sub>A1-04/03</sub>* con el gen *E* del fago  $\phi$ X174 en las cepas *P. putida* 84Y y *P. putida* 103C se estudió el comportamiento de las cepas obtenidas. Los resultados obtenidos no se ajustaron a los esperados ya que aunque se podía inducir la muerte de las cepas con IPTG, estas sobrevivían en ausencia de prolina.

Una de las razones que podían explicar que las cepas obtenidas sobrevivieran en ausencia de prolina era que la expresión basal de los promotores *put* fuera demasiado alta, de forma que la proteína LacI se sintetizara en cantidad suficiente para reprimir la muerte de la célula en ausencia de prolina. Dado que la región reguladora-promotora del operón del catabolismo de la prolina es la responsable de la expresión de los promotores del operón *put*, se decidió obtener una región reguladora-promotora que presentara una expresión basal inferior a la silvestre. Para ello se realizó una mutagénesis al azar de la región reguladora-promotora del operón *put* y un análisis de la expresión de los promotores mutantes obtenidos. La mutagénesis de la región promotora-reguladora tuvo consecuencias muy variadas en la expresión de los promotores (**Figuras 56 y 57**). Entre las regiones promotoras-reguladoras mutantes se pudo seleccionar una con una expresión basal 4 veces menor que la silvestre que no habían perdido la capacidad de inducción.

Pero la construcción de un nuevo elemento regulador basado en la región promotora-reguladora seleccionada no solucionó el problema ya que las cepas construidas seguían sobreviviendo en ausencia de prolina. Dado que estudios preliminares han mostrado que el aumento en el número de proteínas PutA produce una disminución de los niveles basales de expresión de los promotores *put* (**Figura 58**), la solución que se propone para un futuro inmediato es el aumento de la dosis génica del gen *putA* en la cepa portadora del sistema de contención.

## CONCLUSIONES



---

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten extraer las conclusiones que se exponen a continuación:

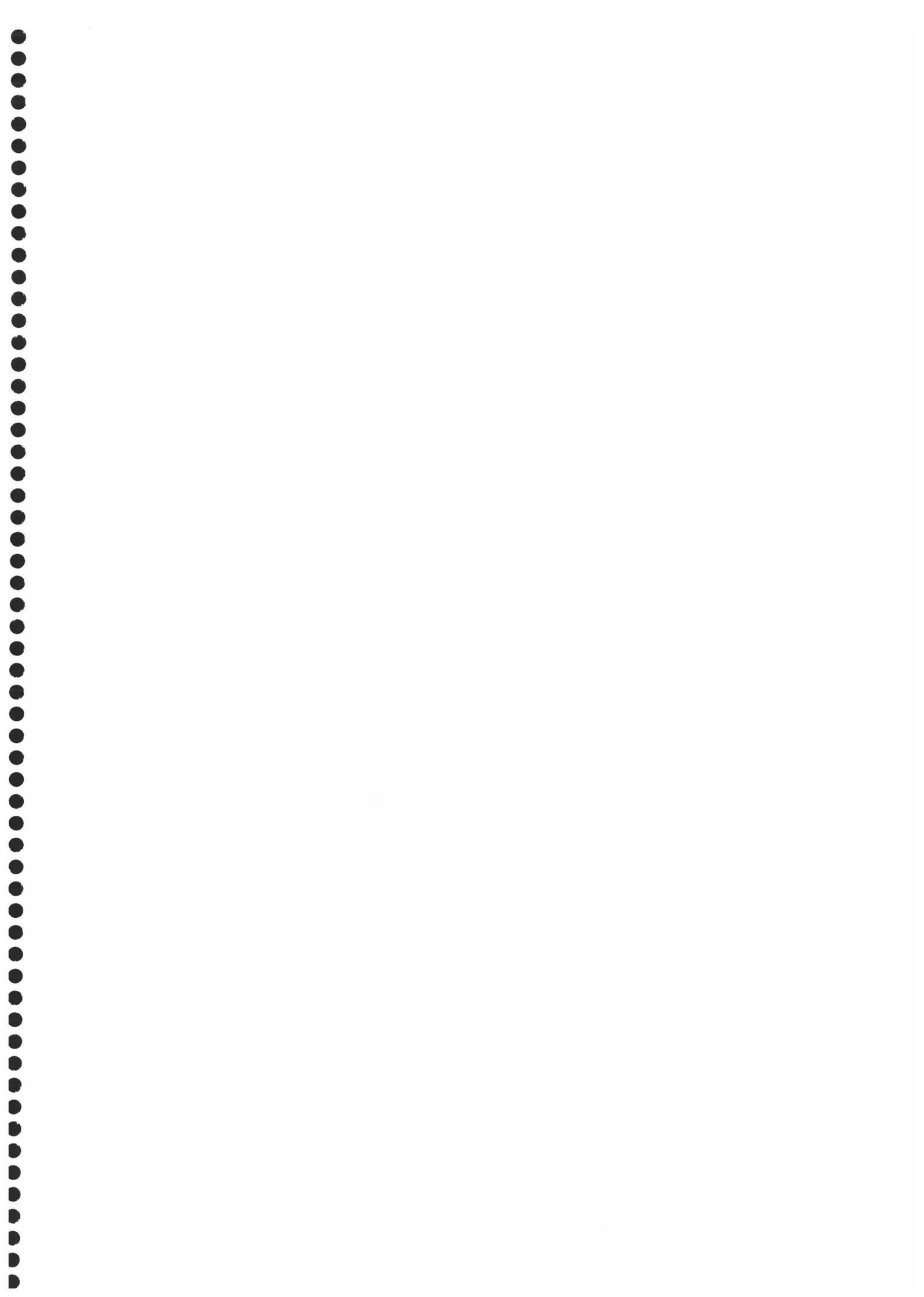
1. El operón responsable del catabolismo de la prolina en *P. putida* KT2440 es similar en estructura y función al operón presente en enterobacterias, y está formado por dos genes, el gen *putA* y el gen *putP*. El producto del gen *putA* es responsable de la conversión de prolina a glutamato mediante las actividades enzimáticas PDH y P5CDH. El producto del gen *putP* es un posible transportador de prolina.
2. La proteína PutA de *P. putida* KT2440 presenta una función enzimática y una función reguladora, siendo ambas funciones independientes la una de la otra.
3. Los genes *putA* y *putP* son inducibles por prolina de forma que se expresan a bajo nivel cuando la prolina está ausente del medio y a alto nivel cuando la prolina está presente. La proteína PutA de *P. putida* KT2440 actúa como regulador de la transcripción del operón *put*, ya que en el mutante S14D2 la expresión de este operón es independiente de la presencia de prolina.
4. Los promotores  $P_{putA}$  y  $P_{putP}$  presentan los elementos típicos reconocidos por la ARN polimerasa  $\sigma^{70}$ . El factor de transcripción  $\sigma^{38}$  no interviene en la transcripción del operón *put* de *P. putida* en fase estacionaria y el factor de integración del hospedador no participa en la represión del operón.
5. El factor  $\sigma^{54}$  interviene en la transcripción del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* KT2440 ya que no existe expresión de los genes *put* en un fondo genético  $\sigma^{54}$  pero esta

participación es indirecta, ya que los promotores  $P_{putA}$  y  $P_{putP}$  no presentan las regiones -12/-24 con las secuencias típicas de los promotores dependientes de la ARN polimerasa/ $\sigma^{54}$ .

6. La transcripción del operón *put* depende de una hipotética proteína reguladora que engloba las actividades de un sistema de regulación de dos componentes pertenecientes a la familia de reguladores NtrB/NtrC.



## BIBLIOGRAFÍA



- Abrahmson, J. L. A., L. G. Baker, J. T. Stephenson y J. M. Wood.** 1983. Proline dehydrogenase from *Escherichia coli* K12. Properties of the membrane-associated enzyme. *Eur. J. Biochem.* **134**:77-82.
- Allen, S. W., A. Senti-Willis, S. R. Maloy.** 1993. DNA sequence of the *putA* gene from *Salmonella typhimurium*: a bifunctional membrane-associated dehydrogenase that binds DNA. *Nucleic Acids Res.* **21**:1676.
- Altshul, S. F., W. Gish, W. Miller, W. Meyers, E. W. y D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Ausubel, F. M., R. E. Brent, D. D. Kingston, J. G. Moore, J. A. Seidman, A. Smith y K. Struhl** (eds). 1999. Current protocols in molecular biology. John Wiley and sons, New York.
- Bachmann, B. J., K. B. Low and A. L. Taylor.** 1976. Recalibrated linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* **40**:116-167.
- Baich, A.** 1971. The biosynthesis of proline in *Escherichia coli*: phosphate-dependent glutamate-semialdehyde dehydrogenase (NADP), the second enzyme in the pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* **244**:129-34.
- Baker, P. J., K. L. Britton, D. W. Rice, A. Rob, y T. J. Stillman.** 1992. Structural consequences of sequence patterns in the fingerprint region of the nucleotide binding fold: implications for nucleotide specificity. *J. Mol. Biol.* **228**:662-671.
- Barrios, H., B. Valderrama y E. Morett.** 1999. Compilation and analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent promoter sequences. *Nucl. Ac. Res.* **27**:4305-4313.
- Baumberg, S. y U. Klingel.** 1993. Biosynthesis of arginine, proline and related compounds. In *Bacillus subtilis* and other gram-positives bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. Pp299-306. Ed. por A.L. Sonenshein, J.A. Hock y R. Losick. Washinton, DC. American Society for Microbiology.
- Bej, A. K., M. H. Perlin y R. M. Atlas.** 1988. Model suicide vector for containment of generically engineered microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2472-2477.

**Bender R. A., P. M. Snyder, R. Bueno, M. Quinto y B. Magasanik.** 1983. Nitrogen regulation system of *Klebsiella aerogenes*: the *nac* gene. *J. Bacteriol.* **156**:444-446.

**Bender, R.A.** 1991. The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*. *Mol. Microbiol.* **5**:2575-2580.

**Bolivar, F., R. L. Rodriguez, M. C. Betlach, H. W. Boyer.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicilin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* **2**:75-93.

**Bossemeyer, D., A. Schlosser y E. P. Bakker.** 1989. Specific caesium uptake via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K uptake system. *J. Bacteriol.* **171**:2219-2221.

**Bowen, G. D. y A. D. Rovira.** 1991. The rhizosphere: the hidden half of the hidden half. En *Plant Roots: the hidden half*. Ed. Y. Waisel, A. Eshel y U. Kafkafi. Pp. 641-669. Marcel Dekker, New York.

**Bowen, G. D. y C. Theodorou.** 1979. Interaction between bacteria and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* **11**:119-126.

**Bowen, G. D. y A. D. Rovira.** 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* **66**:1-102.

**Boyer, H. W. y D. Roulland-Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472.

**Brady, R. A. y L. N. Csonka.** 1988. Transcriptional regulation of the *proC* gene of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **170**:2379-2382.

**Brandl, C. y C. M. Deber.** 1986. Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**:917-921.

**Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blocker y L. A. Marky.** 1986. Predicting DNAduplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:3746-3750.

**Brown, A. D.** 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**:803-846.

**Brown, A. D. y J. R. Simpson.** 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* **72**:589-591.

**Brown, E. D. y J. M. Wood.** 1992. Redesigned purification yields a fully functional PutA protein dimer from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**:13086-13092.

**Brown, E. D., J. M. Wood.** 1993. Conformational change and membrane association of the PutA protein are coincident with reduction of its FAD cofactor by proline. *J. Biol. Chem.* **268**:8972-9.

**Buck, M., M. T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo y J. D. Gralla.** 2000. The bacterial enhancer-dependent  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) transcription factor. *J. Bacteriol.* **182**:4129-4136.

**Cairney, J., C. F. Higgins y I. R. Booth.** 1984. Proline uptake through the mayor transport system of *Salmonella typhimurium* is coupled to sodium ions. *J. Bacteriol.* **160**:22-27.

**Cases, I., J. Pérez-Martín y V. de Lorenzo.** 1999. The IIA<sup>Ntr</sup> (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediated C-source inhibition of the  $\sigma^{54}$ -dependent Pu promoter of the TOL plasmid. *J. Biol. Chem.* **274**:15562-15568.

**Chang, C. y R. C. Stewart.** 1998. The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol.* **117**:723-31.

**Chen, L.-M. y S. Maloy.** 1991. Regulation of proline utilization in enteric bacteria: Cloning and characterization of the *Klebsiella put* control region. *J. Bacteriol.* **173**:783-790.

**Chen, L.-M., T. J. Goss, R. A. Bender, S. Swift y S. Maloy.** 1998. Genetic analysis, using P22 challenge phage, of the nitrogen activator protein DNA-binding site in the *Klebsiella aerogenes put* operon. *J. Bacteriol.* **180**:571-577.

**Christian, J. H. B.** 1955a. *Aust. J. Biol. Sci.* **8**:75-82.

**Christian, J. H. B.** 1955b. *Aust. J. Biol. Sci.* **8**:430-497.

**Cho, K. y S. C. Winans.** 1996. The *putA* gene of *Agrobacterium tumefaciens* is transcriptionally activated in response to proline by an Lrp-like protein and is not autoregulated. *Mol. Microbiol.* **22**:1025-1033.

**Chomeczynski, P. y Sacchi, N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.

**Clark, M. E.** 1968. A survey of the effect of osmotic dilution on free aminoacids of various polychaetes. *Biol Bull.* **134**:252-260.

**Condamine, H.** 1971. Sur la regulation de la production de proline chez *E. coli* K-12. *Ann. Institute Pasteur (Paris)* **129**:126-143.

**Contreras, A., S. Molin y J. L. Ramos.** 1991. Conditional-suicide containment system for bacteria which mineralize aromatics. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1504-1508.

**Csonka, L. N.** 1981. Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **182**:82-86.

**Csonka, L. N.** 1982. A third L-proline permease in *Salmonella typhimurium* which functions in media of elevated osmotic strength. *J. Bacteriol.* **151**:1433-1443.

**Csonka, L. N.** 1988. Regulation of cytoplasmic proline levels in *Salmonella typhimurium*: Effect of osmotic stress on synthesis, degradation and cellular retention of proline. *J. Bacteriol.* **170**:2374-2378.

**Csonka, L. N.** 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**:121-147.

**Csonka, L. N. y W. Epstein.** 1996. Osmoregulation. In Neidhard F.C. *et al.* (eds). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, DC, pp 1210-1223.

**Culham, D.E., B. Lasby, A. G. Marangoni, J. L. Milner, B. A. Steer, R. W. van Nues, J. M. Wood.** 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.

**Curl, E.A. y B. Truelove.** 1986. The rhizosphere. P 288. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo.

**Datta, A.R., R. Ostroff y K. MacQuillan.** 1987. Genetic and physical characterization of *proBA* genes of the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. Appl. Environm. Microbiol. **53**:2733-2738.

**de Combrugghe, B., S. Busby y H. Buc.** 1984. Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. Science. **224**:831-837.

**de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, y K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. J. Bacteriol. **172**:6568-6572.

**de Lorenzo, V., L. Eltis, B. Kessler y K. N. Timmis.** 1993. Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacI<sup>q</sup>/P<sub>trc-lac</sub>* plasmids and transposon that confer conditional phenotypes. Gene **123**:17-24.

**de Lorenzo, V. y K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5 and Tn10-derived mini-transposons. Methods Enzymol. **235**:386-405.

**Delauney, A. J. y D. P. Verma.** 1990. A soybean gene encoding delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. Mol. Gen. Genet. **221**:299-305.

**Delgado, A., M. G. Wubbolts, M. A. Abril y J. L. Ramos.** 1992. Nitroaromatics are substrates for the TOL plasmids upper-pathway enzymes. Appl. Environ. Microbiol. **58**:415-417.

**Dendinger, S. y W. J. Brill.** 1970. Regulation of proline degradation in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **103**:144-152.

- Deutch, A. H., K. E. Rushlow y C. J. Smith.** 1984. Analysis of the *Escherichia coli proBA* locus by DNA and protein sequencing. *Nucleic Acids Res.* **12**:6337-55.
- Dila, D. K. y S. R. Maloy.** 1986. Proline transport in *Salmonella typhimurium*: *putP* permease mutants with altered substrate specificity. *J. Bacteriol.* **168**:590-594.
- Ekena, K., M.-K. Liao y S. Maloy.** 1990. Activation of a new proline transport system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**:2940-2945.
- Ekena, K., y S. Maloy.** 1990. Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: How do cells avoid a futile cycle? *Mol. Gen. Genet.* **220**:492-494.
- Enderle, P. J. y M. A. Farwell.** 1998. Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques.* **25**:954-956.
- Fernandez, S., V. de Lorenzo y J. Pérez-Martín.** 1995. Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol Microbiol.* **16**:205-13.
- Foster, R. C., A. D. Rovira y T. W. Cock.** 1983. Ultrastructure of the root-soil interface. P. 156. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Fons, M., B. Cami, J. C. Patte y M. Chippaux.** 1987. Cloning in *Escherichia coli* of genes involved in the synthesis of proline and leucine in *Desulfovibrio desulfuricans* Norway. *Mol. Gen. Genet.* **206**:141-143.
- Fowden, L., S. Neale y H. Tristram.** 1963. Effect of 3,4-Dehydro-DL-proline on growth and protein synthesis. *Nature* **4888**:35-38.
- Franklin, F. C. H., M. Bagdasarian, M. M. Badgasarian y K. N. Timmis.** 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring *meta*-cleavage pathway. *Proc. Natl. Sci. USA.* **78**:7458-7462.
- Friedman, A. M., S. R. Long, S. E. Brown, W. J. Buikema y F. M. Ausubel.** 1982. Construction of a broad-host-range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene.* **18**:289-296.

- Galinski, E. A. y H. G. Trüper.** 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbial Rev.* **15**:95-108.
- Galli, E., S. Silver y B. Wiltholt.** 1992. *Pseudomonas*: Molecular biology and Biotechnology, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Graham, S. B., J. T. Stephenson y J. M. Wood.** 1984. Proline dehydrogenase from *Escherichia coli* K12. Reconstitution of a functional membrane association. *J. Biol. Chem.* **259**:2656-2661.
- Gramper, H. y V. Moses.** 1974. Enzyme organization in the proline biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **354**:75-87.
- Griffith, J. K., M. E. Baker, D. A. Rouch, M. G. P. Page, R. A. Skurray, I. T. Paulsen, K. F. Chater, S. A. Baldwin y P. J. F. Henderson.** 1992. Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**:684-695.
- Hahn, D. R. y S. R. Maloy.** 1986. Regulation of the *put* operon in *Salmonella typhimurium*: Characterization of promoter and operator mutations. *Genetics* **114**:687-703.
- Hahn, D. R., R. S. Myers, C. R. Kent y S. R. Maloy.** 1988. Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: Molecular characterization of the *put* operon, and DNA sequence of the *put* control region. *Mol. Gen. Genet.* **213**:125-133.
- Hanada, K., I. Yamato y Y. Anraku.** 1985. Identification of proline carrier in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* **191**:278-82.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Harris, D. J., J. S. Heilig, I. I. Martínez, R. Calendar y L. A. Isaksson.** 1978. Temperature-sensitive *Escherichia coli* mutant producing a temperature-sensitive  $\sigma$  subunit of DNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**:6177-6181.

- Hayward, D. C., S. J. Delaney, H. D. Campbell, A. Ghysen, S. Benzer, A. B. Kasprzak, J. N. Cotsell, I. G. Young y G. L. Gabor-Miklos.** 1993. The sluggish-A gene of *Drosophila melanogaster* is expressed in the nervous system and encodes proline oxidase, a mitochondrios enzyme involved in glutamate biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:2979-2983.
- Hayzer, D. J. y V. Moses.** 1978. The enzymes of proline biosynthesis in *Escherichia coli*. Their molecular weights and the problem of enzyme aggregation. Biochem. J. **173**:219-28.
- Hayzer, D. J. y T. Leisinger.** 1980. The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. **118**:287-293.
- He, L., E. Soupene y S. Kustu.** 1997. NtrC is required for control of *Klebsiella pneumoniae* NifL activity. J. Bacteriol. **179**:7446-7455.
- Hediger, M. A., E. Turk y S. M. Landfear.** 1989. Homology of the human intestinal Na<sup>+</sup>/glucose and *Escherichia coli* Na<sup>+</sup>/proline cotransporters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**:5748-5752.
- Henikoff, S., G. W. Haughn, J. M. Calvo y J. C. Wallace.** 1988. A large family of bacterial activator proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**:6602-6606.
- Hempel, J., H. Nicholas y R. Lindahl.** 1993. Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a share framework. Protein Sci. **2**:1890-1900.
- Herrero, M., V. de Lorenzo y K. N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **172**:6557-6567.
- Hu, C. A. A., A. J. Delauney y D. P. S. Verma.** 1992. A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**:9354-9358.

**Inoue, H., H. Nojima y H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. **96**:23-28.

**Jackowski, S., J. H. Alix.** 1990. Cloning, sequence and expression of the pantothenate permease (*panF*) gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:3842-3848.

**Jenkins, L. S. y W. D. Nunn.** 1987. Regulation of the *ato* operon by the *atoC* gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:2096-2102.

**Jiménez-Zurdo, J. I., P. van Dillewijn, M. J. Soto, M. R. de Felipe, J. Olivares y N. Toro.** 1995. Characterization of a *Rhizobium meliloti* proline dehydrogenase mutant altered in nodulation efficiency and competitiveness on alfalfa roots. *Mol. Plant-Microb. Interac.* **8**:492-498.

**Jiménez-Zurdo, J. I., F. M. García-Rodríguez y N. Toro.** 1997. The *rhizobium meliloti putA* gene: its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. *Mol. Microbiol.* **23**:85-93.

**Jishage, M., A. Iwata, S. Veda y A. Ishihama.** 1996. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunits under various growth conditions. *J. Bacteriol.* **178**:5447-5451.

**Jung, H., R. Rubenhagen, S. Tebbe, K. Leifker, N. Tholema, M. Quick y R. Schmid.** (1998) Topology of the Na<sup>+</sup>/proline transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273**:26400-26407.

**Kado, C. I. y S.-T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**:1365-1373.

**Kay, B. K., M. P. Williamson y M. Sudol.** 2000. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* **14**:231-241.

**Kellerhals, M. B., B. Kessler y B. Witholt.** 1999. Closed-loop control of bacterial high-cell-density fed-batch cultures: production of mcl-PHAs by *Pseudomonas putida* KT2442 under single-substrate and cofeeding conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **65**:306-315.

- Kempf, B. y E. Bremer.** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arc. Microbiol.* **170**:319-330.
- Kessler, B., V. de Lorenzo y K. N. Timmis.** 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of Gram-negatives eubacteria: regulation of the *P<sub>m</sub>* promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* **233**:293-301.
- Keuntje, B., B. Masepohl y W. Klipp.** 1995. Expression of the *putA* gene encoding proline dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* el independent of NtrC regulation but requiers an Lrp-Like activator protein. *J. Bacteriol.* **177**:6432-6439.
- Kiyosue T., Y. Yoshiba, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki.** 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **8**:1323-35.
- Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze y M. N. Schroth.** 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant-growth promoting rhizobacteria. *Nature* **286**:885-886.
- Köhler, T., S. Harayama, J. L. Ramos y K. N. Timmis.** 1989. Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN  $\sigma$  factor in regulation of various metabolic functions. *J. Bacteriol.* **171**:4326-4333.
- Kraak M. N., T. H. Smits, B. Kessler y B. Witholt.** 1997. Polymerase C1 levels and poly(R-3-hydroxyalkanoate) synthesis in wild-type and recombinant *Pseudomonas* strains. *J. Bacteriol.* **179**:4985-4991.
- Krishna, R. V. y T. Leisinger.** 1979a. Biosynthesis of proline in *Pseudomonas aeruginosa*: Partial purification and characterization of  $\gamma$ - glutamyl kinase. *Biochem. J.* **181**:215-222.

- Krishna, R. V., P. Beilstein y T. Leisinger.** 1979b. Biosynthesis of proline in *Pseudomonas aeruginosa*: Properties of  $\gamma$ - glutamyl fosfate reductase and 1-pyrroline-5-carboxylate reductase. *Biochem. J.* **181**:223-230.
- Krywicki, K. A. y M. C. Brandriss.** 1984. Primary structure of the nuclear *PUT2* gene involved in the mitochondrial pathway for proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **4**:2837-2842.
- Kyte, J. y R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hidrophatic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.
- Lanyi, J. K.** 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **38**:272-290.
- Lanzer, M. y H. Bujard.** 1988. Promoters largely determine the efficiency of repressor action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:8973-8977.
- Leisinger, T.** 1987. Biosynthesis of proline. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Edited by Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H.E. pp346-351. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Liao, M.-K., S. Gort y S. Maloy.** 1997. A cryptic proline permease in *Salmonella typhimurium*. *Microbiol.* **143**:2903-2911.
- Limauro, D., A. Falciatore, A. L. Basso, G. Forlani y M. de Felice.** 1996. Proline biosynthesis in *Streptococcus thermophilus*: Characterization of the *proBA* operon and its products. *Microbiology.* **142**:3275-3282.
- Ling M., S. W. Allen, J. M. Wood.** 1994. Sequence analysis identifies the proline dehydrogenase and delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase domains of the multifunctional *Escherichia coli* PutA protein. *J. Mol. Biol.* **243**:950-6.
- Lugtenberg, B. J. J., L. V. Kravchenko y M. Simons.** 1999. Tomoato seed and exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strain and role in rhizosphere colonization. **1**:439-446.

- Lynch, J. M.** 1990a. The rhizosphere. Pp. 439. Ed. Wiley, Chichester. New York.
- Lynch, J. M. y J. M. Whipps.** 1990b. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*. **129**:1-10.
- Macaluso, A., E. A. Best, R. A. Bender.** 1990. Role of the *nac* gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **172**:7249-7255.
- Magasanik, B.** 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **16**:135-168.
- Magasanik, B.** 1996. Regulation of nitrogen utilization, pp 1344-1356. *In* F.C. Neidhardt, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Mahan, M. J. y L. N. Csonka.** 1983. Genetic analysis of the *proBA* genes of *Salmonella typhimurium*: Physical and genetics analyses of the cloned *proB<sup>+</sup>A<sup>+</sup>* genes of *Escherichia coli* and of a mutant allele that confers proline overproduction and enhanced osmotolerance. *J. Bacteriol.* **156**:1249-1262.
- Maloy, S. R. y J. R. Roth.** 1983. Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: Characterization of *put::Mu d(Ap, lac)* operon fusions. *J. Bacteriol.* **154**:561-568.
- Maloy, S. R.** 1987. The proline utilization operon. *In* Neidhardt F.C., Ingraham J.L. Low K.B., Magasanik B., Schechter M., Umbarger H.E. (eds) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology*. Am. Soc. Microbiol., Washinton DC. Pp 1513-1519.
- Maloy, S., y V. Stewart.** 1993. Autogenous regulation of gene expression. *J. Bacterio.* **175**:307-316.

- 
- Manoil, C. y J. Beckwith.** 1985. *TnpA*: a transposon probe for protein export signals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**:8129-8133.
- Marqués, S., J. L. Ramos y K. N. Timmis.** 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* region. Biochem. Biophys. Acta. **1216**:227-236.
- Marqués, S., M. T. Gallegos, M. Manzanera, A. Holtel, K. N. Timmis y J. L. Ramos.** 1998. Activation and repression of transcription of the double tandem divergent promoters for the *xylR* and *sylS* genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **180**:288-2894.
- Massarelli I., G. Forlani, E. Ricca, M. de Felice.** 2000. Enhanced and feedback-resistant gamma-glutamyl kinase activity of an *Escherichia coli* transformant carrying a mutated *proB* gene of *Streptococcus thermophilus*. FEMS Microbiol. Lett. **182**:143-147.
- McArthur, M. W. y J. M. Thornton.** 1991. Influence of proline residues on protein conformation. J. Mol. Biol. **218**:397-412.
- McCue, K. F. y A. D. Hanson.** 1990. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. Plant Mol. Biol. **18**:1-11.
- Measures, J. C.** 1975. Role of aminoacids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. Nature **257**:398-400.
- Meile, L. y T. Leisinger.** 1982. Purification and properties of the bifunctional proline dehydrogenase/1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Biochem. **129**:67-75.
- Mezl, V. A. y W. E. Knox.** 1976. Properties and analysis of a stable derivate of pyrroline-5-carboxylic acid for use in metabolic studies. Anal. Biochem. **74**:430-440.
-

- Menzel, R. y J. Roth.** 1980. Identification and mapping of a second proline permease in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **141**:1064-1070.
- Menzel, R. y J. Roth.** 1981a. Purification of the *putA* gene product: a bifunctional membrane-bounded protein from *Salmonella typhimurium* responsible for the two-step oxidation of proline to glutamate. *J. Biol. Chem.* **256**:9755-9761.
- Menzel, R. y J. Roth.** 1981b. Enzymatic properties of the purified *putA* protein from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **256**:9762-9766.
- Menzel, R. y J. Roth.** 1981c. Regulation of the genes for proline utilization in *Salmonella typhimurium*: autogenous repression by the *putA* gene product. *J. Mol. Biol.* **148**:21-44.
- Miller, J.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Miller, V. L. y J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**:2575-2583.
- Miller, K. J. y J. M. Wood.** 1996. Osmoadaptación by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:101-136.
- Mogi, T., H. Yamamoto, T. Nakao, I. Yamato e Y. Anraku.** 1986. Genetic and physical characterization of *putP*, the proline carrier gene of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **202**:35-41.
- Molin, S., L. Boe, L. B. Jensen, C. S. Kristensen, M. Givskov, J. L. Ramos, A. K. Bej.** 1993. Suicidal genetic elements and their use in biological containment of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:139-166.
- Molina, L., C. Ramos, M. C. Ronchel, S. Molin, y J. L. Ramos.** 1998. Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2072-2078.

- Molina, L., C. Ramos, E. Duque, M. C. Ronchel, J. M. García, L. Wyke y J. L. Ramos.** 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.* **3**:315-321.
- Morris, H. y M. J. Schlesinger.** 1972. Effects of proline analogues on the formation of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **111**:203-210.
- Motojima, K., I. Yamato e Y. Anraku.** 1978. Proline transport carrier-defective mutants of *Escherichia coli* K12: Properties and mapping. *J. Bacteriol.* **136**:5-9.
- Muro-Pastor, A. M. y S. Maloy.** 1995. Proline dehydrogenase activity of the transcriptional repressor PutA is required for induction of the *put* operon by proline. *J. Biol. Chem.* **270**:9819-9827.
- Muse, W. B. y R. Bender.** 1998. The *nac* (nitrogen assimilation control) gene from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:1166-1173.
- Nakamura, Y., T. Osawa y T. Yura.** 1983. Intragenic localization of amber and temperatuer sensitive *rpoD* mutations affecting RNA polymerase sigma factor of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **189**:193-198.
- Nakao, T., I. Yamato e Y. Anraku.** 1987. Nucleotide sequence of *putC*, the regulatory region for the *put* regulon of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **210**:358-363.
- Nakao, T., I. Yamato e Y. Anraku.** 1988. Mapping of the multiple regulatory sites for *putP* and *putA* expression in the *putC* region of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **214**:379-388.
- Nakazawa, T. y T. Yokota.** 1973. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2:demonstration of two benzoate pathways. *J. Bacteriol.* **15**:262-267.
- Norrandner, K., T. Kempe y K. Messing.** 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**:101-106.

- O'Brien, K., G. Deno, P. Ostrovsky de Spicer, J. F. Gardner y S. R. Maloy.** 1992. Integration host factor facilitates repression of the *put* operon in *Salmonella typhimurium*. *Gene* **118**:13-19.
- Ostrovsky de Spicer, P., K. O'Brien y S. Maloy.** 1991. Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: a membrane-associated dehydrogenase binds DNA in vitro. *J. Bacteriol.* **173**:211-219.
- Ostrovsky de Spicer, P. y S. Maloy.** 1993. PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:4295-4298.
- Ow, D. W. y F. M. Ausubel.** 1983. Regulation of nitrogen metabolism genes by *nifA* product in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* **301**:307-313.
- Pearson, W. y D. Liopman.** 1988. Improved tppls for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:2244-2448.
- Phillips A. T.** 1986 *The Bacteria*, Vol. X Capítulo 12 pgs 385-437. Academic Press, Inc.
- Pratt, L. A., W. Hsing, K. E. Gibson, T. J. Silhavy.** 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**:911-917.
- Prival, M. J. y B. Magasanik.** 1971. Resistance to catabolite repression of histidase and proline oxidase during nitrogen limited growth of *Klebsiella aerogenes*. *J. Biol.Chem.* **246**:6288-6296.
- Ramachandran, G. N. y A. K. Mitra.** 1976. An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides. *J. Mol. Biol.* **107**:85-92.
- Ramos, J. L., E. Díaz, D. Dowling, V. de Lorenzo, S. Molin, F. O'Gara, C. Ramos y K. N. Timmis.** 1994. The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Bio/Technol.* **12**:1349-1356.

- Ramos, J. L., P. Andersson, L. B. Jensen, C. Ramos, M. C. Ronchel, E. Díaz, K. T. Timmis y S. Molin.** 1995. Suicide microbes on the loose. *Biotechnology* 13:35-37.
- Ramos-González, M. I.** 1993. Obtención y utilización de anticuerpos monoclonales contra *Pseudomonas putida* portadora de ADN recombinante: clonación y secuenciación de un gen que determina un antígeno de superficie. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- Ramos-Gonzalez M. I., S. Molin.** 1998. Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol.* 180:3421-31.
- Ratzkin, B., M. Grabnar y J. Roth.** 1978. Regulation of the major proline permease gene of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 133:737-743.
- Ratzkin, B. y J. Roth.** 1978. Cluster of genes controlling proline degradation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 133:744-754.
- Rawn J. D.** 1989. Proteínas fibrosas. *Bioquímica*, Pp 75, Capítulo IV. Ed. Interamericana- McGraw-Hill.
- Record, M. T. Jr., E. S. Courtenay, D. S. Cayley y H. J. Guttman.** 1998a. Responses of *Escherichia coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends. Biochem. Sci.* 23:143-148.
- Record, M. T. Jr., E. S. Courtenay, D. S. Cayley y H. J. Guttman.** 1998b. Biophysical compensation mechanisms buffering *Escherichia coli* protein nucleic acid interactions against changing environments. *Trends. Biochem. Sci.* 23:190-194.
- Reed, K. C. y D. A. Mann.** 1985. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucle. Ac. Res.* 13:7207-7221.
- Rodríguez-Herva, J. J., D. Reineró, M. A. Ramos-Díaz, L. Molina, C. Ramos y J. L. Ramos.** 1999. Cell envelope mutants of *Pseudomonas putida*: physiological characterization and survival in soil. *Environm. Microbiol.* 1:479-488.

- Ronchel, M. C.** 1997. Construcción de cepas de *Pseudomonas putida* portadoras de sistemas condicionales de contención biológica para la eliminación de contaminantes ambientales. Tesis Doctoral.
- Ronchel M. C., C. Ramos, L. B. Jensen, S. Molin y J. L. Ramos.** 1995. Construction and behavior of biologically contained bacteria for environmental applications in bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2990-2994.
- Ronchel M. C., L. Molina, A. Witte, W. Lutbiz, S. Molin, J. L. Ramos y C. Ramos.** 1998. Characterization of cell lysis in *Pseudomonas putida* induced upon expression of heterologous killing genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4901-4911.
- Rovira, A. D.** 1969. Plant root exudates. *Bot. Rev.* **35**:17-34.
- Rovira, A. D.** 1971. Plant root exudates. En *Biochemical interactions among plants*. Pp. 19-23. U.S. National Academy of Science, Washington, D.C.
- Rovira, A. D.** 1973. Zones of exudation along plant roots and spatial disturbance of microorganisms in the rhizosphere. *Pestic. Sci.* **4**:361-366.
- Rovira, A. D., R. C. Foster y J. K. Martin.** 1978. Origin, nature and nomenclature of organic materials in the rhizosphere. *En The root-soil interface*. J. Harley and R. Scott-Russell, eds. Pp 1-4. Academic Press, London.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez, J. M.** 1997. Desarrollo de herramientas moleculares para el análisis genético y la generación de nuevos fenotipos en *Pseudomonas*. Tesis Doctoral.
- Sanger, F., S. Nicklen y A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5463-7.
- Scarpulla, R. C. y R. L. Soffer.** 1978. Membrane-bound proline dehydrogenase from *Escherichia coli*. Solubilization, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* **253**:5997-6001.

- Schmidhauser, T. S., D. R. Helinsk.** 1985. Regions of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **164**:446-455.
- Schawab, S. M. J. A. Menge y R. T. Leonard.** 1983. Quantitative and qualitative effects of phosphorus on extracts and exudates of sudan grass roots in relation to vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant. Physiol.* **73**:761-765.
- Schwacha, A. y R. Bender.** 1993. The product of the *Klebsiella aerogenes nac* (Nitrogen assimilation control) gene is sufficient for activation of the *hut* operon and repression of the *gdh* operon. *J. Bacteriol.* **175**:2116-2124.
- Smith, L. T.** 1985. Characterization of a  $\gamma$ -glutamyl kinase from *Escherichia coli* that confers proline overproduction and osmotic tolerance. *J. Bacteriol.* **164**:1088-1093.
- Soto, M. J., J. I. Jiménez-Zurdo, P. van Dillewijn y N. Toro.** 2000. *Sinorhizobium meliloti putA* gene regulation: a new model within the family *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* **182**:1935-1941.
- Staskawicz, B., D. Dahlbeck, N. Keen y C. Napoli.** 1987. Molecular characterization of cloned avirulence gene from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.* **169**:5789-5794.
- Sternberg C, Eberl L, Poulsen LK, Molin S.** 1997. Detection of bioluminescence from individual bacterial cells: a comparison of two different low-light imaging systems. *J. Biolumin. Chemilumin.* **12**:7-13.
- Stewart, C. R., S. F. Bogges, D. Aspinall y L. G. Paleg.** 1977. Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant. Physiol.* **59**:930-932.
- Stoker, K., W. N. Reijnders, L. F. Oltmann, A. H. Stouthamer.** 1989. Initial cloning and sequencing of hydHG, an operon homologous to ntrBC and regulating the labile hydrogenase activity in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **171**:4448-4456.

- Straub P. F., P. H. S. Reynolds, S. Althomsons, V. Mett, Y. Zhu, G. Shearer, y D. Kohl.** 1996. Isolation, DNA sequence analysis, and mutagenesis of a proline dehydrogenase gene (*putA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:221-229.
- Streker, H. J.** 1960. The interconversion of glutamic acid and proline. *J. Biol. Chem.* **235**:2045-2050.
- Streker, H. J.** 1965. Purification and properties of rat liver ornithine  $\delta$ -transaminase. *J. Biol. Chem.* **240**:1225-1230.
- Sundin, P. A. Valeur, S. Olson y G. Odham.** 1990. Interactions between bacteria-feeding nematodes and bacteria in the rape rhizosphere: effects on root exudation and distribution of bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**:13-22.
- Surber, M. W. y S. Maloy.** 1998. The PutA protein of *Salmonella typhimurium* catalyzes the two steps of proline degradation via a leaky channel. *Archiv. Biochem. Biophys.* **354**:281-287.
- Svenningsson, H., P. Sundin y C. Liljenberg.** 1990. Lipids, carbohydrates and aminoacids exuded from the axenic roots of rape seedlings exposed to water-deficits stress. *Plant Cell Environ.* **13**:155-162.
- Takeshita, S., M. Sato, M. Toba, W. Masahashi y T. Hashimoto-Gotoh.** 1987. High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ* alpha-complementation and chloramphenicol or kanamycin-resistance selection. *Gene.* **61**:63-74.
- Tan, Y., J. Zavala Sr., M. Xu, J. Zavala Jr. y J. M. Hoffman.** 1996. Serum methionine depletion without side effects by methioninase in metastatic breast cancer patients. *Anticancer Res.* **16**:3937-3942.
- Tan, Y., J. Zavala, Q. Han, M. Xu, X. Sun, X. Tan, R. Magana, J. Geller y R. M. Hoffman.** 1997. Reconvinat methioninase infusion reduces the biochemical

endpoint of serum methionine with minimal toxicity in high-stage cancer patients. *Anticancer Res.* **17**:3857-3860.

**Tanaka, K., Y. Tanayanagi, N. Fujita, A. Ishihama y H. Takahashi.** 1993. Heterogeneity of the principal  $\sigma$  factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product,  $\sigma^{38}$ , is the second principal  $\sigma$  factor of RNA polymerase in stationary-phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3511-3515.

**Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson.** 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**:4673-4680.

**Tiedje, J. M., R. K. Colwell, Y. L. Grossmann, R. E. Hodson, R. E. Lenski, R. N. Mack y P. J. Regal.** 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* **70**:289-315.

**Tristram, H. y S. Neale.** 1968. The activity and specificity of proline permease in wild-type and analogue resistant strain of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **50**:121-137.

**Vancura, V.** 1964. Root exudates of plants. Analysis of root exudates of barley and wheat in their initial phases of growth. *Plant Soil.* **21**:231-248.

**Vancura, V.** 1988. Plant metabolites in soil, pp 498. En F. Kunc, V. Vancura (ed.), *Soil microbial associations: control of structures and functions*, Elsevier, Amsterdam/New York.

**Verbruggen, N., X-J. Hua, M. May y M. V. Montagu.** 1996. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: Evidence for a negative transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:8787-8791.

**Verslues, P. E., y R. E. Sharp.** 1999. Proline accumulation in maize (*Zea mays*) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiol.* **119**:1349-1360.

- Vieira, J. y J. Messing.** 1982. The pUC plasmids, and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**:259-268.
- Wang, S. S., y M. C. Brandriss.** 1987. Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: sequence, regulation and mitochondrial localization of the *PUT1* gene product. *Mol. Cell. Biol.* **7**:4431-4440.
- Wedel, A. y S. Kustu.** 1995. The bacterial enhancer-binding protein NTRC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. *Genes Develop.* **9**:2042-2052.
- Whatmore, A. M., J. A. Chudek, R. H. Reed.** 1990. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:2527-2535.
- Whipps, J. M.** 1990. Carbon economy. En *The rhizosphere*. Ed. J. M. Lynch. Pp 59-97. Wiley, Chichester, UK.
- Willins, D. A., C. W. Ryan, J. V. Platko y J. M. Calvo.** 1991. Characterization of Lrp, an *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J. Biol. Chem.* **266**:10768-10774.
- Witte, A., G. Wanner, U. Bläsi, G. Halmann, M. Szostak y W. Lubitz.** 1990. Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by  $\Phi$ X174 lysis protein E. *J. Bacteriol.* **172**:4109-4114.
- Wood, J. M.** 1981. Genetics of L-proline utilization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **146**:895-901.
- Wood, J.** 1987. Membrane association of proline dehydrogenase in *Escherichia coli* is redox dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:373-377.
- Wood, J. M. y D. Zadworny.** 1979. Characterization of an inducible porter required for L-proline catabolisms by *Escherichia coli*. *Can. J. Biochem.* **57**:1191-1199.

**Worsey, M. J. y P. A. Williams.** 1975. Metabolism of toluene and xilenes by *Pseudomonas putida (arvilla) mt-2*: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **124**:7-13.

**Wu, S. S. y D. Kaiser.** 1995. Genetic and functional evidence that Type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **18**:547-558.

**Xia, M., Y. Zhu, X. Cao, L. You y Z. Chen.** 1995. Cloning, sequencing and analysis of a gene encoding *Escherichia coli* proline dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**:235-42.

**Yancey, P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus y G. N. Somero.** 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* **217**:1214-1222.

**Yanisch-Perron, C., J. Vieira y J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.

**Yoshiba, Y., T. Kiyosue, T. Katagiri, H. Ueda, T. Mixoguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Wada, Y. Harada, y K. Shinozaki.** 1995. Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant. J.* **7**:751-760.

**Yoshiba, Y., T. Kiyosue, K. Nakashima, K. Yamaguchi-Shinozaki y K. Shinozaki.** 1997. Regulation levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant. Cell. Physiol.* **38**:1095-1102.



Biblioteca Universitaria de Granada



01053033

