

FACULTAD DE CIENCIAS

**MANIPULACION GENETICA DE RUTAS METABOLICAS
DE BACTERIAS DEL GENERO PSEUDOMONAS PARA LA
ELIMINACION DE COMPUESTOS ORGANICOS TOXICOS
PRESENTES EN EL MEDIO AMBIENTE**

CARMEN MARIA MICHAN DOÑA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1991



UNIVERSIDAD DE GRANADA
COMISION DE DOCTORADO

Curso de 19... 91... a 19... 92

Referencia 181.....

ACTA DE GRADO DE DOCTOR

DOCTORANDO D. CARMEN MARIA MICHAN DOÑA
LICENCIADO EN BIOLÓGICAS por la Universidad de SEVILLA
PROGRAMA DE DOCTORADO BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
DEPARTAMENTO RESPONSABLE BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
TÍTULO DE LA TESIS "MANIPULACION GENETICA DE RUTAS METABOLICAS DE BACTERIAS
DEL GEN. O. PSEUDOMONAS PARA LA ELIMINACION DE COMPUESTOS ORGANICOS TO-
XICOS PRESENTES EN EL MEDIO AMBIENTE"
DIRECTOR/ES DR. D. JUAN LUIS RAMOS MARTIN
TUTOR DRA. D^a M^a DOLORES SUAREZ ORTEGA

TRIBUNAL

PRESIDENTE DR. D. JOSE OLIVERA PASCUAL
VOCALES DR. D. JOSE CASADESUS PONSIES
DR. D. JOSE ANTONIO GIL SANCHEZ
D^{ra} D^a ANA CHUECA SANCHEZ
SECRETARIO DR. D. HILARIO RAMIREZ ESCOBAR

Reunido el día de la fecha el Tribunal nombrado para el grado de Doctor de
D. CARMEN MARIA MICHAN DOÑA éste
procede al acto de mantenimiento y defensa de la Tesis Doctoral.

Terminado dicho acto y contestadas las objeciones formuladas por el Tribunal, este
le calificó APTO CUM LAUDE POR UNANIMIDAD

Granada 2 Noviembre 1991
El Secretario del Tribunal,

EL PRESIDENTE.

[Signature]
Fdo. *[Signature]*

EL VOCAL.

[Signature]
Fdo.: ANA CHUECA

EL VOCAL.

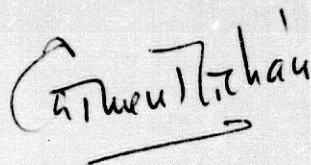
[Signature]
Fdo.: Jose A. Gil

EL VOCAL.

[Signature]
Fdo.: J. Casadesus

MANIPULACIÓN GENÉTICA DE RUTAS METABÓLICAS DE
BACTERIAS DEL GÉNERO PSEUDOMONAS PARA LA ELIMINACIÓN
DE COMPUESTOS ORGÁNICOS TÓXICOS PRESENTES EN EL MEDIO
AMBIENTE

Memoria que presenta la
licenciada en Ciencias
Biológicas Dña. Carmen María
Michán Doña, para aspirar al
grado de Doctor.



Fdo.: Carmen M^a Michán Doña

Vº Bº

El director



Fdo: Juan Luis Ramos Martín
Doctor en Ciencias Biológicas
Investigador Científico del C.S.I.C.

Esta tesis doctoral ha sido
realizada en la U. E. de
Bioquímica Vegetal de la Estación
Experimental del Zaidín (CSIC) de
Granada.

Al finalizar esta tesis doctoral, deseo expresar mi agradecimiento a aquellas personas e instituciones que han contribuido a su realización.

A la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía, que me concedió una beca predoctoral, y a la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) que me ha acogido durante estos años.

Al Dr. Juan Luis Ramos, director de esta tesis por su dedicación, y a todos mis compañeros del grupo de Biodegradación por soportar con indulgencia todos mis berrinches y mis alegrías, en especial al Dr. Andreas Holtel, Marian Abril y Maribel Ramos que me han proporcionado una ayuda impagable en todos los aspectos técnicos.

A todos mis compañeros de las Unidades de Bioquímica y Microbiología de este Centro por su apoyo, destacando el Dr. Juan Sanjuan por su colaboración y su amistad desinteresada.

A las Dras. Matilde Barón y Eduarda Molina por su apoyo personal, y a Matilde y Mari Pepa Palomero por las correcciones de estilo en la redacción de este trabajo.

A Manuel Martinez por el dibujo esmerado de las gráficas.

A todos mis compañeros del departamento de Microbiología del GBF en Braunschweig, Alemania, por su ayuda durante mi estancia en dicho centro, en especial, a la Dra. Silvia Marqués que fue la pieza fundamental de apoyo durante ese periodo.

A todos mis compañeros de la Facultad de Biología de Sevilla que me ayudaron y alentaron a tomar este camino de la investigación, particularmente a Silvia Marqués, Sebastian Chávez, Marisol Iglesias y Javier Jiménez.

A la dirección, colegas y personal del C. M. Isabel La Católica por aceptarme en su comunidad, en especial a Manolo López por su inestimable compañía.

"Malos tiempos para la lírica" (Bertold Brecht, Golpes
Bajos)

A mi familia, mis amigos y José
Luis por hacerme, aceptarme y
quererme como soy.

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| INTRODUCCIÓN | |
| <i>Pseudomonas putida</i> | 8 |
| El plásmido TOL pWW0..... | 10 |
| Regulación positiva..... | 22 |
| Objetivos de este estudio..... | 23 |
| | |
| MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 1.-Cepas bacterianas..... | 25 |
| 2.-Conservación de las cepas bacterianas..... | 25 |
| 3.-Medios de cultivo..... | 27 |
| 4.-Antibióticos..... | 29 |
| 5.-Soluciones empleadas en este trabajo..... | 29 |
| 6.-Ensayo enzimático de la actividad β -galactosidasa..... | 36 |
| 7.-Plásmidos. | |
| 7.1.-Plásmidos usados como vectores de clonación o como fuente de ADN para clonaciones posteriores..... | 37 |
| 7.2.-Plásmidos construidos en el curso de este trabajo..... | 47 |
| 8.-Preparaciones de plásmidos a pequeña escala. | |
| 8.1.-Método alcalino..... | 52 |
| 8.2.-Método de hervido..... | 53 |
| 9.-Preparaciones de plásmidos a gran escala. | |
| 9.1.-Método del cloruro de cesio..... | 54 |

| | |
|---|----|
| 9.2.-Método rápido de preparación a gran escala.. | 55 |
| 10.-Preparación de células competentes y transformación de <i>Escherichia coli</i> | 56 |
| 11.-Transferencia de ADN mediante conjugación bacteriana..... | 58 |
| 12.-Restricciones..... | 58 |
| 13.-Desfosforilación de ADN con fosfatasa alcalina..... | 59 |
| 14.-Separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa..... | 59 |
| 15.-Aislamiento de fragmentos de ADN en membranas de DEAE-celulosa a partir de geles de agarosa... | 60 |
| 16.-Ligaciones de ADN..... | 61 |
| 17.-Secuenciación de ADN. | |
| 17.1.-Secuenciación en cadena doble con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa de <i>E. coli</i> | 61 |
| 17.2.-Secuenciación de cadena sencilla con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa de <i>E. coli</i> . | |
| 17.2.1.-Preparación del fago auxiliar M13K07..... | 63 |
| 17.2.2.-Preparación de las cadenas sencillas del fragmento de ADN a secuenciar..... | 64 |
| 17.3.-Secuenciación en cadena doble con la ADN polimerasa del fago T7..... | 65 |

| | |
|---|----|
| 18.-Preparación de oligonucleótidos para la realización de mutagénesis dirigida..... | 66 |
| 19.-Mutagénesis dirigida con oligonucleótidos. | |
| 19.1.-Preparación de cadenas sencillas enriquecidas en uracilos..... | 67 |
| 19.2.-Fosforilación de los oligonucleótidos..... | 69 |
| 19.3.-Extensión de las cadenas sencillas..... | 69 |

RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 1.- <u>Caraterización de mutantes puntuales de xylS.</u> | |
| 1.1.-Secuenciación de los mutantes de xylS..... | 71 |
| 1.2.-Perfil de efectores de las proteínas mutantes de XylS..... | 78 |
| 1.3.-Actividad β -galactosidasa expresada desde Pm y mediada por XylS y los mutantes puntuales: Cinéticas de inducción..... | 83 |
| 1.4.-Afinidad aparente <i>in vivo</i> (K') de XylS y sus mutantes por benzoatos..... | 85 |
| 1.5.-Efecto del número de copias del gen xylS y sus mutantes en la expresión desde Pm..... | 91 |
| 2.- <u>Mutantes de xylS que exhiben dos mutaciones puntuales.</u> | |
| 2.1.-Construcción <i>in vitro</i> de mutantes dobles de xylS..... | 95 |
| 2.2.-Perfil de efectores de los mutantes dobles de xylS..... | 98 |

| | |
|---|-----|
| 2.3.-Afinidad aparente de los mutantes dobles de <i>xylS</i> por 3-metilbenzoato..... | 106 |
| 2.4.-Efecto multicopia en los mutantes dobles del gen <i>xylS</i> | 108 |
| 3.- <u>Análisis de mutantes de <i>XylS</i> obtenidos por mutagénesis dirigida con oligonucleótidos y por mutagénesis <i>in vitro</i> con bisulfito.</u> | |
| 3.1.-Aislamiento de los mutantes en las posiciones 41 y 45 de la proteína <i>XylS</i> | 114 |
| 3.2.-Aislamiento de los mutantes en el sitio <i>NcoI</i> del gen <i>xylS</i> | 115 |
| 3.3.-Perfil de inductores de los mutantes descritos en esta sección..... | 116 |
| 3.4.-Afinidad aparente por 3-metilbenzoato de los mutantes descritos en esta sección..... | 122 |
| 4.- <u>Análisis de la estructura de la proteína <i>XylS</i> y sus mutantes.</u> | |
| 4.1.-Composición aminoacídica..... | 125 |
| 4.2.-Flexibilidad de la proteína..... | 127 |
| 4.3.-Estructura secundaria..... | 132 |
| 4.4.-Índice de hidropatía..... | 135 |
| 4.5.-Similitud con otras proteínas..... | 137 |

DISCUSIÓN

| | |
|--|-----|
| Interacción de la proteína <i>XylS</i> con las moléculas efectoras..... | 149 |
|--|-----|

| | |
|---|---------|
| Localización de los distintos dominios funcionales en la proteína XylS..... | 153 |
| Papel de algunos residuos de la zona amino terminal en las funciones de la proteína..... | 157 |
| Interacción entre los distintos dominios del regulador XylS..... | 161 |
| Comparación con otras proteínas..... | 163 |
| CONCLUSIONES..... | 167 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 169 |

INTRODUCCIÓN

Diversos compuestos orgánicos de origen biológico o de síntesis son utilizados como fuente de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y energía por los seres vivos, siendo los microorganismos los que más activamente participan en la mineralización de estos compuestos. La revolución industrial de este siglo ha generado una gran cantidad de productos de difícil metabolización, estas sustancias recalcitrantes permanecen sobre la biosfera y constituyen una fuente importante de contaminación ambiental. La recalcitrancia de los compuestos sintéticos se debe básicamente a la presencia de estructuras químicas o de sustituyentes que no se encuentran en los productos naturales, de manera que los sitios activos de las enzimas no han tenido tiempo para evolucionar y atacar estas nuevas estructuras. En algunos casos, muchos compuestos de síntesis son mineralizados por los seres vivos, sin embargo algunos se consideran contaminantes ubicuos (Dagley, 1986), esto es debido a que su velocidad de aporte a la biosfera es mayor que su velocidad de degradación. Por estos motivos, en los últimos años se están llevando a cabo estudios sobre los

microorganismos que pueden metabolizar compuestos de síntesis, tanto desde el punto de vista bioquímico, para conocer las rutas que hacen posible estas complejas reacciones, como desde el punto de vista genético, estudiando la estructura y funcionamiento de su material genético, con objeto de acelerar en el laboratorio la evolución de rutas catabólicas que permitan eliminar eficientemente los compuestos recalcitrantes (Ramos y Timmis, 1987b).

Pseudomonas putida

La familia de las pseudomonádáceas es un grupo taxonómico muy heterogéneo que se caracteriza por ser bacterias gram negativas, de forma bacilar, con uno o varios flagelos polares, que generalmente no forman estructuras de resistencia, como por ejemplo esporas. Estos microorganismos son ubicuos y se pueden aislar de hábitats muy variados como son suelos, sedimentos de ríos y lagos, aguas dulces y saladas, alimentos, etc. Las bacterias del género *Pseudomonas* son además aerobios estrictos generalmente, aunque se han descrito anaerobios facultativos, y exhiben una amplia versatilidad fisiológica (Palleroni, 1986). Quizás la propiedad fisiológica que estos últimos años ha despertado más interés en la comunidad científica, es la enorme capacidad de las bacterias de este género para utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos como fuente de carbono; por ejemplo, es de destacar que *P. cepaciae* utiliza más de 150 compuestos distintos como fuente de este elemento de

unos 250 ensayados (Lessie y Gaffney, 1986), incluyendo hidrocarburos aromáticos y alifáticos, carbohidratos, aminas, amidas, aminoácidos, etc. Otra característica de este género es su capacidad de interactuar con otros organismos ya que aproximadamente dos tercios de las especies que lo componen tienen relaciones parásito/huésped con plantas y animales, destacando entre estas últimas la especie *P. aeruginosa* por ser un parásito oportunista del hombre en situaciones extremas como quemaduras graves o individuos con fibrosis quística (Palleroni, 1986).

El objeto concreto de nuestro estudio es la especie *Pseudomonas putida* y en concreto la cepa mt-2 portando el plásmido pWWO, una bacteria cuyo hábitat natural es el suelo y que tiene la capacidad de mineralizar hidrocarburos aromáticos como tolueno y xilenos, primero hasta benzoato y toluatos, y posteriormente hasta CO₂ y H₂O. *P. putida* posee dos rutas de mineralización de tolueno. La primera de las rutas tiene como primer enzima la tolueno dioxigenasa descrita por Gibson y Subramanian (1984) que es de codificación cromosómica. Este enzima es capaz de oxidar tolueno para producir 3-metilcatecol (Figura 1). La otra ruta tiene como primer enzima la tolueno monooxigenasa que se encuentra codificada en los plásmidos TOL. Este enzima oxida tolueno, m- y p-xileno a sus correspondientes alcoholes bencílicos (Figura 1). Posteriormente el alcohol bencílico es secuencialmente oxidado para producir catecol o los correspondientes metilcatecoles.

P. putida puede metabolizar el catecol sin sustituir, bien a través de una fisión *orto* ó intradiólica que produce el ácido *cis,cis*-mucónico, ó, a través de una fisión *meta* ó extradiólica que produce el semialdehído del ácido mucónico (Figura 1). Los metilcatecoles se metabolizan, generalmente, a través de rutas *meta*, ya que la fisión tipo *orto* suele conducir a la acumulación de metil-lactonas que no son metabolizables. El plásmido TOL arquetipo pWWO codifica una ruta para degradación de toluenos con sustituciones alquílicas vía metilcatecoles que se degradan por una ruta tipo *meta*.

El plásmido TOL pWWO

Los estudios de Worsey y Williams (1975) demostraron que la capacidad de *P. putida* mt-2 (pWWO) para degradar m- y p-xileno, y tolueno estaba codificada en el plásmido TOL pWWO. Estudios posteriores extendieron esta observación a otros plásmidos de *P. putida* como por ejemplo pKJ1, pDK1, pWW53, etc (ver Assinder y Williams, 1990, para una revisión).

pWWO es un plásmido de 117 Kb, autotransmisible que pertenece al grupo de incompatibilidad *IncP9* y cuyo número de copias es de 2 a 4 por célula (Williams y Murray, 1974; Worsey y Williams, 1975). La Figura 2 muestra la estructura del plásmido pWWO (Franklin *et al*, 1981; Lehrbach *et al*, 1983; Williams y Worsey, 1976).

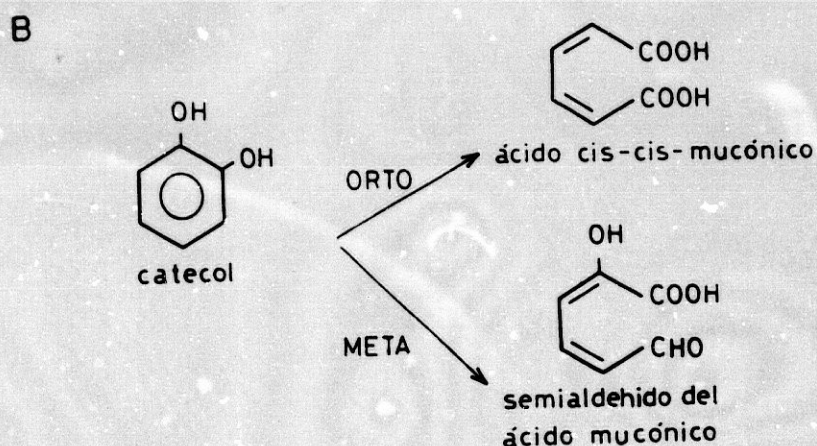
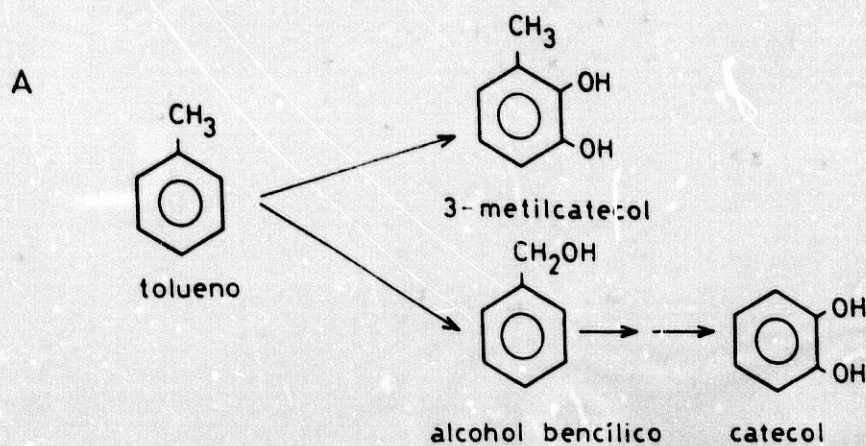


FIGURA 1. Oxidación inicial del tolueno y fisión del anillo aromático del catecol en *P. putida* pWW0. La oxidación del tolueno (A) puede estar mediada por la tolueno dioxigenasa (de codificación cromosómica) para generar 3-metilcatecol o por la tolueno monooxigenasa (de codificación plasmídica) para generar al ácido bencílico, el cual posteriormente se oxida secuencialmente hasta catecol. El anillo aromático del catecol (B) se puede romper mediante la catecol 1,2-dioxigenasa (cromosómica) para producir el ácido cis, cis-mucónico (fisión orto) o por la catecol 2,3-dioxigenasa (plasmídica) que conduce a la producción del semialdehido del ácido mucónico (fisión meta).

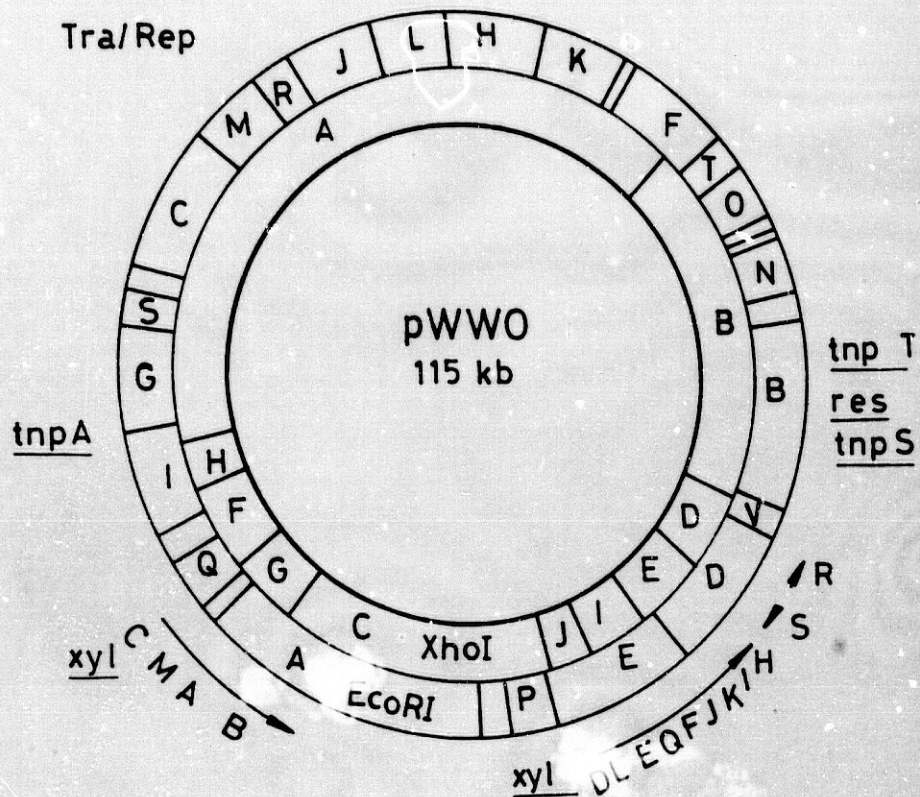


FIGURA 2. Esquema del plásmido pWWO. Se representan los fragmentos de los cortes con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* (el orden alfabético indica el tamaño de los fragmentos en sentido decreciente), la posición del operón *upper*, *xylCMA*B; la del operón *meta*, *xylDLEQFJKIH*, y la de los genes reguladores *xylS* y *xylR*. Las flechas que aparecen situadas en el exterior del plásmido indican la posición y el sentido de transcripción de estos genes. También aparecen indicadas las localizaciones de los genes de transposición y replicación presentes en este plásmido.

La información necesaria para degradar tolueno requiere 23 Kb, las cuales forman parte de un transposón de 56 Kb denominado Tn4651 que su vez está contenido dentro de otro transposón mayor de un tamaño aproximado de 70 Kb denominado Tn4653 (Tsuda *et al.*, 1989). Ambos transposones pertenecen al grupo de elementos relacionados con Tn3 y la capacidad de cada transposón para moverse depende de transposasas independientes, aunque utilizan la misma resolvasa (Burlage *et al.*, 1989; Sinclair y Holloway, 1991; Williams, 1981).

La información para la degradación de los hidrocarburos aromáticos está estructurada en dos operones denominados *upper* y *meta*, que se transcriben en el mismo sentido y que están separados por 14 Kb. Al menos dos genes reguladores, *xyIS* y *xyIR*, están implicados en la expresión de estos operones. Estos dos genes reguladores se encuentran en posición 3' respecto al operón *meta*, pero no forman parte del mismo porque el gen que está contiguo a este operón, el gen *xyIS*, se transcribe en dirección opuesta a éste (Franklin *et al.*, 1983; Inouye *et al.*, 1983). El promotor del gen *xyIR*, *Pr*, es divergente respecto al de *xyIS*, *Ps*, y estos promotores se solapan parcialmente (Assinder y Williams, 1990; Holtel *et al.*, 1990; Holtel *et al.*, 1991; Mermod, 1986a; Mermod *et al.*, 1986b; Inouye *et al.*, 1987a) (Figura 3).

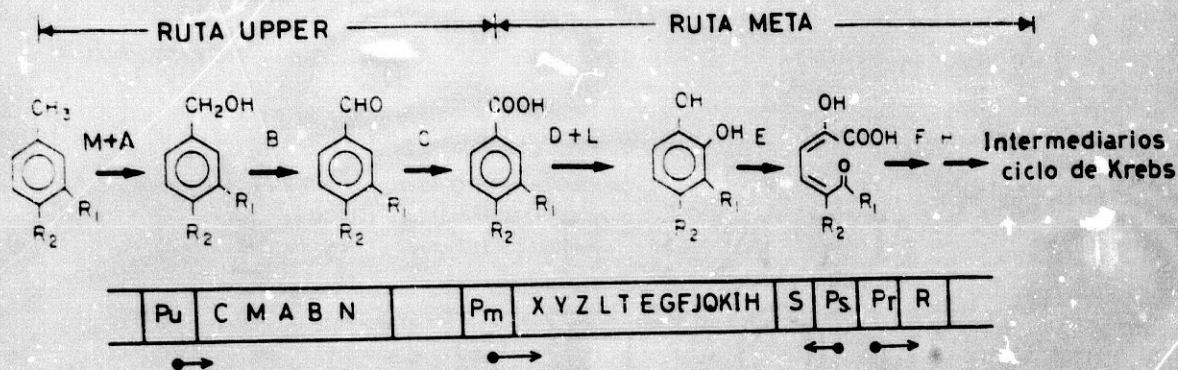


FIGURA 3. Ruta catabólica de xilenos y toluenos codificada por el plásmido TOL pWVO de la bacteria *Pseudomonas putida*. Sobre las flechas se especifican (mediante su letra correspondiente) los genes de los operones upper y meta que codifican las enzimas que actúan en cada paso.

El operón *upper* codifica las enzimas para la conversión de tolueno, m- y p-xileno, y m-etiltolueno en sus correspondientes alcoholes, aldehidos y ácidos carboxílicos (Figura 3). Este operón consta de al menos 5 genes estructurales, *xy/CMABN* (Figura 3). Los genes *xy/MA* codifican la tolueno/xileno monooxigenasa, el gen *xy/B* codifica la alcohol benzílico deshidrogenasa, el gen *xy/C*, la benzaldehido deshidrogenasa, y el gen *xy/N* codifica un polipéptido de 52 kDa de función desconocida. Inmediatamente, en 3' con respecto al promotor de la ruta existe una fase de lectura abierta cuyo producto génico no ha sido identificado aún (Harayama *et al.*, 1990).

El operón *meta* codifica las enzimas que oxidan los derivados del ácido benzoico (toluatos) hasta intermediarios del ciclo de Krebs (Figuras 3 y 4). La degradación de estos compuestos se realiza mediante la oxidación y descarboxilación del ácido benzoico para formar catecol (o metilcatecoles) como intermediarios cuyos anillos aromáticos son fisionados en posición *meta* para producir semialdehidos del ácido mucónico.

Estos semialdehidos pueden seguir dos rutas, a saber, si el catecol a metabolizar no presenta ninguna sustitución ó tiene la posición *para* sustituida con un grupo alquílico, siguen la ruta del oxalocrotonato; pero si el compuesto a degradar es el *m*-metilcatecol sigue la ruta hidrolítica.

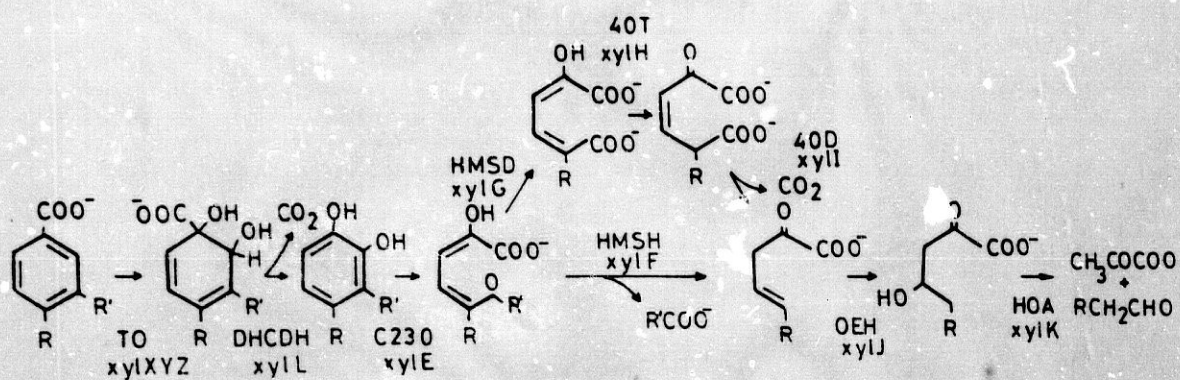


FIGURA 4. Bioquímica de la ruta catabólica meta codificada por el plásmido TOL pWWO de *P. putida*. Bajo las flechas se especifican las enzimas con sus iniciales: TO, toluato 1,2-dioxigenasa; DHCDH, 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadieno-1-carboxilato deshidrogenasa; C230, catecol 2,3-dioxigenasa; 40T, 4-oxalocrotonato tautomerasa; 40D, 4-oxalocrotonato descarboxilasa; HMSH, 2-hidroxi-3,5-ciclohexadieno-1-carboxilato deshidrogenasa; HMSD, 2-hidroxi-3,5-ciclohexadieno-1-carboxilato deshidrogenasa; OEH, 2-oxopent-4-enolato hidratasa; y, HOA, 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa.

Ambas rutas convergen en el 2-oxo-pent-4-enolato que finalmente produce intermediarios anfibólicos que conducen al ciclo de Krebs (Figura 4). Los genes identificados como pertenecientes a este operón son *xy/XYZLTEGFJQKIH* que codifican las enzimas toluato 1,2-dioxigenasa (*xy/XYZ*, estos tres genes constituyen el locus génico denominado *xy/D*, cada gen codifica una subunidad distinta del enzima), 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadieno-1-carboxilato deshidrogenasa (*xy/L*), catecol 2,3-dioxigenasa (*xy/E*), 2-hidroxi-3-oxo-2,3-dihidroxi-4-oxopent-4-enolato deshidrogenasa (*xy/G*), 2-hidroxi-3-oxo-2,3-dihidroxi-4-oxopent-4-enolato hidrolasa (*xy/F*), 2-oxopent-4-enolato hidratasa (*xy/J*), 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa (*xy/K*), 4-oxalocrotonato descarboxilasa (*xy/I*) y 4-oxalocrotonato tautomerasa (*xy/H*). Las funciones de la proteínas codificadas por los genes *xy/T* y *xy/Q* no se conocen aún (Harayama *et al.*, 1984, 1989 y 1990).

El tamaño de las proteínas reguladoras, XylS y XylR es de 36,5 y 68 kDa, respectivamente. Este tamaño se ha estimado utilizando mini- y maxicélulas (Inouye *et al.*, 1986; Mermod *et al.*, 1987; Spooner *et al.*, 1986).

Los primeros trabajos genéticos para averiguar la regulación de estos operones se realizaron mediante el aislamiento de un conjunto de mutantes usando el transposón Tn5. El estudio de estos mutantes permitió determinar las bases de la regulación de esta ruta. Se observó que la deshidrogenasa del alcohol benzílico, enzima de la ruta *upper*, no se inducía en presencia de tolueno o xilenos en mutantes

de *xyIR* pero sí en mutantes de *xyIS*; mientras que con la enzima catecol 2,3 dioxigenasa, codificada en el operón *meta*, ocurría lo contrario, su actividad se inducía si se añadían benzoatos en el medio de cultivo en mutantes de *xyIR* pero no en mutantes de *xyIS*. Además, en mutantes de *xyIS* se observó que los enzimas de la ruta *meta* no se inducían con hidrocarburos, sugiriendo un papel concertado de los reguladores XylR y XylS en la inducción de la ruta con estos compuestos (Franklin *et al.*, 1981; Franklin *et al.*, 1983; Inouye *et al.*, 1983). Recientemente se ha puesto de manifiesto que el factor sigma NtrA (también denominada RpoN y factor σ^{54} , ver Kustu *et al.*, 1989, para una revisión) se requiere para la expresión del operon *upper* y del gen *xyIS* (Inouye *et al.*, 1987a; Köhler *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1987a). En contraste, la expresión desde el promotor de la ruta *meta* es independiente de NtrA (Köhler *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1987a). Asimismo, recientemente se ha observado la participación de una proteína accesoria denominada IHF (Factor de Integración del Huésped) en la expresión del operón *upper* (Abril *et al.*, 1991; Inouye *et al.*, 1990; de Lorenzo *et al.*, 1991).

Se ha elaborado un modelo de regulación para estos operones teniendo en cuenta todos los datos procedentes de estudios realizados sobre la expresión de estos genes, tanto en la bacteria *Pseudomonas putida* usando el sistema sivestre y midiendo enzimas de las rutas degradativas, por ejemplo la alcohol benzílico deshidrogenasa y la catecol 2,3 dioxigenasa, como en *E. coli* ó *P.*

putida, utilizando fusiones de los promotores a genes cuyos productos génicos tienen actividades enzimáticas fácilmente medibles, por ejemplo la β -galactosidasa codificada por el gen *lacZ* (Abril *et al.*, 1989; Inouye *et al.*, 1986; Ramos *et al.*, 1986 y 1987a). El modelo propuesto se representa en la Figura 5 y se resume a continuación:

Tanto el gen *xyIS* como el gen *xyIR* son capaces de activar los operones aunque estén situados en posición *trans*. La regulación mediada por sus correspondientes proteínas se realiza a nivel transcripcional.

La proteína XylR estimula la transcripción desde Pu, el promotor de la ruta *upper*, en presencia del factor sigma NtrA y de una amplia gama de efectores de dicho regulador (Ramos *et al.*, 1987a).

El regulador XylS estimula la transcripción desde Pm, el promotor de la ruta *meta*. Cuando las células se cultivan en benzoatos, la concentración del regulador en la célula es baja, y parece requerir la activación de la proteína, mediada por el efector, en el proceso (Franklin *et al.*, 1981; Inouye *et al.*, 1983; Ramos *et al.*, 1986).

En células cultivadas en hidrocarburos, la expresión del operón *meta* es independiente de benzoato. En estas circunstancias, XylR activado por sus efectores actúa sobre Ps, el promotor del gen *xyIS*, provocando un aumento de la transcripción de este gen y, probablemente, la hiperproducción de la proteína XylS (Inouye *et al.*, 1987a; Ramos *et al.*, 1987a).

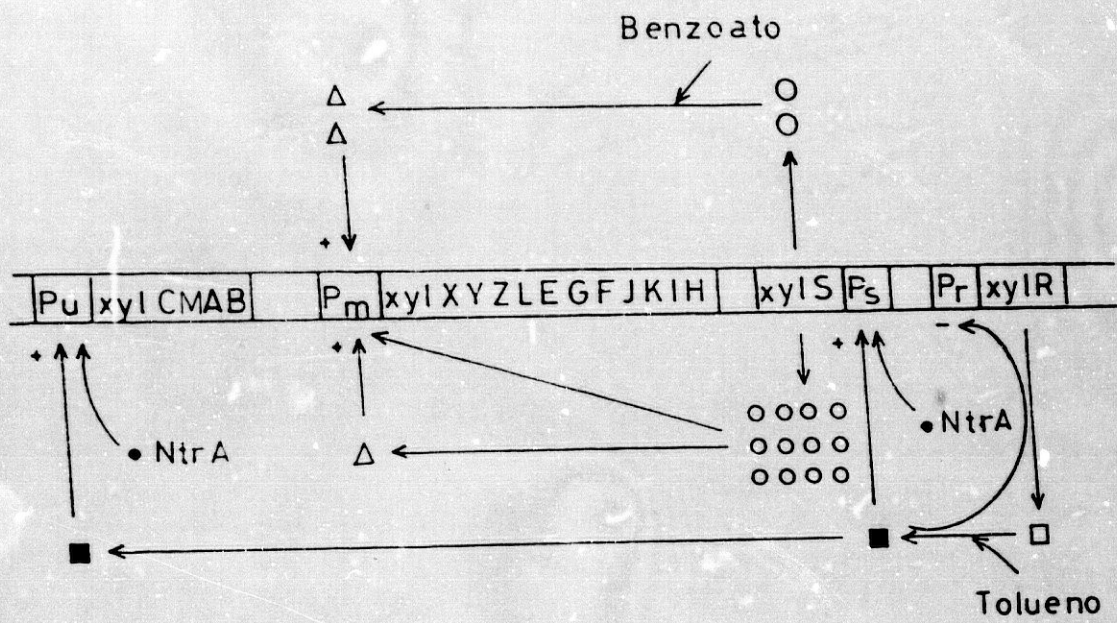


FIGURA 5. Modelo de regulación génica propuesto para la ruta de degradación de xilenos y tolueno codificada por el plásmido TOL pWW0 de *P. putida*.

Para explicar la transcripción de la ruta *meta* en ausencia de benzoatos se asume la existencia de dos formas de la proteína XylS que estarían en equilibrio, una activa y otra inactiva. El desplazamiento del equilibrio hacia la forma activa estaría mediado por los derivados del ácido benzoico (Ramos *et al.*, 1986). En ausencia de efectores, aunque se mantendría el equilibrio, al hiperproducirse XylS, se aumentaría la concentración total de este regulador en la célula, y, por tanto, la concentración subtotal de la forma activa lo que provocaría este efecto inductor sobre Pm (Inouye *et al.*, 1987a; Ramos *et al.*, 1987).

Para completar el esquema se ha observado una regulación interna de la ruta al actuar la proteína XylR como represor de su propia síntesis al unirse a Pr, el promotor del gen *xylR* (Abril, *et al.*, 1989; Inouye *et al.*, 1987a).

Los promotores de estas rutas, Pu, Pm, Ps y Pr, se han caracterizado con cierto detalle y todos ellos presentan zonas de homología con otros promotores de *Pseudomonas*. Pu y Ps exhiben tres regiones de homología, dos de las cuales son similares a las de los promotores regulados por NtrA. De hecho, estas dos regiones de homología se localizan una en posición -12/-24 con respecto al punto principal de iniciación de la transcripción, que corresponde al sitio de unión de la proteína NtrA (Beynon *et al.*, 1983; Dixon, 1986; Sasse-Dwight y Gralla, 1988), y otra en la región de -50/-70 que es homóloga al sitio de unión del factor IHF cuya función es doblar la

zona de ADN a la que se une y así aproximar secuencias nucleotídicas lejanas (Abril *et al.*, 1991; Holtel *et al.*, 1990; de Lorenzo *et al.*, 1991). Finalmente Pu y Ps presentan homología en la región de -100/-200 donde se localizan al menos dos sitios de unión para XylR y que actúan de igual modo que los "enhancers" de eucariotas (Abril *et al.*, 1991; Gralla, 1991; Holtel *et al.*, 1990 y 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991).

Regulación positiva

Aunque el primer modelo de control génico que se propuso implicaba solo un mecanismo de represión sobre los promotores celulares (Jacob y Monod, 1961), los estudios de Englesberg sobre los genes del metabolismo de la L-arabinosa le hicieron proponer un modelo de regulación positiva sobre el promotor P_{ara} , a partir del cual se transcriben los genes que codifican las enzimas de degradación de este glúcido (Englesberg *et al.*, 1965, Scheif, 1989). Actualmente se conocen muchos sistemas genéticos que utilizan activadores para controlar su expresión y el estudio de estas proteínas reguladoras ha conducido a postular su agrupación en al menos tres familias (Englesberg y Wilcox, 1974, Raibaud y Schwartz, 1984, Adhya y Garges, 1990). Hay una familia en la que las funciones de detector de la señal externa de control y de activador del promotor regulado, las realizan dos proteínas distintas, los casos más estudiados son los pares NtrB/NtrC y EnzV/OmpR (David *et al.*, 1988). En las otras dos

familias hay una sola proteína que actúa tanto como sensor como activador, son los grupos que presentan homología con las proteínas LysR y AraC/XylS (Henikoff *et al.*, 1988, Henikoff *et al.*, 1990, Ramos *et al.*, 1990a, y Ramos *et al.*, 1990b). Es de destacar que, en los reguladores del grupo de LysR el sitio de reconocimiento y unión al ADN se localiza en la región amino terminal, mientras que en la familia de XylS/AraC el sitio de unión al ADN parece localizarse en la zona carboxilo terminal (Brunelle y Schleif, 1989; Ramos *et al.*, 1990b).

Objetivos de este estudio

El objetivo de este estudio es profundizar en el conocimiento del regulador positivo XylS. Para ello se ha utilizado un acercamiento desde el punto de vista genético a las funciones de este regulador y a su mecanismo de acción. Se han examinado:

- 1.-La interacción de los efectores con el regulador.
- 2.-Los dominios funcionales del regulador y las interacciones entre ellos.
- 3.-La estructura de la proteína utilizando algoritmos diseñados por diversos investigadores y su comparación con otros reguladores.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.-CEPAS BACTERIANAS.

En esta sección se describen las cepas bacterianas usadas en este trabajo, mostrándose en la Tabla 1 la relación de estirpes de *Escherichia coli*. La única cepa de *Pseudomonas putida* que se empleó fue la estirpe 2440, cuyo genotipo es *hsdM⁺, hsdR* (Franklin *et al.*, 1981).

2.-CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS.

La conservación a corto plazo (un mes) se realizó en estrías en LB sólido que se mantenían a 4°C, a medio plazo (seis meses), en picaduras en LB sólido, manteniéndose éstas a temperatura ambiente y, a largo plazo, en 40 % de glicerol congeladas a -20° y -70°C.

TABLA 1. Cepas bacterianas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo.

| Estirpe | Genotipo | Fuente o referencia |
|---------|---|--|
| 5K | <i>res, thr, thi, tonA, supE.</i> | R. L. Robson, Lab de Fijación de Nitrógeno, Universidad de Sussex, Inglaterra. |
| 71/18 | <i>supE, thiΔ(lac-proAB)F'(proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15).</i> | Messing et al., 1977. |
| ET8000 | <i>rbs, lacZ::IS1, gyrA, hutC^c.</i> | MacNeil et al., 1982. |
| CC118 | <i>F, Δ(ara-leu)7697, araD139, ΔlacX74, galK, phoA20, thi, rpsE, rpoB, argE (Am), recA1.</i> | Manoil y Beckwith, 1985. |
| JM101 | <i>lac, pro, thi, supE, F'(traD36, proAB, lacI^qΔM15).</i> | Viera et al., 1982. |
| JM109 | <i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thiΔ(lac-proAB)F'(traD36, proAB⁺, lacZΔM15).</i> | Yanisch-Perron et al., 1985. |
| CJ236 | <i>dut1, ungl1, thi1, relA1/pJC105 (cam^r F').</i> | Kunkel et al., 1987. |
| HB101 | <i>supE44, hsdS20, (r_B⁻ m_B⁻), recA13, ara14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl5, mt11.</i> | Boyer y Roulland-Dussoix, 1969. |

3.-MEDIOS DE CULTIVO.

El medio habitual de crecimiento tanto de las estirpes de *Escherichia coli* como las de *Pseudomonas putida* fue el medio de Luria-Bertani (LB) (Maniatis *et al.*, 1982), cuya composición es la siguiente:

NaCl.....10g
Bactotriptonas.....10g
Extracto de levadura.....5g
H₂O hasta.....1l
Bacto-agar (medio sólido).15g

Para el aislamiento de fagos en medio líquido se utilizó el medio 2xYT (Maniatis *et al.*, 1982) que consta de:

NaCl.....5g
Bactotriptonas.....16g
Extracto de levadura..10g
H₂O hasta.....1l

Para el aislamiento de placas de fagos se utilizaron cajas de Petri con medio H y agar blando (Maniatis *et al.*, 1982). El medio H consta de:

Bactotriptonas.....10g
NaCl.....8g
Bacto-agar.....12g
H₂O hasta.....1l

El agar blando para la siembra de los fagos sobre el medio H contenía:

Bactotriptona.....10g
 NaCl.....8g
 Bacto-agar.....6g
 H₂O hasta.....1l

Cuando se requirió medio mínimo se usó una modificación del medio M9 (Maniatis *et al.*, 1982), cuya composición es la siguiente:

NaH₂PO₄·7H₂O.....6g
 K₂HPO₄.....3g
 NH₄Cl.....1g
 NaCl.....0,5g
 MgSO₄·7H₂O.....52mg
 Solución A9.....2,5ml
 H₂O hasta.....1l

La solución A9 contiene por litro las siguientes sales:

HBO₃.....300mg
 ZnCl₂.....50mg
 MnCl₂·4H₂O.....30mg
 CoCl₂.....200mg
 CuCl₂·2H₂O.....10mg
 NiCl₂·6H₂O.....20mg
 NaMoO₄·2H₂O.....30mg

Como fuente de carbono se utilizó glucosa (0,5 % p/v), benzoato y 3-metilbenzoato, estos dos últimos a concentración 2 mM.

Todos los medios se esterilizaron en un autoclave a una atmósfera de presión y 115°C durante 20 minutos.

4.-ANTIBIÓTICOS.

Los antibióticos se prepararon en soluciones 1.000 veces concentradas en H₂O destilada o en etanol absoluto. Los primeros se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros estériles cuyo diámetro de poro era de 0,45 μ m. Las concentraciones finales en el medio fueron para *E. coli* (μ g/ml):

| | |
|-----------------------------|-----|
| Ampicilina (Ap)..... | 100 |
| Kanamicina (Km)..... | 25 |
| Tetraciclina (Tc)..... | 10 |
| Cloranfenicol (Cm)..... | 30 |
| Estreptomicina (Sm)..... | 50 |
| Acido nalidíxico (Nal)..... | 10 |

5.-SOLUCIONES EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.

En esta sección se recogen las soluciones utilizadas más frecuentemente en este trabajo y su correspondiente abreviatura con objeto de facilitar la posterior lectura.

Acetato potásico pH 4,8: A 60 ml de acetato potásico 5 M se le añadieron 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua destilada. La solución final tiene una concentración 5 M de acético y 3 M de potasio. El pH de la solución se ajusta con ácido clorhídrico. La solución es estable a 4°C.

ARNasa: Contiene 10 mg/ml de ribonucleasa A en TE. Para eliminar la posible contaminación con nucleasas específicas de ADN, la solución se hirvió 10 minutos, se dejó enfriar a temperatura

ambiente y alícuotas de 0,5 ml se almacenaron congeladas a -20°C . Las muestras congeladas son estables durante meses.

Benzoato y sus derivados: Todos los benzoatos usados en este trabajo se prepararon en H_2O destilada a concentración 0,5 M. Su disolución completa se consiguió añadiendo NaOH concentrado hasta que el pH de la solución final fue aproximadamente 9. Estos compuestos se esterilizaron en el autoclave a una atmósfera de presión y 115°C durante 20 minutos. Las soluciones estériles son estables a 4°C durante meses.

Cloroformo-alcohol isoamílico: Se mezcla cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 24:1. La mezcla es estable a 4°C .

Fenol ácido: Los cristales de fenol se fundieron a 60°C y la solución se saturó con tampón acetato potásico 50 mM, pH 4,8. La solución es estable a 4°C .

Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico: Los cristales de fenol se fundieron a 60°C y se mezclaron con cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:24:1. La solución se saturó con Tris-ClH 1 M, pH 8,0 y, cuando la fase acuosa alcanzaba este pH, ésta se sustituyó por una solución 10 mM de Tris-ClH pH 8,0 suplementado con 1 mM de EDTA.Na_2 (TE). La solución final se almacena a 4°C .

Solución de Glucosa-Tris-EDTA (GTE): Contiene glucosa 50 mM; EDTA.Na_2 10 mM y Tris-HCl 25 mM pH 8,0. La solución se esterilizó en el autoclave a 115°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Cuando esta solución se suplementaba con lisozima, ésta se

añadía justo antes de empezar el experimento para alcanzar una concentración final de 4 mg/ml.

Solución de isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG): Contiene 100 mM de IPTG. Se esteriliza mediante filtración a través de filtros esteriles de 0,45 μ m de diámetro de poro. Estable a -20°C.

Solución de acetato potásico y ácido fórmico (KAcF): Contiene acetato potásico 3 M y ácido fórmico 1,8 M. Se esterilizó en autoclave en las mismas condiciones descritas anteriormente. Estable a 4°C.

Marcador de pesos moleculares para geles de agarosa (λ_{H}): Se digirieron 160 μ l de ADN del fago λ (1 μ g/ μ l) en un volumen de 200 μ l con el enzima de restricción *Hind*III ó con *Hind*III y *Eco*RI en el tampón universal de restricción (TAS, ver página 37). Después de 2 horas a 37°C el ADN se transfirió 5 minutos a un baño a 65°C, añadiéndose 280 μ l de TE y 120 μ l de tampón de carga para geles de agarosa. Se almacenó a 4°C.

Membranas de DEAE-celulosa activadas: Las membranas de DEAE-celulosa (Schleicher y Schuell, referencia NA-45) se cortaron en trozos de 1 cm² y se lavaron en EDTA.Na₂ 10 mM, pH 7,6 durante 10 minutos. A continuación, se enjuagaron varias veces con agua destilada y se sumergieron durante 5 minutos en NaOH 0,5 M, volviéndose a enjuagar con agua destilada. Las membranas activadas se almacenaron en agua destilada a 4°C y eran estables durante semanas.

Solución de bromuro de alquiltrimetilamonio (MATAB): Contiene 2 mg/ml de MATAB en Tris-HCl 200 mM pH 8,0.

Solución de hidróxido sódico y laurilsulfato sódico (NaOH/SDS): Contiene NaOH 0,2 M y SDS 1 % (p/v).

Solución de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG): Contiene 4 mg/ml de ONPG en tampón fosfato 100 mM, pH 7,0. Se almacenó a 4°C protegido de la luz.

Solución de polietilenglicol y cloruro sódico (PEG/NaCl): Contiene polietilenglicol 4.000 al 20 % (p/v) y NaCl 2,5 M. Se esterilizó en el autoclave en las mismas condiciones descritas anteriormente y se almacenó a 4°C.

Solución stock de acrilamida: Se preparó disolviendo 38 g de acrilamida y 2 g de N,N'-metilenbisacrilamida en 100 ml de agua destilada. La solución se desionizó añadiendo 5 g de amberlita, agitándose durante 30 minutos. Finalmente la amberlita se eliminó por filtración. La solución es estable a 4°C si se protege de la luz.

Solución de acrilamida/urea para electroforesis desnaturalizantes: Contiene 25,2 g de urea ultrapura, 9 ml de la solución stock de acrilamida, 6 ml de 10xTBE (ver página 37) y H₂O destilada hasta 60 ml. La solución se calentó a 37°C para favorecer la disolución de la urea. La polimerización de la acrilamida se obtuvo añadiendo 300 μ l de persulfato amónico al 10 % (p/v) de preparación extemporánea y 50 μ l de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina).

Solución de didesoxinucleótidos para secuenciar con Klenow: Se utilizaron las mezclas comerciales "Deaza sequencing mixes" de la firma Pharmacia. Se almacenaron a -20°C .

Solución de nucleótidos de elongación de cadenas sencillas de ADN para secuenciar con Klenow: Contiene 0,5 mM de cada uno de los cuatro dNTPs (deseoxinucleótidos). Guardar a -20°C .

Solución de didesoxinucleótidos para secuenciar con T7 polimerasa:

a) Solución de didesoxiguanina: deazadGTP (deazadesoxiguanidín-5'-trifosfato) $160\mu\text{M}$; dATP (desoxiadenosín-5'-trifosfato) $80\mu\text{M}$; dCTP (desoxicitosín-5'-trifosfato) $80\mu\text{M}$; dTTP (desoxitimidín-5'-trifosfato) $80\mu\text{M}$; ddGTP (didesoxiguanidín-5'-trifosfato) $1,6\mu\text{M}$ y NaCl 50 mM.

b) Solución de didesoxiadenina: deazadGTP $160\mu\text{M}$; dATP $80\mu\text{M}$; dCTP $80\mu\text{M}$; dTTP $80\mu\text{M}$; ddATP $8\mu\text{M}$ (didesoxiadenosín-5'-trifosfato) y NaCl 50 mM.

c) Solución de didesoxitimina: deazadGTP $160\mu\text{M}$; dATP $80\mu\text{M}$; dCTP $80\mu\text{M}$; dTTP $80\mu\text{M}$; ddTTP $8\mu\text{M}$ (didesoxitimidín-5'-trifosfato) y NaCl 50 mM.

d) Solución de didesoxicitosina: deazadGTP $160\mu\text{M}$; dATP $80\mu\text{M}$; dCTP $80\mu\text{M}$; dTTP $80\mu\text{M}$; ddCTP $8\mu\text{M}$ (didesoxicitosín-5'-trifosfato) y NaCl 50 mM.

Las soluciones son estables a -20°C .

Solución de nucleótidos de marcado para secuenciar con ADN polimerasa del fago T7: Se prepara una solución madre 5 veces concentrada que contiene deazadGTP 15 μ M; dCTP 7,5 μ M y dTTP 7,5 μ M. Almacenar a -20°C.

Solución de sacarosa-Tris-EDTA (STE): Contiene sacarosa al 16 % (p/v); EDTA.Na₂ 100 mM y Tris-HCl 100 mM, pH 8,0.

Tampón de cebación (SSC): Se preparó una solución 20 veces concentrada que contenía NaCl 3 M y citrato sódico 300 mM. La solución es estable a -20°C.

Solución de Tris-EDTA (TE): Contení Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y EDTA.Na₂ 1 mM. Se esterilizó en el autoclave en las condiciones descritas anteriormente.

Tampón Z: Contiene Na₂HPO₄ 0,06 M; NaH₂PO₄ 0,04 M; KCl 0,01 M; MgSO₄ 0,001 M y β -mercaptoetanol 0,05 M. Almacenar a 4°C.

Tampón de muestra para geles de agarosa: Contiene glicerol al 30 % (p/v) y azul de bromofenol al 0,3 % (p/v).

Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE): Se preparó una solución madre 10 veces concentrada que contenía por litro Tris 108 g; ácido bórico 55 g y EDTA.Na₂.2H₂O 9,3 g. El pH final de la solución era 8,2. La solución se esterilizó en el autoclave en las condiciones descritas anteriormente.

Tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE): Se preparó 10 veces concentrado y contenía por litro: Tris 48,4 g; ácido acético glacial

11,4 ml y EDTA 0,5 M, pH 8,0, 20 ml. El pH final de la solución era 7,9. Esta solución se esterilizó en el autoclave en las condiciones descritas anteriormente.

Tampón universal para enzimas de restricción (TAS): Contiene por mililitro: 0,33 ml Tris-acetato 1 M, pH 7,9; 0,13 ml acetato potásico 5M; 0,1 ml acetato magnésico 1 M; 0,05 ml DTT (ditiotreitól) 0,1 M y 0,4 ml espermidina 0,1 M. Se almacenó en alícuotas de 200 μ l a -20°C .

Tampón de elución: Contiene NaCl 1 M; Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 y EDTA.Na₂ 0,1 M.

Tampón para fosfatasa alcalina: Contiene ZnCl₂ 1 mM; MgCl₂ 1 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 8,3. Se almacenó a 4°C .

Tampón de ligación: Se preparó una solución 10 veces concentrada que contenía: 0,66 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7,9; 0,1 ml de EDTA.Na₂ 0,1 M; 0,1 ml de MgCl₂ 1 M; 0,1 ml de DTT 1 M y 25 μ l de ATP 40 mM. Alícuotas de 0,1 ml se almacenaron a -20°C .

Tampón de muestra para geles de secuenciar en acrilamida: A 100 ml de formamida desionizada como la solución stock de acrilamida (página 32), se le añadieron 0,1 g de xilanilcianol; 0,1 g de azul de bromofenol y 4 ml de EDTA.Na₂ 0,5M pH 8,0. La solución era estable a 4°C .

Tampón de Klenow: Se prepara una solución 10 veces concentrada que contenía: Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 y MgCl₂ 500 mM. Estable a -20°C .

Tampón de extensión para la secuenciación con la ADN polimerasa del fago T7: Se preparó una solución 5 veces concentrada que contenía Tris-HCl 200 mM, pH 7,5; MgCl₂ 100 mM y NaCl 250 mM. Estable a -20°C.

Tampón para la ADN polinucleótidokinasasa del fago T4: Se preparó una solución 10 veces concentrada que contenía Tris-HCl 500 mM, pH 7,5; MgCl₂ 100 mM y DTT 50 mM. Estable a -20°C.

Tampón de extensión para la mutagénesis dirigida: Contenía HEPES 200 mM, pH 7,8; DTT 20 mM y MgCl₂ 100 mM. Estable a -20°C.

Solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido (X-gal): Se preparó una solución de X-gal al 2 % (p/v) en dimetilformamida. Alícuotas de 1 ml se almacenaron a -20°C.

6.-ENSAYO ENZIMÁTICO DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.

Tres mililitros de LB suplementados con los antibióticos correspondientes se inocularon con la cepa de interés incubándose a 30°C durante 12-14 horas. Entonces, los cultivos se diluyeron 100 veces en 3 ml del mismo medio. Tras incubar de 4 a 6 horas, la actividad β -galactosidasa se determinó en células permeabilizadas. Para permeabilizar las células, a 0,5 ml del cultivo se le añadieron 0,5 ml de MATAB, incubándose 20 minutos en hielo. Posteriormente, a 0,8 ml de tampón Z mantenido a 30°C se le añadieron 0,1 ml de bacterias permeabilizadas y la reacción se inició añadiendo 0,2 ml de

ONPG, el sustrato de la enzima β -galactosidasa. Generalmente la reacción se detuvo 2 ó 3 minutos más tarde añadiendo 2 ml de una solución 0,5 M de NaCO_3 . El o-nitrofenol, producto resultante de la hidrólisis del ONPG, muestra un máximo de absorbancia a 420 nm. Esta absorbancia se corrigió para la muestra de ensayo determinando la turbidez a 550 nm. La actividad β -galactosidasa se expresa en unidades de Miller, 1972, de acuerdo con la siguiente formula:

$$\text{unidades de } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{\text{DO}_{420} - 1,7 \times \text{DO}_{550}}{t \times v \times \text{DO}_{660}} \times 1000$$

Donde t representa el tiempo de ensayo en minutos, v el volumen de células permeabilizadas que se utilizó en el ensayo en mililitros, DO_{660} es la turbidez del cultivo utilizado para permeabilizar las células y DO_{420} y DO_{550} son la absorbancia de la mezcla de reacción a 420 y 550 nm, respectivamente.

7.-PLÁSMIDOS.

En esta sección se describen los detalles más relevantes de los plásmidos utilizados en este trabajo.

7.1. Plásmidos usados como vectores de clonación o como fuente de ADN para clonaciones posteriores.

pEMBL9: Es un derivado de pUC9 en el que se clonó un segmento que contiene el origen de replicación del fago F1, *amp'*

(Dente *et al.*, 1983). En este trabajo se usó como vector de clonación de alto número de copias (Figura 6).

pUC18/19: Son plásmidos diseñados para el clonaje de ADN. La diferencia entre ambos es que los sitios múltiples de clonación ("polilinkers") se orientan en sentido opuesto. Carecen del gen *rop* que controla el número de copias de los plásmidos con el origen de replicación de pMB1, por lo que están presentes en muy alto número de copias (~ 200). Estos plásmidos codifican 99 aminoácidos de la región amino terminal de la β -galactosidasa expresados desde P_{lac} , complementando la actividad β -galactosidasa en cepas que portan la delección *lacZ* Δ M15. Los plásmidos recombinantes con inserciones en el polilinker se reconocen en medio sólido LB suplementado con IPTG y X-gal ya que las colonias que los portan permanecen blancas, en contraste con las colonias que portan los vectores sin inserto que adquieren una coloración azul, *amp*^r (Messing *et al.*, 1983) (Figura 7).

pTZ18/19: Son plásmidos diseñados para el clonaje de ADN, la secuenciación de ADN con didesoxinucleótidos y la mutagénesis *in vitro* con oligonucleótidos. Estos plásmidos se construyeron a partir de pUC18/pUC19, portan el origen de replicación del fago F1 y la secuencia que hibrida con los cebadores universales, directo y reverso, que se utilizan en las reacciones de secuenciación de ADN. El número de copias por célula es mayor de 200, *amp*^r (Zoller y Smith, 1983). La selección de clones recombinantes se realizó como en pUC18 y pUC19 (Figura 8).

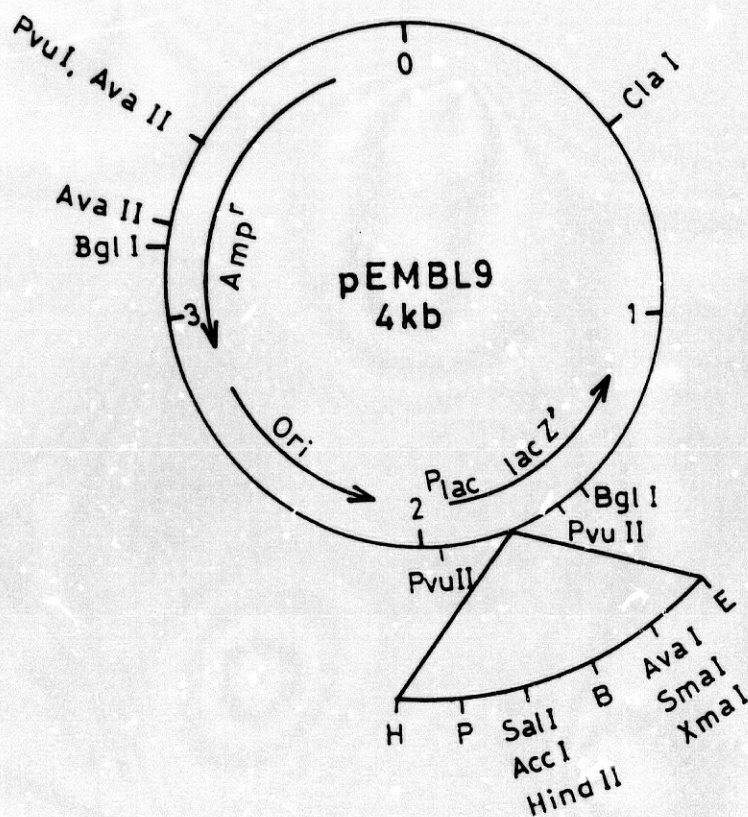
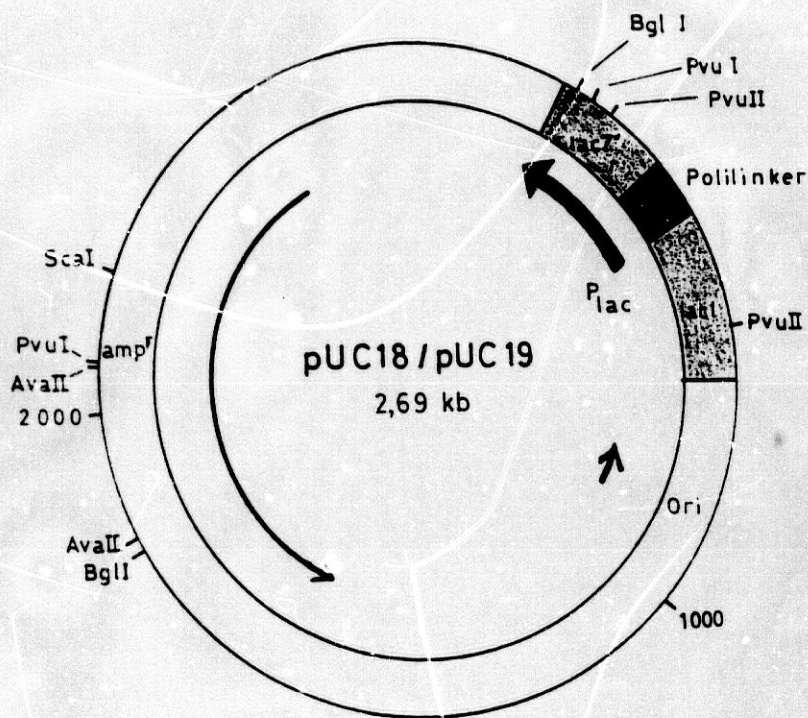


FIGURA 6. Esquema del vector de clonación pEMBL9. Las abreviaturas usadas para los enzimas de restricción son: B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII y P, PstI.



Polilinker

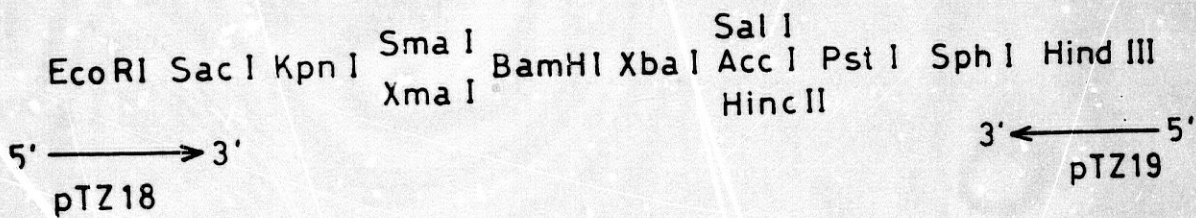


FIGURA 7. Esquema de los plásmidos pUC18 y pUC19. Estos plásmidos difieren únicamente en la orientación del sitio de clonación múltiple o polilinker. Dicha orientación junto con las enzimas de restricción que cortan en el polilinker son como se indican.

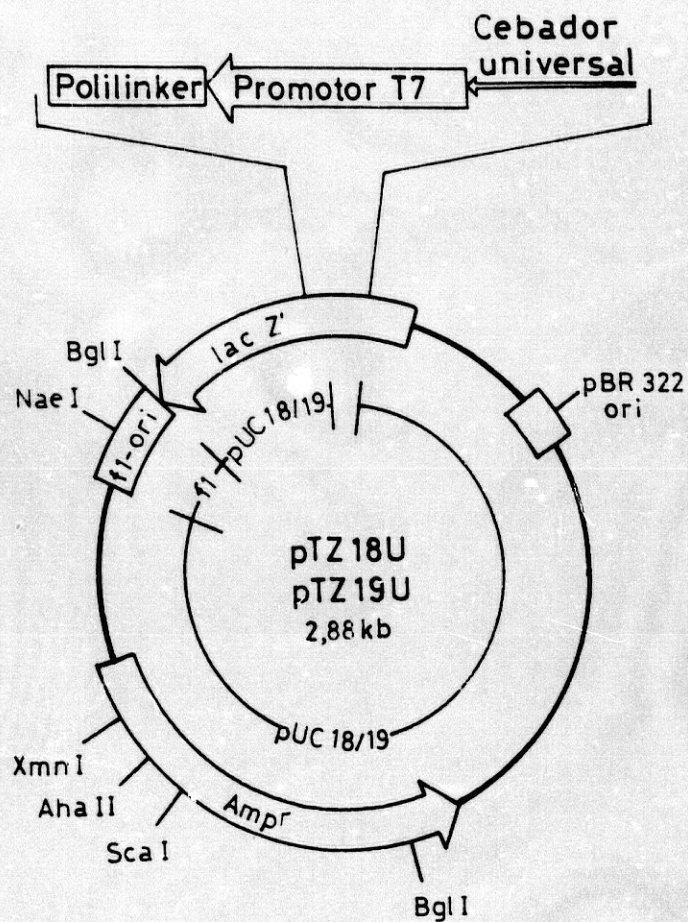


FIGURA 8. Esquema de los plásmido pTZ18 y pTZ19. El polilinker es el mismo que el de los plásmidos pUC18 y pUC19, respectivamente.

pMP220: Es un plásmido diseñado para el clonaje de promotores, su número de copias es relativamente bajo (4 a 6 copias por célula). Su origen de replicación se deriva del plásmido pRK2 y, por tanto, pertenece al grupo de incompatibilidad P1 (IncP1). Este plásmido es movilizable (*mob*⁺) pero no autotransmisible (*tra*⁻), y codifica resistencia a tetraciclina, *tet*^r (Spaink, resultados sin publicar) (Figura 9).

pKT231: Plásmido de amplio espectro de huésped que pertenece al grupo de incompatibilidad P4 (IncP4). Es un derivado de pRSF1010, su número de copias por célula oscila entre 20 y 30, *kan*^r, *str*^r, (Bagdasarian *et al.*, 1981) (Figura 10).

pBR322: Vector de clonación descrito por Bolivar *et al.*, 1977. Su número de copias por célula oscila entre 20 y 50, *amp*^r, *tet*^r (Figura 11).

pNM185: Se construyó a partir de pKT231 clonando, en el sitio *Bam*HI, el gen *xy/S* en un fragmento *Sau*3A de 1,7Kb procedente del plásmido TOL pWW0. Contiene asimismo el promotor Pm en un fragmento de 0,4 Kb en 5' con respecto al gen de resistencia a estreptomicina. Confiere resistencia a kanamicina, *kan*^r. (Mermod *et al.*, 1986a).

pERD2: Derivado de pNM185 mediante mutagénesis con etilmetanosulfonato, contiene el alelo *xy/S2*. (Ramos *et al.*, 1986).

pERD352: Igual que el anterior pero con el alelo *xy/S352*. (Ramos *et al.*, 1986).

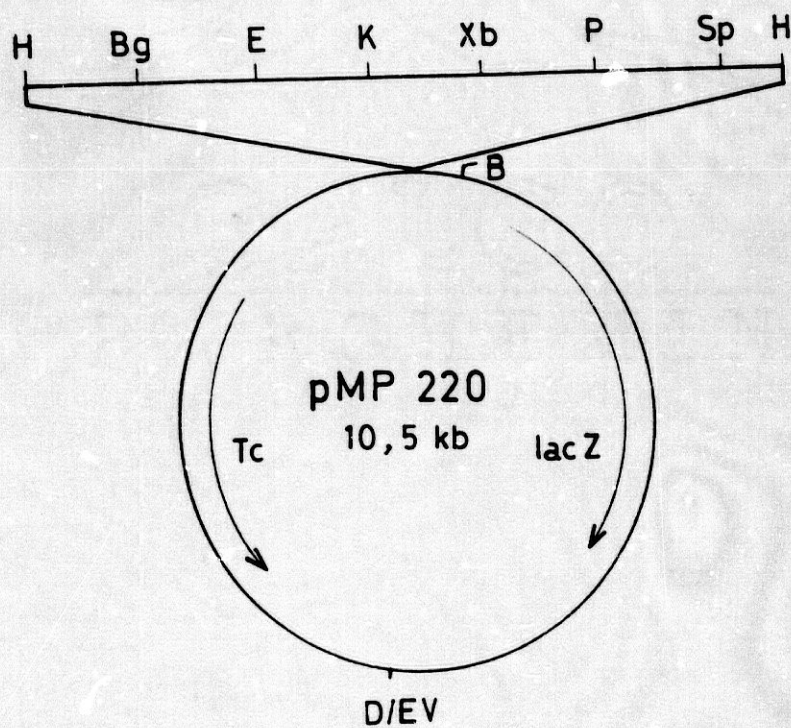


FIGURA 9. Esquema del plásmido pMP220. Las abreviaturas usadas para los enzimas de restricción son: B, *BamHI*; Bg, *BglIII*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; P, *PstI*; Sp, *SphI* y Xb, *XbaI*. EV/D es un sitio mixto de unión entre un punto de restricción *EcoRV* y otro *DraI*.

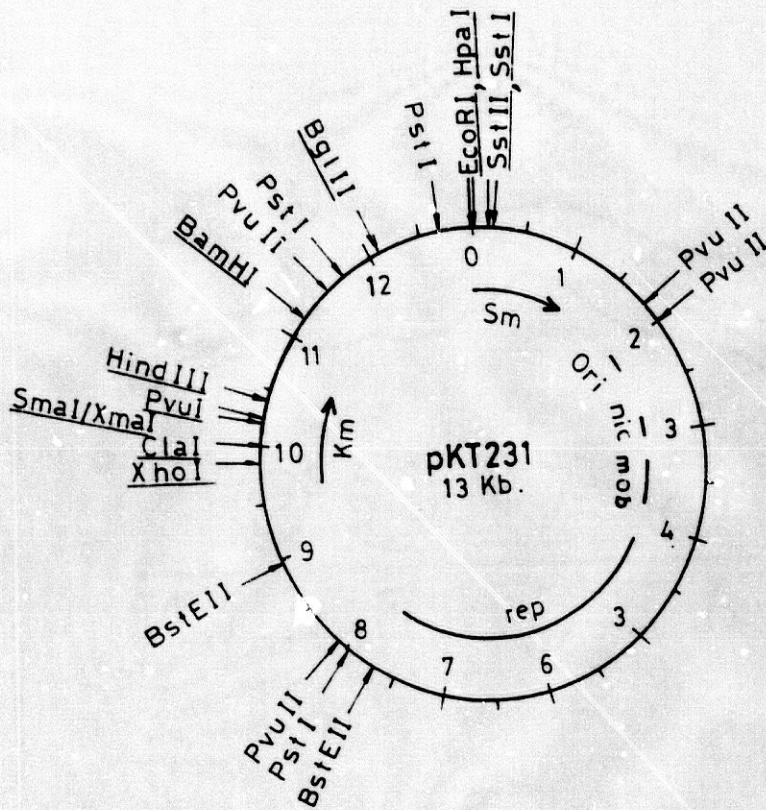


FIGURA 10. Esquema del plásmido pKT231. Se muestran los puntos de corte con diversas enzimas de restricción, subrayándose aquellos que son puntos únicos. También se indica la situación de los genes que codifican resistencia a estreptomicina y kanamicina, el origen de replicación y la de otros genes que actúan en la movilización y replicación del plásmido.

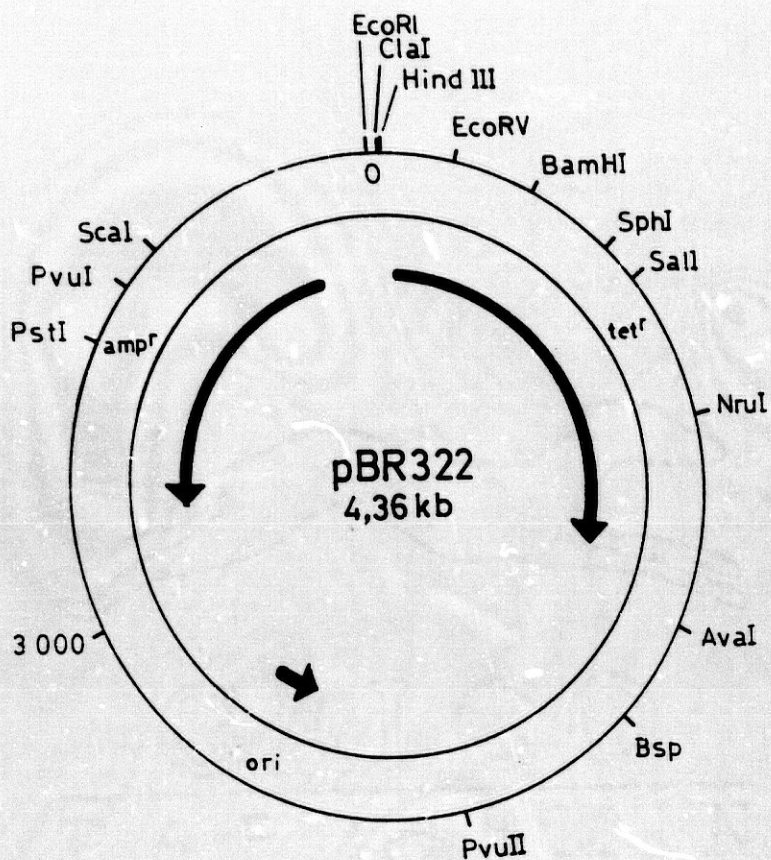


FIGURA 11. Esquema del plásmido pBR322. Se indican los puntos de corte con diversas restrictasas, el origen de replicación y los genes que codifican resistencia a ampicilina y tetraciclina.

pERD241: Igual que el anterior pero con el alelo *xy/S241*. (Ramos *et al.*, 1986).

pERD12: Igual que el anterior pero con el alelo *xy/S12*. (Ramos *et al.*, 1990a).

pERD13: Igual que el anterior pero con el alelo *xy/S13*. (Ramos *et al.*, 1990a).

pERD14: Igual que el anterior pero con el alelo *xy/S14*. (Ramos *et al.*, 1990a).

pERD254: Igual que el anterior pero con el alelo *xy/S254*. (Ramos *et al.*, 1990a).

pJLR156: Contiene un fragmento *Bam*HI de 1,7Kb con el gen *xy/S* clonado en el sitio *Bam*HI de pEMBL9, *amp*^r. (Ramos *et al.*, 1987a).

pJLR101: Contiene el promotor del operón *meta* del plásmido TOL (Pm) en un fragmento *Pst*I de 401pb de pWWO en el sitio *Pst*I de pEMBL9, *amp*^r, (Ramos *et al.*, 1986).

pJLR107: Derivado de pMD1405, vector de ensayo de promotores (M. Drummond, datos sin publicar). Contiene el origen de replicación de pBR322 y una fusión del promotor Pm al gen *lacZ* desprovisto de su promotor natural (Pm::*lacZ*), *amp*^r. (Ramos *et al.*, 1986).

pWWO: Plásmido TOL de *Pseudomonas putida*. IncP9, tol⁺, m-xileno⁺, 3-metilbenzoato⁺. (Worsey y Willians, 1975) (Figura 2, página 14).

pERD8: Clonaje del mutante constitutivo *xy/S32*, obtenido por mutagénesis con NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) en el sitio *BamHI* de pEMBL9 (Zhou *et al.*, 1990). Este mutante contiene un único cambio en su secuencia nucleotídica con respecto a la secuencia del alelo silvestre, el codón 229 cambia de AGC a ATC. En la secuencia de aminoácidos correspondiente la serina 229 ha sido sustituida por isoleucina.

pERD9: Igual que el anterior pero con el alelo *xy/S52* (Zhou *et al.*, 1990). Lleva el cambio de GAT a GTT en el codón 274, lo que produce en la proteína un cambio del aspártico 274 a valina.

7.2.-Plásmidos construidos en el curso de este trabajo.

pERD100: Es una fusión *Pm::lacZ* que se construyó clonando un fragmento *PstI* de 401 pb proveniente de pJLR101 en el sitio *PstI* de pMP220, *tet^r*, *IncP1*.

pERD803: Es un derivado de pKT231 con el fragmento que codifica la zona amino terminal del alelo *xy/S2* desde el sitio *EcoRI* al sitio *NcoI* y el fragmento que codifica la zona carboxilo terminal de *xy/S12* desde el sitio *NcoI* al sitio *HindIII*. Los sitios *EcoRI* y *HindIII* de cada alelo se encuentran flanqueados por sitios *BamHI* que se utilizaron para el clonaje en el sitio *BamHI* de pKT231, *kan^r*. El alelo mutante se denomina *xy/S803*.

Los siguientes plásmidos se construyeron de manera similar y se indica el origen de las regiones amino y carboxilo terminal.

pERD804: Igual que el anterior con la región amino terminal de *xy/S2* y la carboxilo terminal de *xy/S14*. El alelo mutante se denomina *xy/S804*.

pERD805: Igual que el anterior con la región amino terminal de *xy/S2* y la carboxilo terminal de *xy/S352*. El alelo mutante se denomina *xy/S805*.

pERD806: Igual que el anterior con la región amino terminal de *xy/S2* y la carboxilo terminal de *xy/S32*. El alelo mutante se denomina *xy/S806*.

pERD807: Igual que el anterior con la región amino terminal de *xy/S2* y la carboxilo terminal de *xy/S52*. El alelo mutante se denomina *xy/S807*.

pERD808: Igual que el anterior con la región amino terminal de *xy/S13* y la carboxilo terminal de *xy/S12*. El alelo mutante se denomina *xy/S808*.

pERD809: Igual que el anterior con la región amino terminal de *xy/S13* y la carboxilo terminal de *xy/S14*. El alelo mutante se denomina *xy/S809*.

pERD810: Igual que el anterior con la región amino terminal de *xy/S13* y la carboxilo terminal de *xy/S352*. El alelo mutante se denomina *xy/S810*.

pERD811: Igual que el anterior con la región amino terminal de *xy/S13* y la carboxilo terminal de *xy/S32*. El alelo mutante se denomina *xy/S811*.

pERD812: Igual que el anterior con la región amino terminal de xy/S13 y la carboxilo terminal de xy/S52. El alelo mutante se denomina xy/S812.

pERD813: Igual que el anterior con la región amino terminal de xy/S241 y la carboxilo terminal de xy/S12. El alelo mutante se denomina xy/S813.

pERD814: Igual que el anterior con la región amino terminal de xy/S241 y la carboxilo terminal de xy/S14. El alelo mutante se denomina xy/S814.

pERD815: Igual que el anterior con la región amino terminal de xy/S241 y la carboxilo terminal de xy/S352. El alelo mutante se denomina xy/S815.

pERD816: Igual que el anterior con la región amino terminal de xy/S241 y la carboxilo terminal de xy/S32. El alelo mutante se denomina xy/S816.

pERD817: Igual que el anterior con la región amino terminal de xy/S241 y la carboxilo terminal de xy/S52. El alelo mutante se denomina xy/S817.

pERD818: Derivado de pEMBL9 con xy/S803 en el sitio *Bam*HI, *amp^r*.

pERD819: Igual que el anterior con xy/S804.

pERD820: Igual que el anterior con xy/S805.

pERD821: Igual que el anterior con xy/S806.

pERD822: Igual que el anterior con xy/S807.

pERD823: Igual que el anterior con xy/S808.

pERD824: Igual que el anterior con xy/S809.

pERD825: Igual que el anterior con xy/S810.

pERD826: Igual que el anterior con xy/S811.

pERD827: Igual que el anterior con xy/S812.

pERD828: Igual que el anterior con xy/S813.

pERD829: Igual que el anterior con xy/S814.

pERD830: Igual que el anterior con xy/S815.

pERD831: Igual que el anterior con xy/S816.

pERD832: Igual que el anterior con xy/S817.

pERD833: Derivado de pKT231 con xy/S833 clonado en el sitio *Bam*HI, este alelo fue obtenido mediante mutagénesis dirigida con oligonucleótidos (Tabla 2).

pERD834: Igual que el anterior con xy/S834.

pERD835: Igual que el anterior con xy/S835.

pERD836: Igual que el anterior con xy/S836.

pERD837: Igual que el anterior con xy/S837.

pERD838: Igual que el anterior con xy/S838.

pERD839: Igual que el anterior con xy/S839.

pERD840: Igual que el anterior con xy/S840.

pERD841: Igual que el anterior con xy/S841.

pERD842: Igual que el anterior con xy/S842.

TABLA 2. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos sintetizados para obtener mutantes en los aminoácidos 41 y 45 del gen *xyIS*.

| Oligo-nucleótido | Secuencia de bases 5'---->3' | Alelo de <i>xyIS</i> obtenido |
|------------------|---|-------------------------------|
| RAM6 | GGCAGGCAG <u>C</u> CTGCACC | <i>xyIS</i> 833 |
| RAM7 | GGCAGGC <u>G</u> GGCTGCACC | <i>xyIS</i> 834 |
| RAM8 | GGCAGGCA <u>A</u> GCTGCACC | <i>xyIS</i> 835 |
| CM100 | AAGGGCGGG <u>A</u> GCCCAGGC | <i>xyIS</i> 836 |
| CM101 | AAGGGCGGG <u>G</u> GCCCAGGC | <i>xyIS</i> 837 |
| CM102 | AAGGGCGGG <u>T</u> GCCCAGGC | <i>xyIS</i> 838 |
| CM103 | AAGGGCGGG <u>C</u> C ₂ CCCAGGC | <i>xyIS</i> 839 |
| CM104 | AAGGGCGGG <u>C</u> TCCCAGGC | <i>xyIS</i> 840 |
| CM105 | CCGGCAGGCT <u>G</u> GCTGCACCAC | <i>xyIS</i> 841 |
| CM106 | CCGGCAGGCA <u>T</u> GCTGCACCAC | <i>xyIS</i> 842 |

Se indica el nombre dado en el grupo al oligonucleótido sintetizado. En la secuencia nucleotídica se subraya el nucleótido que da lugar al cambio en el alelo mutante.

pERD843: Clonaje en el sitio *Bam*HI de pKT231 de un mutante de *xy/S* obtenido mediante mutagénesis con bisulfito en el sitio *Nco*I (*xy/S843*) por la Dra L. Zhou en este laboratorio (Zhou *et al.*, 1991).

pERD844: Igual que el anterior con *xy/S844*.

pERD845: Igual que el anterior con *xy/S845*.

8.-PREPARACIONES DE PLÁSMIDOS A PEQUEÑA ESCALA.

Las cepas que portaban el plásmido de interés se cultivaron a 30°C con agitación durante 6-14 horas en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. La preparación de plásmidos se realizó de acuerdo con alguno de los siguientes métodos:

8.1.-Método alcalino.

Un mililitro y medio de cultivo se recogió por centrifugación (12.000 rpm, 1 minuto) en un tubo eppendorf. Tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 100 μ l de GTE suplementado con lisozima y, después de 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 μ l de NaOH/SDS, incubándose las células 5 minutos en hielo para obtener lisis total. Posteriormente, se añadieron 150 μ l de una solución de acetato potásico, pH 4,8, se agitó vigorosamente 5 segundos con el tubo invertido y se mantuvo la mezcla en hielo durante 5 minutos para neutralizar la mezcla homogéneamente. Para eliminar los restos celulares, proteína y ADN cromosómico, la mezcla se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf al que se le añadieron

200 μ l de fenol ácido, tras agitar vigorosamente durante un minuto, las fases se separaron por centrifugación (3 minutos a 12.000 rpm). La fase acuosa se recogió y se le añadieron 200 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, procediéndose como en el paso anterior con fenol ácido. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo al que se añadieron 0,8 ml de etanol absoluto. La mezcla se incubó a -20°C durante 30 minutos y se centrifugó 15 minutos a 12.000 rpm. El sobrenadante se desechó y el precipitado, conteniendo mayoritariamente ADN plasmídico, se secó al vacío, resuspendiéndose finalmente en 20 μ l de TE.

8.2.-Método de hervido.

1,5 ml de cultivo se recogieron por centrifugación como en el apartado anterior, las células se resuspendieron en 250 μ l de STET (mezcla de preparación extemporanea de STE y Tritón 10 % (p/v) 1:1). Se añadieron entonces 25 μ l de una solución recién preparada de lisozima (100 mg/ml) en TE. Tras ser incubadas 5 minutos a temperatura ambiente, las muestras se hirvieron 1,5 minutos, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos y 200 μ l del sobrenadante resultante, conteniendo mayoritariamente ADN plasmídico, se transfirieron a otro tubo al que se le añadieron 200 μ l de isopropanol. La mezcla se mantuvo 30 minutos a -20°C , centrifugándose a 12.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado se secó al vacío. Finalmente, el ADN plasmídico se resuspendió en 400 μ l de TE. Para eliminar la proteína

contaminante se añadieron 200 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se procedió tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

9.-PREPARACIONES DE PLÁSMIDOS A GRAN ESCALA.

9.1.-Método del cloruro de cesio.

Matraces de un litro de capacidad conteniendo 200 ml de LB y los antibióticos correspondientes se inocularon con la cepa de la cual queríamos extraer el plásmido. Las bacterias se cultivaron durante 10-24 horas a 30°C con agitación. Las células se recogieron por centrifugación a 4.080g, durante 10 minutos, desechándose el sobrenadante. El sedimento constituido por células enteras se resuspendió en 30 ml de GTE, añadiéndose entonces 60 ml de una mezcla recién preparada de NaOH/SDS, tras mezclar suavemente, la preparación se mantuvo en hielo 5 minutos. Se añadieron 45 ml de KAcF y tras mezclar invirtiendo el tubo desde el fondo a la boca repetidas veces se mantuvo en hielo al menos 15 minutos. Esta solución, en la que eran visibles conglomerados, se centrifugó 15 minutos a 5.875g. El sobrenadante se filtró a través de un colador de té metálico para retener pequeños grumos y se suplementó con 80 ml de isopropanol (-20°C). Tras centrifugar 15 minutos a 13.218g, el sobrenadante se desechó, drenándose el tubo, el cual se mantuvo invertido hasta que el precipitado aparecía seco. El sedimento (ADN, ARN y proteínas) se resuspendió en 10 ml de TE, entonces, se

añadieron 11 g de cloruro de cesio y 0,5 ml de una solución de bromuro de etidio en H₂O (10 mg/ml). Para eliminar la proteína que aparecía en grumos con el bromuro de etidio, la muestra se centrifugó 15 minutos a 1.086g. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo de ultracentrífuga y se selló. La preparación se centrifugó durante 40-48 horas a 40.000 rpm en un rotor Beckmann 50Ti (67.000-145.000g) a 15°C con objeto de establecer un gradiente isopícnico de cloruro de cesio. Tras la centrifugación los ADNs se visualizaron utilizando luz ultravioleta de 300 nm. El ADN cromosómico aparece en forma de banda en la parte superior mientras que el ADN plasmídico formó una banda a menor densidad en el gradiente. El ADN plasmídico se extrajo utilizando una jeringa. Para eliminar el bromuro de etidio de la preparación de ADN se añadió un volumen de isopropanol al 90 % (v/v), se mezcló y se extrajo la parte superior en la que estaba el isopropanol con el bromuro de etidio, este paso se repitió hasta que la fase acuosa no presentó coloración. A la fase acuosa conteniendo el ADN se le añadieron 2 volúmenes de agua y 6 volúmenes de etanol absoluto, incubándose 2 horas a -20°C. El ADN se precipitó por centrifugación a 9.770g durante 15 minutos, el precipitado se secó al vacío y se disolvió en un volumen apropiado de TE (entre 100 y 500 µl).

9.2.-Método rápido de preparación a gran escala.

Matraces de 250 ml de capacidad conteniendo 25 ml de LB más los antibióticos correspondientes, se inocularon con la estirpe de interés

y se incubaron durante 6-14 horas a 30°C con agitación. Las células se recogieron por centrifugación (5 minutos a 12.062g), y, las bacterias se resuspendieron en 1 ml de GTE suplementado con 4 mg/ml de lisozima. Después de 5 minutos a temperatura ambiente se añadieron 2 ml de NaOH/SDS transfiriéndose la mezcla a un baño de hielo. Cinco minutos después se añadieron 1,5 ml de KAcF, se mezcló 10 segundos vigorosamente y el tubo se transfirió de nuevo al baño de hielo durante al menos 5 minutos. La mezcla se centrifugó 15 minutos a 3.015g; al sobrenadante resultante se le añadieron 8 ml de isopropanol (-20°C) y se centrifugó durante 15 minutos a 9.770g. El sobrenadante se decantó y el precipitado se secó y se resuspendió en 400 μ l de TE, procediéndose con fenol como en las preparaciones a pequeña escala. El ADN plasmídico se precipitó por centrifugación tras añadir dos volúmenes de etanol absoluto (-20°C). Finalmente, el ADN precipitado se resuspendió en 50 μ l de TE.

10.-PREPARACIÓN DE CELULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli*.

Las células de *E. coli* se transformaron mediante el método del cloruro cálcico descrito por Cohen *et al.*, 1972. La cepa que se quería transformar se cultivó en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes durante 12-14 horas. 1 ml del cultivo se transfirió a 100 ml del mismo medio y las bacterias se cultivaron a 30°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una fase de crecimiento

exponencial temprana (turbidez de 0,5 a 0,7 a 660 nm). Las células se recogieron por centrifugación a 4°C (12.062g, 5 minutos) y se lavaron con CaCl₂, 10 mM (4°C). Las bacterias se centrifugaron de nuevo (12.062g, 5 minutos) y se siguieron dos procedimientos distintos dependiendo del tiempo que transcurría hasta añadir el ADN a transformar:

a) Si las células se utilizaban de 1 a 24 horas después de su preparación, éstas se resuspendían suavemente en 1 ml de CaCl₂, 100 mM (4°C) y se repartían en alícuotas de 200 µl, conservándose en un baño con hielo. Tras una hora de incubación, las células alcanzaban el estado de competencia.

b) Si las células se utilizaban hasta 6 meses después de su preparación, se resuspendían en 1 ml de CaCl₂ 100 mM suplementado con 15 % (v/v) de glicerol, se repartían en alícuotas de 200 µl y se congelaban a -70°C.

Para transformar el ADN plasmídico se añadía entre 1 y 25 µl de la solución de ADN en TE (de 0,1 a 1 µg) a una alícuota de células competentes, incubándose 45 minutos en hielo. Tras ello, las células se sometieron a choque térmico (5 minutos a 37°C ó 2 minutos a 42°C) y se transfirieron a un tubo de cultivo con 2 ml de LB sin antibióticos, incubándose de 1 a 5 horas a 30°C en agitación para permitir la expresión de los antibióticos codificados por el plásmido introducido. Alícuotas de 50 y 150 µl se sembraron en LB sólido

suplementado con los antibióticos que permitían seleccionar las células transformantes.

11.-TRANSFERENCIA DE ADN MEDIANTE CONJUGACIÓN BACTERIANA.

Esta técnica se utilizó para transferir plásmidos a *P. putida* (ver Willetts y Wilkins, 1984, para una revisión). Se realizaron conjugaciones triparentales del receptor (*P. putida*), la cepa donadora portando un plásmido movilizable (mob^+) no autotransferible (tra^-) y una cepa portando un plásmido ayudador autotransferible (tra^+) que no se replica en *P. putida* y que es capaz de movilizar al plásmido mob^+ , tra^- de la cepa donadora. Aproximadamente 10^8 células de cada una de las cepas bacterianas se mezclaron por centrifugación y se resuspendieron en 20-25 μ l de LB, este volumen se depositó sobre un filtro estéril de nitrocelulosa colocado sobre la superficie de una placa LB sólido. Tras 12 a 14 horas a 30°C, las células presentes en el filtro se resuspendieron en 10 ml. de medio mínimo sin fuente de carbono, sembrándose al menos tres diluciones en medio sólido que permitían seleccionar transconjugantes de la cepa receptora que portasen el plásmido mob^+ proveniente de la cepa donadora.

12.-RESTRICCIONES.

Las restricciones de ADN se realizaron en el tampón universal para enzimas de restricción (página 35) o en los tampones

suministrados por los fabricantes de las enzimas, generalmente Boehringer-Manheim. Todas las restricciones se incubaron al menos 1 hora y 30 minutos a 37°C.

13.-DESFOSFORILACIÓN DE ADN CON FOSFATASA ALCALINA.

El ADN ya cortado con restrictasas se suspendió en 30 μ l de tampón de desfosforilación, añadiéndose 1 μ l de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Boehringer-Manheim, 1 unidad/ μ l). Tras 30 minutos de incubación a 37°C, se añadió 1 μ l de EGTA (ácido etilenglicol-bis-(β -aminocetil eter) N,N,N',N'-tetraacético) 0,5 M, pH 8,0 para detener la reacción. Posteriormente, la solución de ADN se calentó 10 minutos a 60°C y se añadieron 170 μ l de TE procediéndose a realizar una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. El ADN en la fase acuosa se precipitó por centrifugación tras añadir 400 μ l de etanol absoluto (-20°C). El ADN precipitado se resuspendió en 20 μ l de TE.

14.-SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN POR ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

ADN cortado con restrictasas se mezcló con la solución de carga (6:1 v/v) y se depositó en los pocillos de un gel de agarosa 0.8 % (p/v) en TBE ó TAE, sumergido en una cubeta con el mismo tampón. La separación de fragmentos de ADN se realizó a 20-100 voltios. Los fragmentos de ADN se visualizaron tras incubación en una solución

con bromuro de etidio (10 $\mu\text{g/ml}$ en agua, durante 10 minutos) y exposición del gel a luz ultravioleta (254 nm). La imagen se impresionó en una película Polaroid 667. El tamaño de los fragmentos se determinó utilizando como patrón los fragmentos del ADN del fago Lambda cortados con el enzima de restricción *HindIII* ó con los enzimas *HindIII* y *EcoRI*.

15.- AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE ADN EN MEMBRANAS DE DEAE-CELULOSA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

Los fragmentos de ADN cortados se separaron electroforéticamente en geles de agarosa de unos 2 cm de espesor. Una vez localizado el fragmento de interés tras incubarlo en bromuro de etidio y visualizarlo con luz ultravioleta, se colocó un trozo de membrana de DEAE celulosa NA-45 activada justo delante de la banda a extraer. Entonces se continuó la electroforesis con objeto de transferir el ADN a la membrana, una vez ligado éste a la membrana, ésta se retiró del gel, se limpió de restos de agarosa y se colocó en un tubo eppendorf con 0,4 ml de tampón de elución. El tubo se incubó durante 1-2 h a 68°C. La solución de elución con el ADN se trató con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y a la fase acuosa libre de restos de agarosa se le añadió 1 ml de etanol absoluto (-20°C). La mezcla se incubó 5 horas a -20°C y el ADN se precipitó mediante centrifugación (12.000 rpm, 15 minutos). Tras drenar y secar el

precipitado al vacío, el ADN precipitado se resuspendió en 20 μ l de TE.

16.-LIGACIONES DE ADN.

Los fragmentos de ADN cortados se mezclaron en una proporción vector/inserto de 1:3. Al volumen obtenido se le añadió TE hasta alcanzar 17 μ l, 2 μ l de tampón de ligación 10 veces concentrado y 1 μ l de ligasa del fago T4 (Boehringer-Manheim, 1 unidad/ μ l). La mezcla de reacción se incubó de 8 a 14 horas a 10°C, si los extremos a unir eran romos, o a 15°C si eran cohesivos.

17.-SECUENCIACIÓN DE ADN.

17.1.-Secuenciación en cadena doble con el fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli*.

La secuenciación de ADN se llevó a cabo por el método de terminación de la extensión de cadena por didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977), siguiendo básicamente la modificación de la técnica como la describieron Hattori y Sakaki (1986). El gen a secuenciar se clonó en la orientación correcta en pTZ19. El plásmido recombinante se preparó a gran escala mediante el método del cloruro de cesio o a pequeña escala mediante preparaciones alcalinas. Tras sucesivas extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para que el ADN quede libre de proteínas, éste se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto (-20°C) y un décimo de volumen de

KAcF. El ADN se resuspendió en H₂O bidestilada y el volumen se ajustó de manera que la concentración fuese 2 µg en 18 µl. El ADN se desnaturalizó añadiendo a 18 µl de la suspensión anterior 2 µl de NaOH 2 N recién preparado. La desnaturalización completa se consiguió dejando la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente; se neutralizó añadiendo 2 µl de acetato amónico 2 M, pH 4,5 y, tras incubar 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 75 µl de etanol absoluto (-20°C) manteniéndose 15 minutos a -70°C. El ADN se precipitó por centrifugación (15 minutos a 12.000 rpm), el sobrenadante resultante de la centrifugación se decantó, el tubo se drenó y el precipitado se secó. Finalmente, el ADN desnaturalizado se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada.

A 3 µl de la preparación de ADN desnaturalizado se le añadieron sucesivamente 1 µl del cebador universal para secuenciación (concentración 2 µg/ml); 1,5 µl de tampón concentrado de Klenow y 6 µl de agua bidestilada. La muestra se calentó 15 minutos a 60°C y se dejó enfriar 15 minutos a temperatura ambiente. En la pared del tubo eppendorf se depositó 1 µl de ³⁵S-dATP (desoxiadenosina 5'-(α-³⁵S)tiotriofosfato, sal trietilamónica; 10 mCi/ml) y 0,5 µl del fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli*, los cuales se mezclaron por centrifugación (1 segundo, 12.000 rpm). Finalmente, se añadieron rápidamente 3 µl de solución de extensión conteniendo didesoxinucleótidos premezclados como se indica en la sección 5. La reacción de extensión se realizó a 42°C durante 20

minutos; para evitar las terminaciones inespecíficas se añadió 1 μ l de una mezcla de desoxinucleótidos a concentración saturante (0,5 mM de cada uno) y se incubó de nuevo a 42°C durante 20 minutos. Las muestras marcadas se pueden conservar hasta 24 horas a -20°C. Justo antes de cargar el gel de secuenciación a las muestras se les añadieron 4 μ l del tampón de muestra y las mezclas se calentaron 3 minutos a 95°C para conseguir la separación total de las cadenas. Aproximadamente 3 μ l de cada reacción se cargaron en geles de secuenciación y las cadenas con distinta extensión se separaron mediante electroforesis a corriente fija (31 mA) y voltaje variable (1.500 a 2.500 V). La separación de fragmentos de distinto tamaño en geles de 40 cm de longitud permitía leer entre 200 y 300 pares de bases.

17.2.-Secuenciación de cadena sencilla con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli*.

17.2.1.-Preparación de el fago auxiliar M13K07. Se extendió una preparación anterior de fago en medio sólido 2xYT y, sobre él, se sembró con agar blando, 0,5 ml de un cultivo de JM101 ó 71/18 con una turbidez a 660 mayor de 0,8. Tras incubar durante 6-12 horas a 37°C, aparecieron calvas aisladas que se pasaron mediante una pipeta Pasteur estéril a 10 ml de medio líquido 2xYT. Este cultivo se incubó entre 10 y 14 h a 37°C con muy buena aireación, centrifugándose repetidas veces (5 minutos a 12.062g) hasta eliminar todas las células presentes en el medio. El sobrenadante conteniendo los fagos

se recogió y se utilizó como fuente de fago ayudador durante un año, aproximadamente. Estas preparaciones presentaron un título del orden de $5 \cdot 10^{10}$ unidades formadoras de placas/ml.

17.2.2.-Preparación de cadenas sencillas del fragmento de ADN a secuenciar. Basicamente se utilizó el protocolo descrito por Maniatis *et al.*, 1982. *E. coli* 71/18 ó *E. coli* JM101 conteniendo un derivado de pTZ19, se cultivó a 37°C en medio líquido 2xYT suplementado con 0,001 % (p/v) de tiamina y 150 μ g/ml de ampicilina hasta una turbidez de 0,5-0,8 a 660 nm. 2 ml de este cultivo se transfirieron a matraces de 50 ml de capacidad y se infectaron con el fago M13K07 con un factor de multiplicidad de infección de 10 (se asume que un cultivo de *E. coli* con una $D.O_{660} = 1$ contenía aproximadamente $8 \cdot 10^8$ células). Tras 5 minutos a temperatura ambiente para facilitar la adsorción del fago, el cultivo se incubó a 37°C durante una hora con agitación vigorosa (al menos 200 rpm en un incubador orbital modelo Gallekcam). 200 μ l de las células infectadas se transfirieron a un matraz de 100 ml de capacidad conteniendo 5 ml de medio 2xYT y se cultivaron a 37°C durante 14-18 horas. Alícuotas de 1,5 ml de los cultivos se transfirieron a tubos eppendorfs y se centrifugaron 10 minutos a 12.000 rpm, los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos de centrífuga repitiéndose la centrifugación para evitar cualquier contaminación con células. A los últimos sobrenadantes se le añadieron 200 μ l de PEG/NaCl, se mezclaron invirtiendo los tubos y,

éstos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15-30 minutos. Las mezclas se centrifugaron 10 minutos a 12.000 rpm descartándose los sobrenadantes. Los precipitados blanquecinos conteniendo los fagos se resuspendieron en 100 μ l de TE. Las suspensiones se desproteinizaron tratándolas varias veces con 100 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y, finalmente, a las suspensiones de ADN se le añadieron 200 μ l de etanol absoluto (-20°C) y 10 μ l de KAcF. Tras incubar durante dos horas a -70°C los ADNs se precipitaron por centrifugación. Los precipitados se resuspendieron en 50 μ l de TE. En cada reacción de secuenciación se utilizaron 7,5 μ l de una preparación de ADN. El procedimiento de dicha reacción es idéntico al descrito anteriormente en la sección 17.1 a partir de la adición del cebador.

17.3.-Secuenciación en cadena doble con ADN polimerasa del fago T7.

La preparación del ADN y su desnaturalización es idéntica a la descrita en la sección 17.2; sin embargo, la cebación se realizó de la siguiente forma. A 5 μ l de la preparación de ADN desnaturalizado se le añadieron 3 μ l de cebador universal y 2 μ l de tampón de extensión concentrado, la mezcla se calentó 2 minutos a 65°C, y se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente, manteniéndose al menos 30 minutos en dichas condiciones. La reacción de extensión es muy rápida por lo que se hicieron todos los pasos con celeridad. A cada tubo conteniendo la mezcla de ADN desnaturalizado con el

cebador, se le añadieron en la pared 1 μ l de DTT 100 mM, 2 μ l de la mezcla de nucleótidos de extensión (página 33) y 0,5 μ l de ^{35}S -dATP. Los tubos se centrifugaron para conseguir la mezcla (1 segundo, 12.000 rpm) y a continuación se añadieron 2 μ l de ADN polimerasa del fago T7 (13 unidades/ μ l) diluída un octavo en TE frío (esta dilución se realiza justo antes de iniciar la reacción). La mezcla se incubó 4 minutos a temperatura ambiente, y se repartieron en 4 alícuotas de 3,5 μ l que se depositaron en 4 tubos precalentados a 37°C, cada uno de los cuales contenía 2 μ l de cada una de las cuatro mezclas de didesoxinucleótidos y desoxinucleótidos (página 33). Tras incubar a 37°C durante 4 minutos la reacción se detuvo mediante la adición de 4 μ l de tampón de muestra para geles de acrilamida. Entonces, las muestras se hirvieron para separar las cadenas y se procedió a la separación electroforética de los fragmentos en geles de poliacrilamida-urea; este procedimiento permitía leer en geles de 40 cm de longitud entre 300 y 400 pares de bases.

18.-PREPARACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA REALIZACIÓN DE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

Los oligonucleótidos se sintetizaron en un sintetizador de oligonucleótidos (Applied Biosystem) en el laboratorio del Dr. McCarthy durante mi estancia en el Centro Nacional de Biotecnología (GBF) en Braunschweig (Alemania), y se purificaron de acuerdo con el protocolo que pasaré a detallar recomendado por el fabricante del

aparato. Al oligonucleótido sintetizado disuelto en 2 ml de hidróxido amónico (33 %, v/v) se le añadió 1 ml de agua destilada. La muestra se filtró a través de una columna de purificación del tipo "Oligonucleotide Purification Cartridge" (Applied Biosystem) preequilibrada con 6 ml de acetonitrilo (grado HPLC) y 5 ml de acetato de trietilamina 2 M. Luego, se cargó la solución con el oligonucleótido y la columna se lavó utilizando secuencialmente 15 ml de hidróxido amónico al 10 % (v/v), 10 ml de agua desionizada, 10 ml de ácido trifluoroacético al 2 % (p/v), y 10 ml de agua desionizada. Finalmente, el oligonucleótido se eluyó con 3 ml de acetonitrilo y el disolvente se eliminó utilizando un rotavapor. El sedimento conteniendo el oligonucleótido purificado se disolvió en 1 ml de agua destilada y se determinó su concentración midiendo la densidad óptica a 260 nm ($D.O._{260} = 1$ equivale a $50 \mu\text{g}$ de ADN). La muestra es estable a -20°C .

19.-MUTAGÉNESIS DIRIGIDA CON OLIGONUCLEÓTIDOS.

La mutagénesis dirigida de ADN con oligonucleótidos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Kunkel *et al.*, 1987, con las modificaciones de Víctor de Lorenzo (comunicación personal).

19.1.-Preparación de cadenas sencillas de ADN enriquecidas en uracilos.

Para preparar ADN de cadenas sencillas enriquecidas en uracilo, se transformaron los derivados de pTZ19 portando el inserto

de interés en la orientación correcta en la cepa de *E. coli* CJ236. Esta cepa presenta dos mutaciones: la mutación *dut*, que produce una deficiencia en la enzima desoxiuridin-5'-trifosfato fosfatasa, que convierte el desoxiuridin-5'-trifosfato en desoxiuridin-5'-monofosfato, con lo que se aumenta la concentración intracelular de desoxiuridin-5'-trifosfato, y la mutación *ung*, cuyo fenotipo es una deficiencia en la enzima uracil-N-glicosidasa, la cual elimina los residuos de uracilos que se incorporan por error al ADN. La cepa con estas dos mutaciones sintetiza ADN en el que algunas de sus desoxitimidinas se encuentran sustituidas por desoxiuracilos. A 0,5 ml de un cultivo en fase estacionaria de CJ236 con el derivado de pTZ19 se le añadieron 10-50 μ l de un preparado de M13K07 (concentración aproximada 10^{11} unidades formadoras de calvas/ml) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para facilitar la adsorción del fago, luego, se añadieron 15 ml de medio de cultivo 2xYT suplementado con 200 μ g/ml de ampicilina. El cultivo se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación vigorosa. La preparación de cadenas sencillas de ADN se realizó como se ha descrito anteriormente en la sección 17.2.2, excepto que el paso de tratamiento con fenol se realizó como sigue: primero se trataron las muestras dos veces con fenol ácido, al menos 4 veces con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y finalmente 3 veces con cloroformo-alcohol isoamílico. Según nuestra experiencia cuando mejor es la eliminación de proteína, mayor es la eficiencia de la mutagénesis posterior.

19.2.-Fosforilación del oligonucleótido.

La fosforilación del oligonucleótido utilizado para la mutagénesis se realizó utilizando para cada reacción: 2 μ l de tampón kinasa concentrado; 2 μ l del oligonucleótido (aproximadamente 300 ng); 0,5 μ l de ATP 0,1 M pH 7,0; 15,5 μ l de H₂O destilada y 1 μ l de ADN-polinucleótido kinasa del fago T4. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora y se detuvo transfiriendo los tubos a 15°C durante 10 minutos.

19.3.-Extensión de las cadenas sencillas.

El oligonucleótido fosforilado y complementario a las cadenas sencillas de ADN enriquecidas en desoxiuracilos se utilizó como cebador. A cada mezcla de reacción de fosforilación de los oligonucleótidos se le añadieron 3 μ l de ADN de cadena sencilla enriquecida en desoxiuracilos (aproximadamente 1 μ g) y 1,3 μ l de SSC concentrado. Las mezclas se incubaron 2 minutos a 70°C y se dejaron enfriar lentamente hasta temperatura ambiente, los tubos se transfirieron a un baño con hielo y se mantuvieron durante 15 minutos. Para realizar las extensiones se añadió a cada mezcla: 10 μ l de tampón de extensión, 2 μ l de una mezcla equimolar de los cuatro deoxinucleótidos a concentración 25 mM, 1 μ l de ATP 0,1 M, pH 7,0, 2,5 unidades de ADN polimerasa del fago T4, 2 unidades de ADN ligasa del fago T4 y agua bidestilada hasta 100 μ l. La mezcla de reacción se incubó 5 minutos a 10°C, 5 minutos a temperatura ambiente y 2 horas a 37°C. La reacción se detuvo con 6 μ l de EDTA

0,25 M, pH 8,0. Para comprobar la extensión, se cargó un gel de agarosa con 10 μ l de cada reacción y, tras la electroforesis con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) en TBE, se visualizó el ADN. Como testigo de la extensión, se utilizó una mezcla de reacción en la que se había omitido el cebador. Generalmente, el ADN de cadena doble aparece en una posición retrasada con respecto al ADN de cadena sencilla.

50 μ l de las extensiones satisfactorias se transformaron en la cepa *dut*⁺, *ung*⁺ de *E. coli* 71/18, donde se favorece el mantenimiento de las cadena extendidas y, por tanto, portadoras de las mutaciones deseadas. Las colonias aisladas de cada mutagénesis se utilizaron para comprobar la mutación introducida mediante secuenciación del ADN transformado.

RESULTADOS

1.-CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES PUNTUALES DE xy/S.

Previo al inicio de este trabajo, se habían aislado ocho mutantes de *xy/S* (Ramos *et al.*, 1986 y Ramos *et al.*, 1990a), los cuales se seleccionaron en base a la capacidad de la proteína reguladora mutante de estimular la transcripción desde el promotor de la ruta *meta* (Pm), en presencia de derivados del ácido benzoico que no eran efectores de la proteína silvestre. En la Tabla 3, se relacionan los distintos alelos con el benzoato que se usó para su selección.

1.1.-Secuenciación de los mutantes de xy/S.

La secuencia nucleotídica de las mutaciones *xy/S2*, *xy/S4*, *xy/S241* y *xy/S352* era conocida (Ramos *et al.*, 1986), y en este trabajo se ha procedido a la secuenciación del resto de los mutantes, utilizando el método de ADN en cadena doble con el fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli* descrito en la sección 17.1 en Materiales y Métodos.

TABLA 3. Mutaciones puntuales en distintos alelos del gen *xyIS*.

| Alelo | Codón | | Cambio es- perado de aminoácido | Benzoato usado en el aislamiento |
|----------------|--------|----------|---------------------------------------|--|
| | Número | Cambio | | |
| <i>xyIS2</i> | 45 | AGG->ACG | Arg-->Thr | 2OH |
| <i>xyIS4</i> | 45 | AGG->ACG | Arg-->Thr | 4EB |
| <i>xyIS12</i> | 152 | CGA->CTA | Arg-->Gly | 2MeB |
| <i>xyIS13</i> | 41 | CGC->CAC | Arg-->His | 3MeB |
| <i>xyIS14</i> | 288 | GAC->GTC | Asp-->Val | 4MeB |
| <i>xyIS241</i> | 88 | TGG->TTG | Trp-->Leu | 2,4DMB |
| <i>xyIS254</i> | 155 | CTC->TTC | Leu-->Phe | 2,5DMB |
| <i>xyIS352</i> | 256 | CCG->CGG | Pro-->Arg | 3,5DCB |

Se indican los alelos mutantes, los cambios encontrados con respecto a la secuencia del gen *xyIS*, sus correspondientes cambios en la secuencia primaria de las proteínas mutantes y el derivado del ácido benzoico que se utilizó para su aislamiento.

Las abreviaturas usadas para los derivados de los benzoatos son: DCB, diclorobenzoato; DMB, dimetilbenzoato; EB, etilbenzoato; MeB, metoxibenzoato y OHB, hidroxibenzoato.

Para cada alelo mutante se secuenciaron 1.500 pares de bases que incluían la secuencia completa que codifica el regulador XylS. Para determinar la secuencia de los alelos mutantes, distintos fragmentos de éstos se clonaron en los plásmidos pUC18 y pUC19. Los fragmentos utilizados para secuenciar se generaron utilizando las siguientes restrictasas: *SphI*, *SphI-HindIII*, *BglII-BamHI*, *BglII-NcoI*, *EcoRI-NcoI* y *Nco-HindIII*. La Figura 12 muestra el patrón de restricción del gen *xyIS* y la Figura 13 la estrategia utilizada en la secuenciación. Las Figuras 14 y 15 muestran respectivamente la secuencia de nucleótidos del gen silvestre y de aminoácidos de la proteína silvestre.

En la Tabla 3 se resumen los cambios encontrados en la secuencia de ADN de los alelos mutantes y los cambios esperados en las proteínas mutantes. Como se observa en esta tabla, en todos los casos se encontraron mutaciones puntuales que cuando se traducían daban lugar a cambios sencillos en la secuencia primaria de aminoácidos de los reguladores mutantes.

Las secuencias nucleotídicas de los mutantes *xyIS2* y *xyIS4*, eran idénticas a pesar de que en sus aislamientos se utilizó, 2-hidroxí- y 4-etilbenzoato, respectivamente (Ramos *et al.*, 1986 y 1987a). En este trabajo se utilizó el alelo aislado como *xyIS2*.

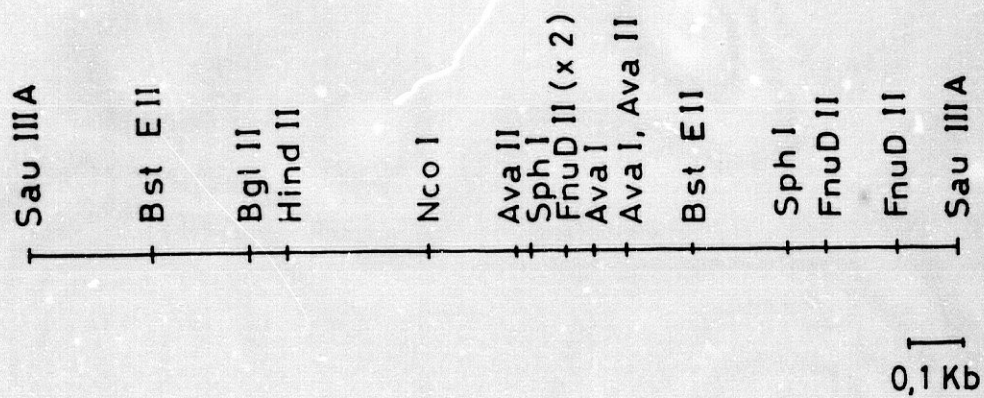


FIGURA 12. Patrón de restricción del gen *xylS*. Se representan las enzimas que cortan dentro del fragmento *Sau*III A de 1,7Kb que contiene el gen *xylS*.

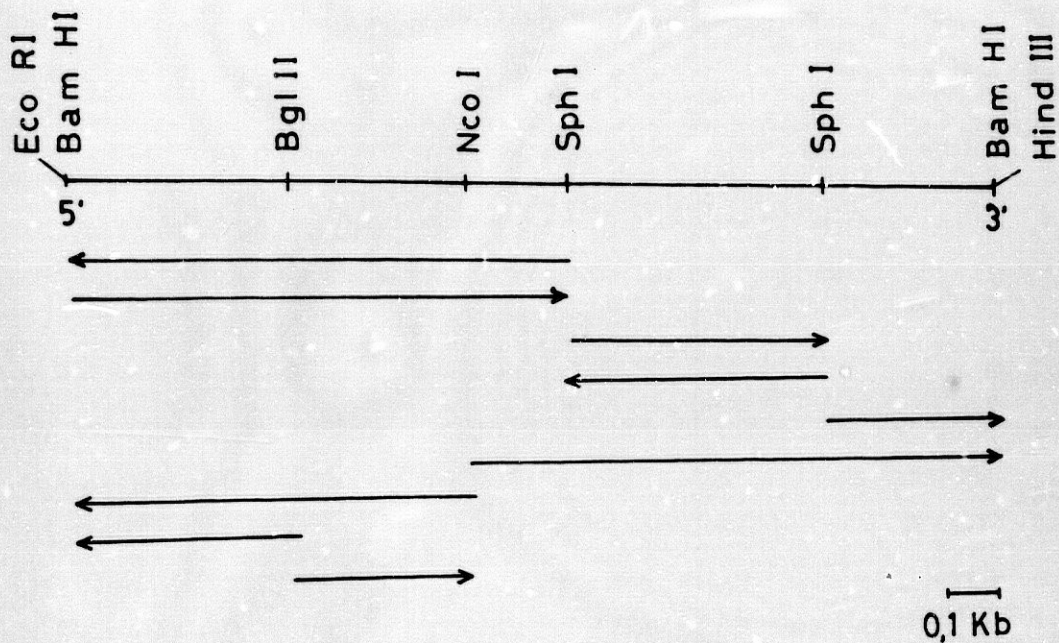


FIGURA 13. Estrategia de clonación para la secuenciación del gen *xy1S* y sus alelos mutantes. Se representan los sitios de corte usados para subclonar el gen *xy1S* en pUC18/19. Las flechas indican la extensión de los subclones y la dirección de lectura de bases de los mismos. Los sitios *EcoRI* y *HindIII* pertenecen a los vectores de clonación.

1 GATCCCCTTT ATCCGCCAAT TCGTCGCCGA TGCCCCGACA GCACGAACTT
 51 **CTGGTGTCT** CGCTTCTTAA AAAGAACGTC TTCGTTCTGC TTGGCGTTAT
 101 **TTTTGCTTGG** AAAAGTGGTC ACTGATTGCA AAAAGGATGG CGCAACGTGG
 151 CAATGGGGGT AACCGTATAC GCATCACGTC GAGATGCATT TTCATCGACT
 201 TGGCGCCTTT CTACATCACA CCAAGCAGCC CACATTAATA TAAGAGAACC
 251 GTGAACTATG GATTTTGTCT TATTGAACGA GAAAAGTCAG ATCTTCGTCC
 301 ACGCCGAGCC CTATGCAGTC TCCGATTATG TTAACCAGTA TGTCGGTACG
 351 CACTCTATTC GCCTGCCCAA GGGCGGGCGC CCGGCAGGCA GGCTGCACCA
 401 CAGAATCTTC GGATGCCTCG ACCTGTGTCG AATCAGCTAC GGCGGTAGCG
 451 TGAGGGTAAT CTCGCCTGGA TTAGAGACCT GTTATCATCT GCAAATAATA
 501 CTCAAAGGCC ATTGCCTGTG GCGTGGCCAT GGCCAGGAGC ACTATTTTGC
 551 GCCGGGCGAA CTATTGCTGC TCAATCCGGA TGACCAAGCC GACCTGACCT
 601 ATTCAGAAGA TTGCGAGAAA TTTATCGTTA AATTGCCCTC AGTGGTCCTT
 651 GATCGGGCAT GCAGTGACAA CAATTGGCAC AAGCCGAGGG AGGGTATCCG
 701 TTTCCCGCG CGACACAATC TCCAGCAACT CGATGGCTTT ATCAATCTAC
 751 TCGGGTTAGT TTGTGACGAA GCGGAACATA CAAAGTCGAT GCCTCGGGTC
 801 CAAGAGCACT ATGCGGGGAT CATCGCTTCC AAGCTGCTCG AAATGCTGGG
 851 CAGCAATGTC AGCCGTGAAA TTTTCAGCAA AGGTAACCCG TCTTTCGAGC
 901 GAGTCGTTCA ATTCATTGAG GAGAATCTCA AACGGAATAT CAGCCTTGAG
 951 CGGTTAGCGG AGCTGGCGAT GATGAGTCCA CGCTCGCTCT ACAATTTGTT
 1001 CGAGAAGCAT GCCGGCACCA CGCCGAAGAA CTACATCCGC AACCGCAAGC
 1051 TCGAAAGCAT CCGCGCCTGC TTGAACGATC CCAGTGCCAA TGTGCGTAGT
 1101 ATAACTGAGA TAGCCCTAGA CTACGGCTTC TTACATTTGG GACGCTTCGC
 1151 TGAAACTAT AGGAGCGCGT TCGGCGAGTT GCCTTCCGAC ACCCTGCGTC
 1201 AATGCAAAA GGAAGTGGCT TGATTACGAA CGTAGCCGAA GAAGGG

FIGURA 14. Secuencia primaria del alelo silvestre, *xy1S*, del plásmido pW0. La secuencia se determinó independientemente en tres laboratorios: Inouye et al., 1986 ; Mermoud et al., 1987; Spooner et al., 1986. Los nucleótidos marcados en negrita corresponden a la región del promotor de *xy1S* (Ps). El codón ATG con subrayado doble indica el punto de iniciación de la traducción, el cual está precedido por una secuencia de Shine-Dalgarno, subrayada simple. El codón de parada de la traducción se indica también con subrayado doble.

1 MDFCLLNEKS QIFVHAEPYA VSDYVNQYVG THSIRLPKGG RPAGRLHHRI
51 FGCLDLCRIS YGGSVRVISP GLETCYHLQI ILKGHCLWRG HGQEHYFAPG
101 ELLLLNPDDQ ADLTYSEDCE KFIVKLPSVV LDRACSDNNW HKPREGIRFA
151 ARHNLQQLDG FINLLGLVCD EAEHTKSMPR VQEHYAGIIA SKLLEMLGSN
201 VSREIFSKGN PSFERVVQFI EENLKRNISL ERLAELAMMS PRSLYNLFEK
251 HAGTTPKNYI RNRKLESIRA CLNDPSANVR SITEIALDYG FLHLGRFAEN
301 YRSAFGELPS DTLRQCKKEV A

FIGURA 15. Estructura primaria de la proteína XylS codificada por pWW0. Para nombrar los aminoácidos se ha utilizado el código internacional que utiliza una sola letra para cada aminoácido. La estructura primaria se obtuvo traduciendo la secuencia de nucleótidos del gen *xylS* tras analizar las posibles fases de lectura abierta y el tamaño de la proteína determinado por Inouye et al., 1986; Mermod et al., 1987; Spooner et al., 1986).

Para denominar a las proteínas mutantes, se usó la siguiente nomenclatura: se indica primero la proteína, XylS, seguida del aminoácido cambiado que presenta y la posición de dicho cambio; por ejemplo, el alelo *xy/S2* codifica la proteína XylSThr45, lo que indica que la posición 45 ha cambiado a Thr, en lugar de la Arg presente en la secuencia silvestre.

1.2.-Perfil de efectores de las proteínas mutantes de XylS.

Con objeto de determinar si el reconocimiento de nuevos efectores por los mutantes de la proteína XylS conducía a una alteración de las interacciones regulador/efector, se determinó el perfil de efectores de las proteínas mutantes mediante la capacidad de éstas para estimular la transcripción desde Pm utilizando fusiones Pm::*lacZ* y midiendo actividad β -galactosidasa. La cepa de *E. coli* 5K portando el plásmido pJLR107 (Pm::*lacZ*) se transformó con los plásmidos pERD2, pERD12, pERD13, pERD14, pERD241, pERD254 y pERD352, que codifican las proteínas XylSThr45, XylSGly152, XylSHis41, XylSVal288, XylSLeu88, XylSPhe155 y XylSArg256, respectivamente. La actividad β -galactosidasa expresada desde Pm se determinó en ausencia y en presencia de 34 benzoatos que se añadían al medio de cultivo para alcanzar una concentración final de 1 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

En base a los perfiles de efectores se distinguieron tres grupos de mutantes. El primer grupo incluye un solo mutante, XylSThr45.

Este mutante reconoce una gama de efectores más amplia que la proteína silvestre (Tabla 4). Por ejemplo, la proteína mutante reconoce como efectores los siguientes benzoatos que no son reconocidos por el regulador silvestre: 2,4-dimetil-; 4-etil-; 2,6-difluor-; 2- y 4-bromo-; 2- y 4-yodo-; 2-hidroxi-; 2-, 3- y 4-metoxibenzoato. Asimismo los niveles de inducción (medidos como proporción de unidades β -galactosidasa en presencia de los distintos benzoatos en el medio de cultivo respecto al nivel basal) eran más altos que los mediados por la proteína silvestre, incluyendo: benzoato; 2- y 4-metil-; 2-, 3- y 4-fluor-; 4-cloro-; 3,4-dicloro- y 3-yodobenzoato.

El segundo grupo está formado por el mutante XylSLeu88, codificado por el alelo *xy/S241*. La principal característica de este mutante es su capacidad para mediar altos niveles de expresión desde P_m en ausencia de efectores. De hecho, los niveles de expresión basal mediados por XylSLeu88 en *E. coli* 5K (pJLR107) fueron de 6 a 8 veces más altos que el nivel basal mostrado por el alelo silvestre, *xy/S*. Sin embargo es de interés señalar que esta proteína estimulaba niveles más altos de transcripción desde P_m, si al cultivo se añadía benzoato o alguno de sus derivados como, por ejemplo, 2-metil-; 3,4-dimetil- y 2-hidroxibenzoato. También, el 2,4-dimetilbenzoato, compuesto utilizado para el aislamiento de este mutante, permitía incrementar 3 veces el nivel de expresión en la fusión P_m::*lacZ*. 4-etil- y 2,4-diclorobenzoato, que no son efectores de la proteína silvestre, eran efectores de XylSLeu88 (Tabla 4).

TABLA 4. Perfil de efectores del regulador XylS y sus mutantes.

| β -galactosidasa (nivel de inducción) | | | | | | | | |
|---|------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|
| Pm::lacZ + | | | | | | | | |
| Proteínas mutantes | | | | | | | | |
| Efactor | XylS | Thr45 | Leu88 | Gly152 | His41 | Val288 | Phe155 | Arg256 |
| Ninguno | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Benzoato | 12 | 17 | 3 | 7 | 10 | 11 | 7 | 12 |
| 2MB | 18 | 29 | 4 | 2 | 2 | 7 | 14 | 10 |
| 3MB | 17 | 14 | 2 | 5 | 15 | 19 | 12 | 14 |
| 4MB | 4 | 12 | 3 | 3 | 8 | 5 | 21 | 3 |
| 2,3DMB | 10 | -- | -- | 4 | 2 | 18 | 4 | -- |
| 2,4DMB | 1 | 5 | 3 | 3 | 1,5 | 5 | 2 | 1 |
| 2,5DMB | 1 | -- | -- | -- | -- | 6 | 13 | 1 |
| 3,4DMB | 5 | -- | 5 | 5 | 1 | 7 | 4 | -- |
| 3,5DMB | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| 4EB | 1 | 15 | 2,5 | 1 | 1,5 | 1 | 2 | 1 |
| 2FB | 4 | 15 | 2 | 1 | 1 | 9 | 2 | 4 |
| 3FB | 8 | 16 | 3 | 4 | 2 | 14 | 7 | 7 |
| 4FB | 4 | 14 | 3 | 4 | 1 | 9 | 2 | 5 |
| 2,6DFB | 1 | 5 | -- | 1 | 1 | -- | 1 | -- |
| 2CB | 14 | 18 | 4 | 9 | 5 | 4 | 3 | 3 |
| 3CB | 11 | 12 | 2 | 10 | 12 | 22 | 8 | 6 |
| 4CB | 5 | 17 | 4 | 5 | 2 | 9 | 26 | 1 |
| 2,4DCB | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 2,5DCB | 1 | -- | -- | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2,6DCB | 1 | 1 | 1 | 1 | 1,5 | 1 | 1 | 1 |
| 3,4DCB | 4 | 12 | 1 | 1 | 1 | -- | 1 | 2 |
| 3,5DCB | 1 | -- | 1 | 1 | 1,5 | 1 | 1 | 3 |
| 2BrB | 1 | 7 | 1 | 2 | 1,5 | 1 | 1 | -- |
| 3BrB | 12 | 11 | 1 | 5 | 12 | 14 | 7 | -- |
| 4BrB | 1 | 14 | 1 | 5 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| 2IB | 1 | 5 | 1 | 1 | 1 | -- | 1 | 1 |

| | | | | | | | | |
|------|-----|----|----|-----|-----|----|---|----|
| 3IB | 5 | 9 | 1 | 2 | 1 | -- | 1 | 2 |
| 4IB | 1 | 9 | 1 | 1 | 1 | -- | 1 | 1 |
| 2OHB | 1,5 | 26 | 5 | 1,5 | 2 | -- | 2 | -- |
| 3OHB | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | -- |
| 4OHB | 1 | 1 | 2 | 1 | 1,5 | -- | 1 | -- |
| 2MeB | 1 | 17 | -- | 2 | 1,5 | 1 | 2 | -- |
| 3MeB | 1 | 8 | -- | 4 | 2,5 | 2 | 3 | -- |
| 4MeB | 1 | 23 | -- | 2 | 2 | 2 | 2 | -- |

E. coli 5K con el plásmido pJLR107 (Pm::lacZ) se transformó con los siguientes derivados de pKT231: pNM185, pERD2, pERD241, pERD12, pERD13, pERD14, pERD254 y pERD352, que portan los alelos que codifican las proteínas: XylS, XylSThr45, XylSLeu88, XylSGly152, XylSHis41, XylSVal288, XylSPhe155 y XylSArg256, respectivamente. Las cepas resultantes se cultivaron hasta fase exponencial tardía en LB con ampicilina y kanamicina. Ulteriormente, los cultivos se diluyeron 100 veces en el mismo medio suplementado ó no con 1 mM del benzoato que se indica y se incubaron 5 horas a 30°C con agitación, ensayándose entonces la actividad β -galactosidasa como se ha descrito en la sección 1.6 de Materiales y Métodos. Los valores de actividad β -galactosidasa representan el número de veces que la actividad enzimática fué más alta (nivel de inducción) que el valor basal (actividad en ausencia de efector). Los valores basales fueron para XylS, XylSThr45, XylSLeu88, XylSGly152, XylSHis41, XylSVal288, XylSPhe155 y XylSArg256 140, 280, 750, 260, 160, 145, 150 y 190 unidades de Miller, respectivamente. Las abreviaturas usadas son: BrB, bromobenzoato; CB, clorobenzoato; DCB, diclorobenzoato; DFB, difluorobenzoato; DMB, dimetilbenzoato; EB, etilbenzoato; FB, fluorobenzoato; IB, yodobenzoato; MB, metilbenzoato; MeB, metoxibenzoato; y, OHB, hidroxibenzoato.

El tercer grupo de reguladores mutantes está formado por las proteínas XylSGly152, XylSHis41, XylSVal288, XylSPhe155 y XylSArg256. Todas tienen un espectro de efectores relajado con respecto al de la proteína silvestre, es decir, son capaces de estimular la transcripción desde Pm en presencia de derivados de benzoato a los que la proteína silvestre no reconoce como efectores, pero los niveles de inducción fueron, en general, relativamente bajos con respecto a los obtenidos con la proteína mutante componente del primer grupo, XylSThr45.

El mutante XylSGly152 reconoce como efectores 2,4-dimetil-; 2- y 4-bromo- y 2-, 3- y 4-metoxibenzoato, compuestos que no son efectores de la proteína silvestre. En contraste, esta proteína mutante perdió la capacidad de reconocer 2-fluor- y 3,4-diclorobenzoato, efectores del regulador silvestre, aunque conservaba la capacidad de reconocer otros efectores, por ejemplo 2-, 3- y 4-metilbenzoato.

El mutante XylSHis41 mostró niveles de inducción mayores que la proteína silvestre con 3-metoxibenzoato pero perdió la capacidad silvestre de inducir en presencia de 2- y 4-fluor-; 3,4-dicloro- y 3-yodobenzoato, aunque conservaba la capacidad de reconocer todos los monometilbenzoatos que eran efectores de XylS (Tabla 4).

El mutante XylSVal288 presentó niveles de inducción mayores que el silvestre con los compuestos que se detallan a continuación: 2,3-, 2,4- y 2,5-dimetil-; 2-, 3- y 4-fluor-; 3-cloro-; 4-bromo-; 3- y 4-

metoxibenzoato. Es de interés resaltar que los valores de inducción con estos efectores fueron, en general, moderados, entre 2 y 9 veces con respecto al nivel basal. Los niveles de inducción con efectores como 2-, 3- y 4-metilbenzoato fueron similares a los de XylS.

El mutante XylSPhe155 presentaba niveles de activación más elevados que la proteína silvestre con 4-metil-; 2,4- y 2,5-dimetil-; 4-cloro-; 2,4-dicloro-; 3-hidroxi- y 2-, 3- y 4-metoxibenzoato. Este regulador, al igual que XylSGly152 y XylSHis41, ha perdido la capacidad de reconocer 3,4-diclorobenzoato como efector.

Por último, el mutante XylSArg256 presentaba niveles de inducción desde Pm más elevados que XylS cuando el medio de cultivo se suplementaba con benzoatos disustituídos en las posiciones 3 y 5, tanto con grupos metilo como con átomos de cloro, aunque perdió la capacidad de inducir Pm con 4-clorobenzoato como efector.

1.3.-Actividad β -galactosidasa expresada desde Pm y mediada por XylS y los mutantes puntuales: Cinéticas de inducción.

Una característica de la inducción mediada por XylS activado por sus efectores, es el largo periodo que se requiere para alcanzar los niveles máximos de expresión. Este efecto se había observado ensayando tanto actividades enzimáticas de la ruta *meta* del plásmido TOL en *P. putida* -por ejemplo, actividad catecol 2,3 dioxigenasa- como determinando actividad β -galactosidasa con fusiones Pm::lacZ,

con *xyIS* en *cis* o en *trans*, en *P. putida* y en *E. coli* (Mermod *et al.*, 1987, Ramos *et al.*, 1988. Abril *et al.*, 1989).

Con objeto de estudiar la expresión desde Pm en el tiempo, cultivos de *E. coli* 5K (pJLR107) portando *xyIS* en pNM185 y los alelos mutantes clonados en pKT231, se diluyeron 100 veces y, tras añadir diversos análogos de benzoatos a concentración 1 mM, se determinó la variación de los niveles de actividad β -galactosidasa con el tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 16.

La Figura 16 A muestra los resultados que se obtuvieron con 3-metilbenzoato, un efector común para la proteína silvestre y para las mutantes. Se observó que los distintos reguladores con 3-metilbenzoato estimulaban la transcripción desde Pm de manera similar, alcanzándose los niveles máximos de actividad β -galactosidasa tras 6 horas de inducción.

La Figura 16 B muestra un experimento similar salvo que se utilizó como inductor el análogo de benzoato con el que se habían aislado los distintos mutantes. En la figura se observan dos tipos de cinéticas de inducción. La inducción del mutante XylSThr45 por 2-hidroxibenzoato que era similar a las observadas con 3-metilbenzoato, y la de los otros mutantes con sus respectivos análogos (XylSLeu88 con 2,4-dimetilbenzoato; XylSGly152 con 2-metoxibenzoato; XylSHis41 con 3-metoxibenzoato; XylSVal288 con 4-metoxibenzoato; XylSPhe155 con 2,5-dimetilbenzoato y XylSArg256 con 3,5-diclorobenzoato) que mostraban un retraso inicial de más de una hora,

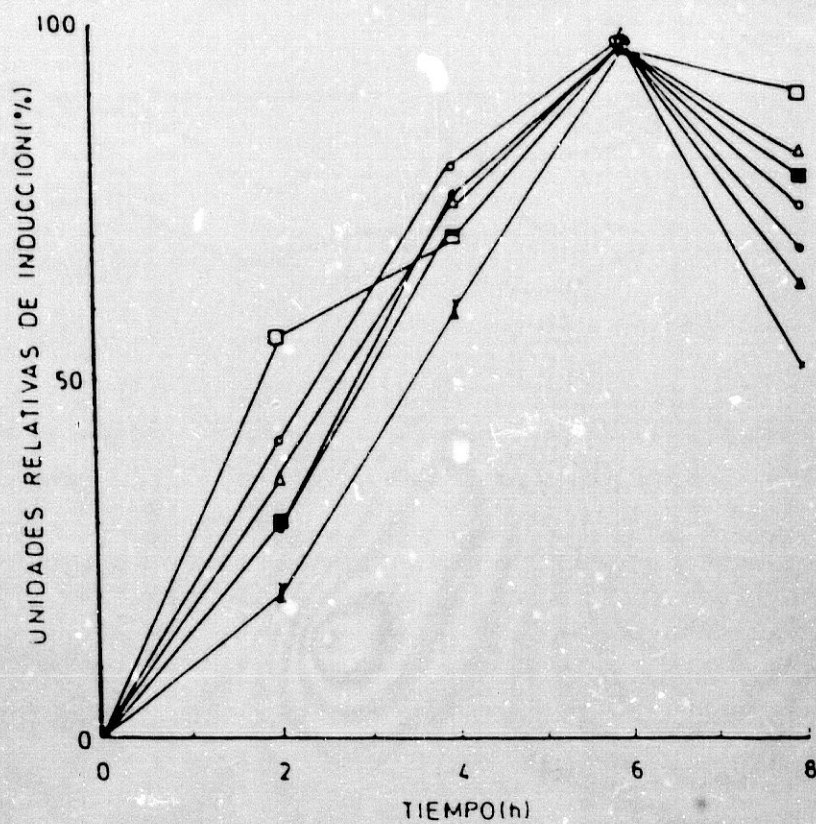
aunque los niveles máximos de inducción se alcanzaron también tras 6 horas de inducción.

1.4.-Afinidad aparente in vivo (K') de XylS y sus mutantes por benzoatos.

Aparentemente *E. coli* no posee un mecanismo de transporte activo de benzoato o sus análogos, sino que estos compuestos alcanzan un equilibrio rápido entre sus concentraciones fuera y dentro de la célula, sugiriendo esto un mecanismo de difusión facilitada (Thayer y Wheelis, 1982, y Dr. S. Harayama, Universidad de Ginebra, Suiza, comunicación personal). Con esta premisa, se midió la actividad β -galactosidosa de cultivos de *E. coli* 5K (pJLR107) con el alelo *xy/S* silvestre y los distintos mutantes clonados en pKT231 a diferentes concentraciones de los diversos benzoatos en el medio. La Figura 17 muestra el comportamiento de los distintos alelos de *xy/S* en presencia de distintas concentraciones de 3-metilbenzoato.

La representación de los valores de actividad obtenidos, tanto con la proteína silvestre como con las mutantes, se ajusta a una curva de tipo hiperbólico. En el caso del regulador silvestre la inducción semimáxima se alcanzaba a concentración 350 μ M (entre 325 y 395 μ M en 6 determinaciones independientes). La Figura 17 muestra los resultados de uno de estos experimentos. Con benzoato, 2- y 4-metil-

A



B

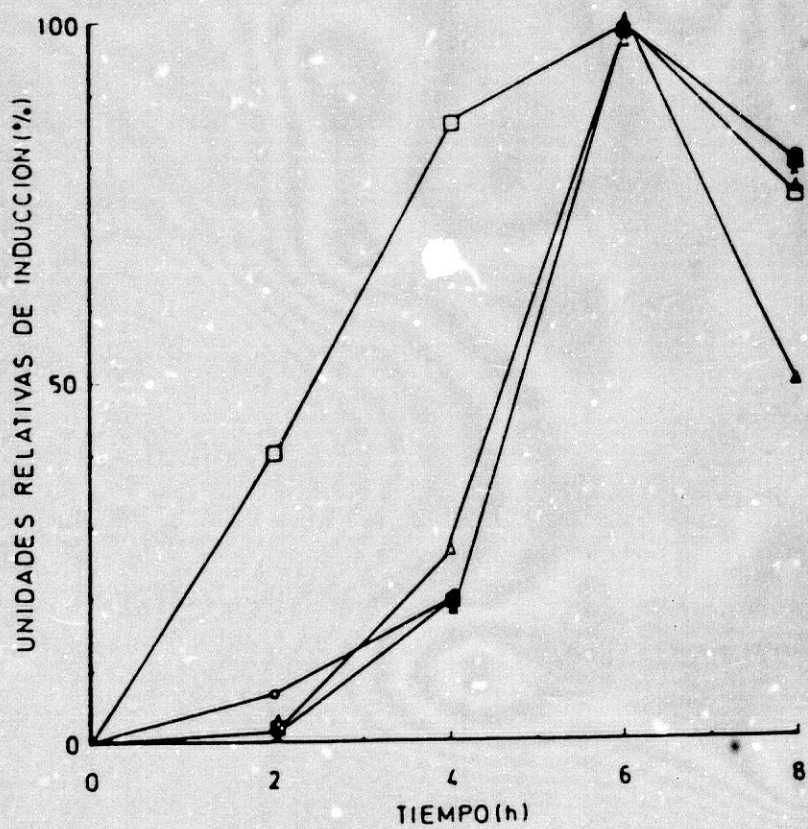


FIGURA 16. Expresión de actividad β -galactosidasa desde Pm con el tiempo mediada por XylS y los mutantes descritos en este capítulo con 3-metilbenzoato (A) y con sus efectores específicos (B). *E. coli* 5K portando el plásmido pJLR107 se transformó con derivados de pKT231 que codifican para las proteínas XylS (○), XylSThr45 (□), XylSGly152 (Δ), XylSHis41 (●), XylSVal288 (■), XylSPhe155 (▲) y XylSArg256 (+). Los transformantes se cultivaron en LB suplementado con ampicilina y kanamicina hasta fase logarítmica tardía. Los cultivos se diluyeron 100 veces en el mismo medio (tiempo 0) y se suplementaron con los distintos benzoatos a concentración 1mM. Los cultivos de la Figura A se suplementaron con 3-metilbenzoato y los de la Figura B con 2-hidroxibenzoato para XylSThr45; 2-metoxibenzoato para XylSGly152; 3-metoxibenzoato para XylSHis41; 4-metoxibenzoato para XylSVal288; 2,5-dimetilbenzoato para XylSPhe155 y 3,5-dimetilbenzoato para XylSArg256. A los tiempos indicados, se midió la actividad β -galactosidasa según el método descrito en la sección 1.6 de Materiales y Métodos. El 100 % de actividad se consideró como el máximo de unidades de Miller obtenido en cada caso.

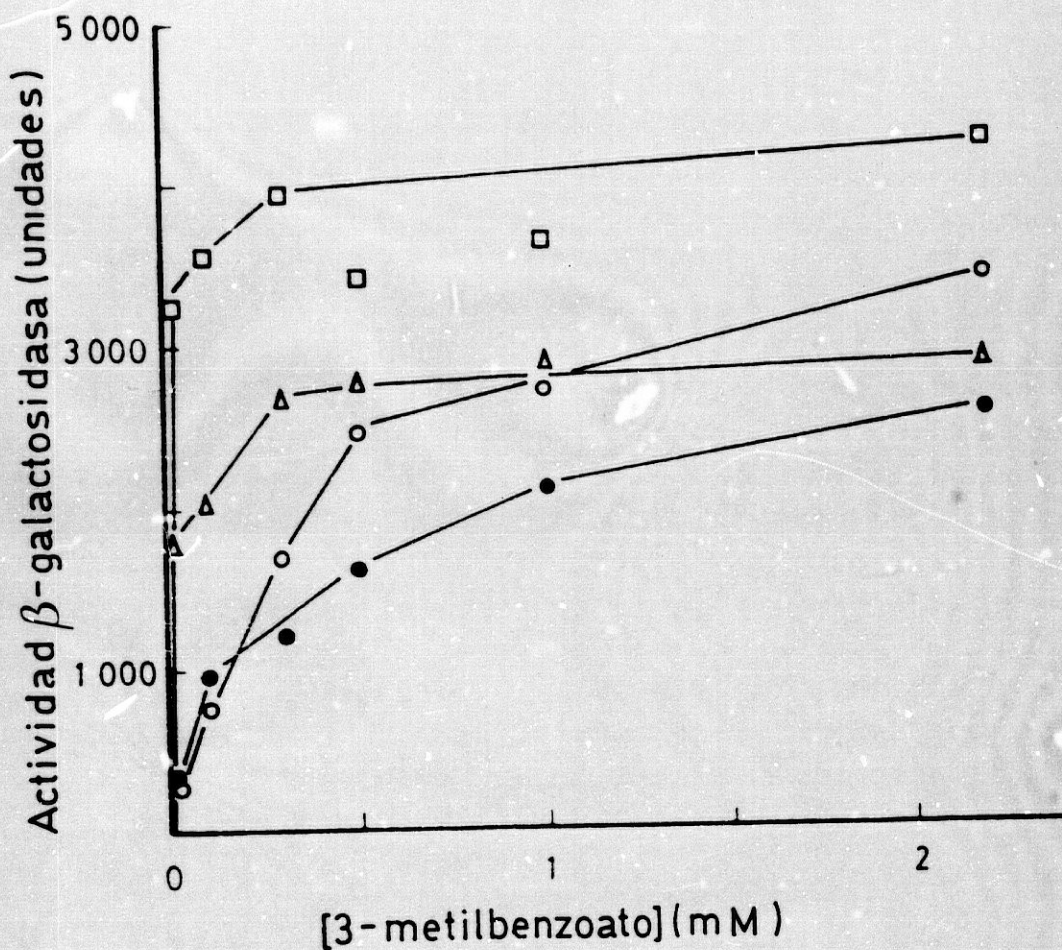


FIGURA 17. Efecto de la concentración de 3-metilbenzoato sobre la expresión desde P_m por XylS y sus mutantes. *E. coli* 5K (pJLR107) portando derivados de pKT231 que llevan los alelos *xylS* (○), *xylS2* (□), *xylS13* (△) y *xylS352* (●) se cultivó en LB con ampicilina y kanamicina hasta fase logarítmica tardía. La condiciones del ensayo fueron como en la leyenda de la Tabla 4, excepto que sólo se utilizó 3-metilbenzoato a las concentraciones indicadas.

y 3-clorobenzoato se obtuvieron resultados similares con activación sen. máxima a concentraciones de 350 (± 40), 425 (± 25), 550 (± 55) y 360 (± 30) μM , respectivamente (Tabla 5).

El mutante XylSThr45 mostraba mayor afinidad por benzoato y los derivados con un grupo metilo (2-, 3-, y 4-metilbenzoato) que la proteína silvestre XylS. La K'_s estimada reflejó valores menores de 5 μM , lo que representa al menos 60 veces más afinidad por estos compuestos que el regulador silvestre. La Figura 17 muestra los resultados obtenidos con 3-metilbenzoato. Los valores de K'_s para 2-hidroxi-, 4-etil- y 2,4-dimetilbenzoato, los cuales no son efectores de la proteína silvestre, fueron ≤ 5 , 50 (± 20) y 150 (± 30) μM , respectivamente (Tabla 5).

El mutante XylSHis41 también presentaba mayor afinidad aparente que la proteína silvestre XylS por 3-metilbenzoato (aproximadamente 50 μM , que comparando con el valor de K'_s del silvestre, 350 μM , indica un aumento de afinidad de unas 7 veces). Cuando se estimó la afinidad aparente por 3-metoxibenzoato, el compuesto con el que había sido seleccionado este mutante, se obtuvo un valor del orden de 1 a 2 mM (Tabla 5). Esta medida no pudo ser más precisa porque altas concentraciones de 3-metoxibenzoato -o de cualquier otro de los derivados del ácido benzoico usados en este trabajo- eran tóxicas para la bacteria y reducían considerablemente el crecimiento bacteriano; así, por

TABLA 5. Constante de afinidad aparente de XylS y sus mutantes por benzoatos.

| Efectores | XylS | XylSThr45 | XylSGly152 | XylSHis41 | XylSVal288 | XylSPhe155 | XylSArg256 |
|-----------|------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|------------------|
| Benzoato | 425 | 5 | -- | -- | -- | -- | $1.2 \cdot 10^3$ |
| 2MB | 550 | 5 | -- | -- | -- | -- | $2.3 \cdot 10^3$ |
| 3MB | 350 | 5 | $1.2 \cdot 10^3$ | 50 | 300 | 300 | $1.2 \cdot 10^3$ |
| 4MB | 350 | 5 | -- | -- | -- | -- | -- |
| 2OHB | * | 5 | -- | -- | -- | -- | -- |
| 4EB | * | 50 | -- | -- | -- | -- | -- |
| 2,4DMB | * | 150 | -- | -- | -- | -- | -- |
| 2MeB | * | -- | $1 \cdot 10^3$ | -- | -- | -- | -- |
| 3MeB | * | -- | -- | $2.3 \cdot 10^3$ | -- | -- | -- |
| 4MeB | * | -- | -- | -- | $1 \cdot 10^3$ | -- | -- |
| 2,5DCB | * | -- | -- | -- | -- | $4 \cdot 10^3$ | -- |
| 3,5-DCB | * | -- | -- | -- | -- | -- | $1 \cdot 10^3$ |

Las condiciones para la estimación de la K' , (μM) fueron las descritas en la leyenda de la Tabla 4 y la Figura 17, excepto que se utilizaron los benzoatos indicados en la tabla.

* indica que el compuesto no es efector de la proteína silvestre

-- indica valor no determinado

ejemplo, a concentración 2 mM de 3-metoxibenzoato la turbidez del cultivo bacteriano, medida a 660 nm, era del orden del 50 % de la medida en ausencia del análogo de benzoato.

Los mutantes XylSVal288 y XylSPhe155 mostraron valores de afinidad aparente por 3-metilbenzoato similares a los valores obtenidos con la proteína silvestre, en el intervalo de 250 a 350 μ M. En contraste, los mutantes XylSGly152 y XylSArg256 mostraron valores de K'_s para 3-metilbenzoato en el intervalo de 1 a 2 mM. Para estos cuatro mutantes se estimó la K'_s con el benzoato que se usó durante su aislamiento, 4-metoxibenzoato para XylSVal288; 2,5-dimetilbenzoato para XylSPhe155; 2-metoxibenzoato para XylSGly152 y 3,5-diclorobenzoato para XylSArg256, obteniéndose valores de K'_s que estaban en el orden de milimolar (Tabla 5). Como se ha indicado antes, estos valores no se pudieron precisar debido al efecto tóxico de los benzoatos a altas concentraciones sobre el crecimiento bacteriano.

1.5.-Efecto del número de copias del gen xy/S y sus mutantes en la expresión desde P_m.

Estudios previos (Mermoud *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1987a; Inouye *et al.*, 1987 y Ramos *et al.*, 1990a), sugerían que un aumento en la expresión del gen xy/S, bien debido a la clonación en un vector de alto número de copias o a su expresión desde el promotor sintético P_{tac}, se traducía en un aumento de la producción de la proteína XylS,

lo cual a su vez permitía expresión desde Pm en ausencia de efectores. El alelo silvestre *xy/S* se clonó en pEMBL9 (aproximadamente 100 copias por célula) y se transformó en la cepa de *E. coli* 5K (pERD100). La actividad β -galactosidasa expresada en la fusión Pm::*lacZ* se determinó en presencia y ausencia de 3-metilbenzoato en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos mostraban expresión constitutiva a partir de Pm en ausencia de efectores, estos niveles de actividad β -galactosidasa fueron del orden de 10 veces superiores a los determinados con la misma fusión y el gen *xy/S* clonado en pKT231 (20 copias por célula). Se observó, además, que en presencia de 3-metilbenzoato, el nivel de expresión desde Pm sólo aumentaba unas dos veces sobre el nivel basal (Tabla 6).

Los mutantes de *xy/S* también se clonaron en pEMBL9 y, tras transformar la cepa *E. coli* 5K (pERD100) con los plásmidos recombinantes, se determinó el nivel de actividad β -galactosidasa en presencia y en ausencia de 3-metilbenzoato. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

El efecto multicopia con los alelos *xy/S2*, *xy/S12*, *xy/S241* y *xy/S254* era muy similar al mostrado por el alelo silvestre. Por el contrario, con el alelo mutante *xy/S13* se observó que la hiperproducción de la proteína XylSHis41 conducía a un incremento muy notable del nivel de expresión de la actividad basal β -galactosidasa expresada desde Pm, esto es 3-4 veces más alta que

la actividad mediada por el alelo silvestre en multicopia en ausencia de efectores y del orden de 50 veces más alta que la actividad mediada por XylS ó XylSHis41 en bajo número de copias. Con los alelos mutantes xy/S14 y xy/S352 en multicopia se observó un menor aumento de actividad β -galactosidasa expresada desde Pm. Las proteínas XylSVal288 y XylSArg256 solo produjeron un aumento de 3 a 4 veces con respecto a la actividad mediada por la proteína XylS expresada a partir del alelo silvestre clonado en un vector de bajo número de copias. Es de interés señalar que todos los alelos mutantes en multicopia produjeron un ligero aumento de actividad β -galactosidasa expresada desde Pm cuando el 3-metilbenzoato se añadía al medio de cultivo, excepto con xy/S352 que en presencia de este compuesto medió una bajada del nivel de actividad.

TABLA 6. Efecto multicopia de *xylS* y sus mutantes sobre la expresión desde Pm.

| Pm::lacZ + | Regulador | Actividad β -gal (unidades) | |
|-----------------|------------|--------------------------------------|------|
| | | - | + |
| Testigo | ----- | 60 | 55 |
| pKT231::xylS | Silvestre | 58 | 1066 |
| pEMBL9::xylS | Silvestre | 637 | 1015 |
| pEMBL9::xylS2 | XylSThr45 | 610 | 1092 |
| pEMBL9::xylS12 | XylSGly152 | 418 | 717 |
| pEMBL9::xylS13 | XylSHis41 | 3238 | 3271 |
| pEMBL9::xylS14 | XylSVal288 | 214 | 637 |
| pEMBL9::xylS241 | XylSLeu88 | 521 | 584 |
| pEMBL9::xylS254 | XylSPhe155 | 434 | 729 |
| pEMBL9::xylS352 | XylSArg256 | 215 | 126 |

E. coli 5K (pERD100) con el alelo silvestre clonado en pKT231 y pEMBL9 y los alelos mutantes clonados en pEMBL9, se cultivaron hasta fase logarítmica tardía en medio LB suplementado con los respectivos antibióticos. Los cultivos se diluyeron 100 veces en el mismo medio y se cultivaron durante 5 horas en presencia (+) y en ausencia (-) de 1mM de 3-metilbenzoato. La actividad β -galactosidasa se determinó según el procedimiento descrito en el apartado 1.6 de Materiales y Métodos.

2.-MUTANTES DE xy/S QUE EXHIBEN DOS MUTACIONES PUNTUALES.

Con objeto de profundizar en la organización de los dominios funcionales de la proteína XylS, se decidió construir mutantes del regulador que portasen dos mutaciones puntuales, una en el extremo carboxilo terminal y otra en el amino terminal. Con esta estrategia, se pretendía establecer si existía dominancia intralélica y si existían interacciones entre las dos zonas de la proteína (Michán *et al.*, 1991).

2.1.-Construcción *in vitro* de mutantes dobles de xy/S.

La estrategia para combinar en un mismo alelo mutaciones en las zona amino y carboxilo terminal se basa en la existencia de un sitio de restricción único para el enzima *NcoI* en la posición 527 del gen *xy/S*. El mapa de restricción de *xy/S* se muestra en la Figura 12 (página 74). Los alelos utilizados para obtener los dobles mutantes fueron *xy/S2*, *xy/S13*, *xy/S241*, *xy/S12*, *xy/S14*, *xy/S352*, descritos en el apartado anterior y los mutantes *xy/S32* y *xy/S52* aislados por

la Dra. Luming Zhou en este laboratorio y descritos en Zhou *et al.*, 1990.

Los niveles de inducción desde Pm mediados por XylS_{Ile229} y XylS_{Val274}, codificadas por xy/S32 y xy/S52, respectivamente, fueron determinados por L. Zhou y se presentan en la Tabla 7. Es de interés señalar que ambos mutantes inducen altos niveles de expresión desde Pm en ausencia de efectores, y que estos niveles se incrementaron cuando a los cultivos se le añadían una amplia gama de benzoatos (Tabla 7).

Para la construcción de los dobles mutantes, los diferentes alelos de xy/S que portaban las mutaciones puntuales se clonaron en el plásmido pEMBL9, de forma que la orientación del gen era con el extremo 5' próximo al sitio *EcoRI* de pEMBL9 y el extremo 3' próximo al sitio *HindIII*. Los plásmidos donadores de la mutación en el extremo amino terminal se cortaron con dos restrictasas: *NcoI* que cortaba dentro del gen y *HindIII* que cortaba en el vector de clonación fuera del alelo xy/S. Los dos fragmentos resultantes (0,55 y 5,25 Kb) se separaron en geles de agarosa y el fragmento menor se aisló como se ha descrito en la sección 15 de Materiales y Métodos. En el caso de los plásmidos donadores del extremo carboxilo terminal se siguió el mismo procedimiento pero se aislaron los fragmentos mayores (~ 5,25 Kb). Posteriormente se combinaron los distintos fragmentos para generar dobles mutantes mediante ligación *in vitro*.

TABLA 7. Perfiles de inducción de los mutantes *xylS32* y *xylS52*.

| Efactor | β -galactosidasa (Unidades) | |
|----------|-----------------------------------|------------|
| | Pm::lacZ + | |
| | XylSIle229 | XylSVal274 |
| Ninguno | 1540 | 1550 |
| 2MB | 7680 | 4470 |
| 3MB | 6730 | 5630 |
| 4MB | 8170 | 4775 |
| Benzoato | 4385 | 4725 |
| 2,4DMB | 5852 | 3343 |
| 2,5DMB | 7056 | 5154 |
| 2,6DMB | 3097 | 1392 |
| 3,5DMB | 4063 | 1461 |

La actividad β -galactosidasa se determinó en las condiciones descritas en la Tabla 4 excepto que se utilizó *E. coli* 5K (pERD100) transformada con pERD32 y pERD52, que codifican las proteínas XylSIle229 y XylSVal274, respectivamente (Zhou et al., 1990). Los valores indicados son unidades de Miller. Las abreviaturas usadas para los benzoatos son las de la Tabla 4.

La Figura 18 muestra la construcción de uno de estos alelos y la Tabla 8 resume las distintas combinaciones obtenidas. Los plásmidos resultantes se transformaron en la cepa de *E. coli* 71/18 y a partir de las colonias resultantes se aisló ADN plasmídico. Este ADN se cortó con diversas restrictasas, *Bgl*II, *Bam*HI, *Bst*EI, *Nco*I, etc, para comprobar que el patrón de corte era correcto.

2.2.-Perfil de efectores de los mutantes dobles de *xy*/S.

Con objeto de determinar el perfil de los dobles mutantes y dado que el gen *xy*/S en multicopia presenta expresión constitutiva desde Pm, se procedió a subclonar los alelos mutantes en un plásmido de bajo número de copias como pKT231. Para ello, a partir de los derivados de pEMBL9 que portaban los alelos de *xy*/S con dos mutaciones, se aislaron los fragmentos *Bam*HI de 1,7Kb con el alelo *xy*/S completo y se clonaron en el vector pKT231 previamente cortado con *Bam*HI.

Para determinar el perfil de efectores se utilizaron fusiones Pm::*lacZ* en *E. coli* 5K (pJLR107) ó ET8000 (pERD100). Células competentes de estas dos cepas se transformaron con los plásmidos pERD803, pERD804, pERD805, pERD806, pERD807, pERD808, pERD809, pERD810, pERD811, pERD812, pERD813, pERD814, pERD815, pERD816 y pERD817, que codifican, respectivamente, a las proteínas XylSThr45Gly152, XylSThr45Val288,

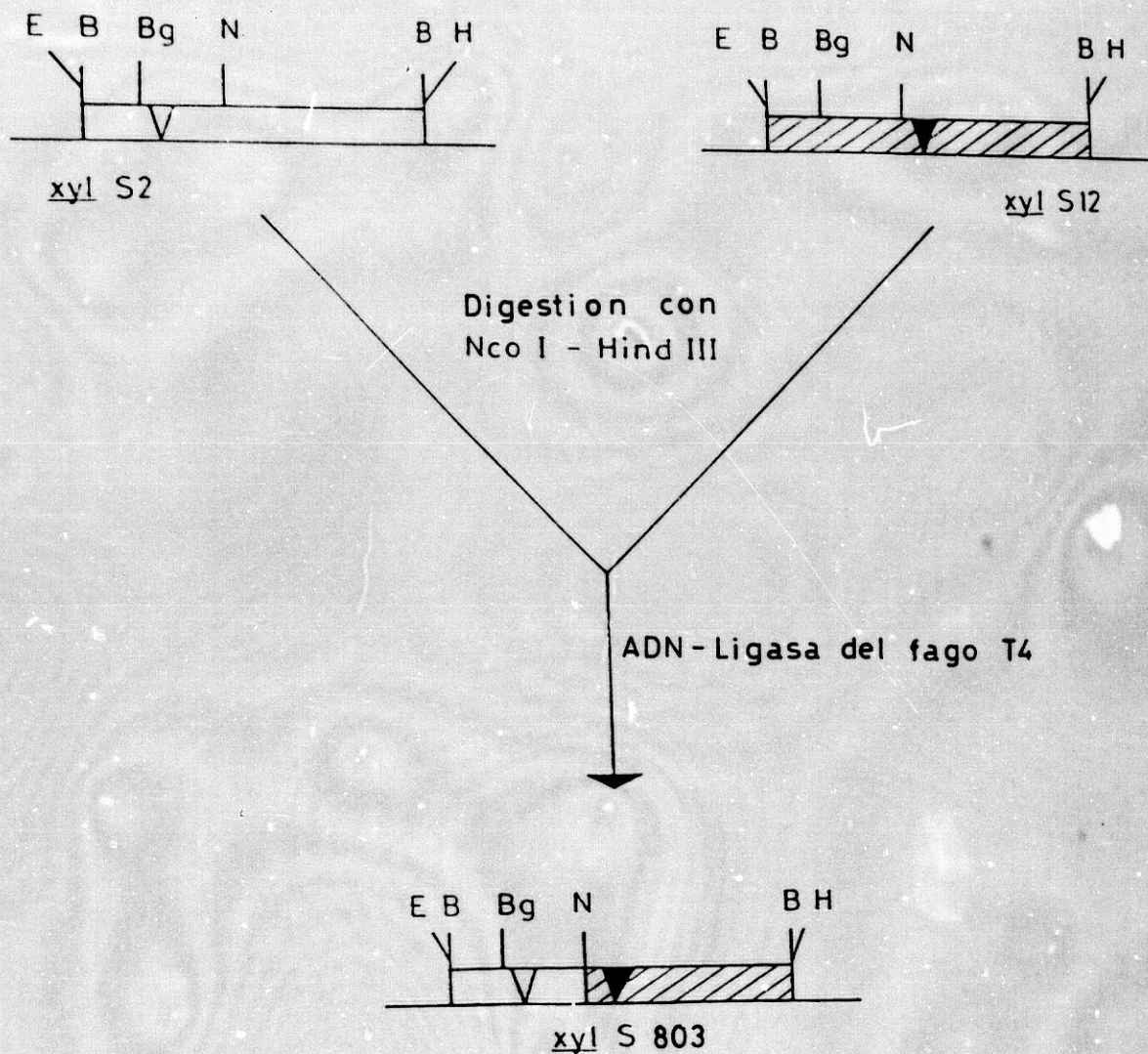


FIGURA 18. Construcción de dobles mutantes de *xylS*. Se representa la construcción del alelo *xylS803*. Las cajas indican los alelos de *xylS* y la línea continua inferior el vector pEMBL9. Los triángulos invertidos en *xylS2* y *xylS12* indican la localización de las mutaciones en los alelos. Las abreviaturas empleadas para los sitios de corte con enzimas de restricción son: B, *BamHI*; Bg, *BglIII*; E, *EcoRI*; H, *HindIII* y N, *NcoI*.

TABLA 8. Dobles mutantes de *xylS* y sus proteínas.

| Alelos parentales | | Alelo con dos mutaciones puntuales | Regulador mutante |
|-------------------|----------------|------------------------------------|-------------------|
| NH ₂ - | COOH- | | |
| <i>xylS2</i> | <i>xylS12</i> | <i>xylS803</i> | XylSThr45Gly152 |
| <i>xylS2</i> | <i>xylS14</i> | <i>xylS804</i> | XylSThr45Val288 |
| <i>xylS2</i> | <i>xylS352</i> | <i>xylS805</i> | XylSThr45Arg256 |
| <i>xylS2</i> | <i>xylS32</i> | <i>xylS806</i> | XylSThr45Ile229 |
| <i>xylS2</i> | <i>xylS52</i> | <i>xylS807</i> | XylSThr45Val274 |
| <i>xylS13</i> | <i>xylS12</i> | <i>xylS808</i> | XylSHis41Gly152 |
| <i>xylS13</i> | <i>xylS14</i> | <i>xylS809</i> | XylSHis41Val288 |
| <i>xylS13</i> | <i>xylS352</i> | <i>xylS810</i> | XylSHis41Arg256 |
| <i>xylS13</i> | <i>xylS32</i> | <i>xylS811</i> | XylSHis41Ile229 |
| <i>xylS13</i> | <i>xylS52</i> | <i>xylS812</i> | XylSHis41Val274 |
| <i>xylS241</i> | <i>xylS12</i> | <i>xylS813</i> | XylSLeu88Gly152 |
| <i>xylS241</i> | <i>xylS14</i> | <i>xylS814</i> | XylSLeu88Val288 |
| <i>xylS241</i> | <i>xylS352</i> | <i>xylS815</i> | XylSLeu88Arg256 |
| <i>xylS241</i> | <i>xylS32</i> | <i>xylS816</i> | XylSLeu88Ile229 |
| <i>xylS241</i> | <i>xylS52</i> | <i>xylS817</i> | XylSLeu88Val279 |

Bajo el epígrafe NH₂- y COOH- se indican los alelos que se combinaron como donadores de la región amino y carboxilo terminal, respectivamente, para generar mutantes dobles *xylS*. Se indican los alelos mutantes y los reguladores mutantes resultantes.

XylSThr45Arg256, XylSThr45Ile229, XylSThr45Val274,
XylSHis41Gly152, XylSHis41Val288, XylSHis41Arg256,
XylSHis41Ile229, XylSHis41Val274, XylSLeu88Gly152,
XylSLeu88Val288, XylSLeu88Arg256, XylSLeu88Ile229 y
XylSLeu88Val274. La actividad β -galactosidasa expresada desde Pm
se determinó en ausencia y en presencia de 12 benzoatos que se
añadieron al medio a concentración 1 mM.

Es de señalar que todas las medidas de perfiles de inducción
de esta sección se realizaron tanto con la fusión Pm::lacZ en el
plásmido pJLR107, como en el plásmido pERD100. En ausencia de
efectores, los valores de actividad β -galactosidasa en *E. coli*
(pJLR107, pNM185 ó pKT231::xy/S*, donde * indica un alelo con
dos mutaciones puntuales) fueron de 4 a 6 veces superiores que los
obtenidos con *E. coli* (pERD100, pNM185 ó pKT231::xy/S*). Esta
diferencia se atribuyó a la diferencia en el número de copias entre
ambos vectores. Sin embargo es de señalar que los valores máximos
de actividad β -galactosidasa con distintos efectores fueron similares.
Para el perfil de los mutantes XylSHis41Ile229, XylSHis41Val274,
XylSLeu88Ile229 y XylSLeu88Val274 que describiremos en esta
sección, se ha usado pERD100 porque, cuando se realizaron las
medidas con pJLR107, los cultivos presentaron una tasa de
crecimiento muy inferior a la normal. Este efecto se veía incrementado
si en el medio se añadían benzoatos como 3-metil- ó 2,3-
dimetilbenzoato. Además, las determinaciones independientes de

actividad β -galactosidasa mostraban grandes oscilaciones en los niveles basales (entre 150 y 1500 unidades). Esta situación no se repitió en ninguna otra fase de este trabajo.

Los resultados obtenidos al determinar la actividad β -galactosidasa expresada desde Pm con los dobles mutantes se muestran en las Tablas 9 y 10.

En base a los perfiles de efectores se distinguieron tres grupos de mutantes. El primer grupo lo constituyeron los mutantes XylSHis41Ile229, XylSHis41Val274, XylSLeu88Ile229 y XylSLeu88Val274. Todos ellos presentan la zona carboxilo terminal codificada por los alelos xy/S32 y xy/S52 y mediaban altos niveles de expresión desde Pm en ausencia de efectores (Tabla 9). Este carácter es similar al de los mutantes sencillos donadores de su zona carboxilo terminal, XylSIle229 y XylSVal274, pero contrasta con los niveles basales mediados por los mutantes donadores de la zona amino terminal, XylSHis41 y XylSLeu88, aunque el último presentaba niveles basales semiconstitutivos. Respecto a los niveles de expresión desde Pm en presencia de efectores (Tabla 9), éstos fueron similares en los cuatro mutantes, no existiendo diferencias considerables entre ellos, aunque sí las había con respecto a los mutantes parentales con los que se construyeron. Los mutantes dobles eran capaces de mediar niveles de inducción más elevados, de 2 a 3 veces, con 3-metil-, 2,4-dimetil- y 2-hidroxibenzoato pero ninguno aumentaba la expresión desde Pm en presencia de 3,5-dimetilbenzoato.

TABLA 9. Perfil de inducción de los dobles mutantes obtenidos utilizando la zona carboxilo terminal de los alelos constitutivos *xy1S32* y *xy1S52*.

| Efec- tor | Unidades de β -galactosidasa Pm::lacZ + | | | | | |
|--------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Thr45 Ile229 | Thr45 Val274 | His41 Ile229 | His41 Val274 | Leu88 Ile229 | Leu88 Val274 |
| Ningún | 160 | 175 | 935 | 1040 | 1105 | 1085 |
| 2MB | 990 | 920 | ND | ND | ND | ND |
| 3MB | 2740 | 1865 | 2955 | 2380 | 2870 | 2835 |
| 4MB | 645 | 800 | ND | ND | ND | ND |
| 2,3DMB | 2420 | 1365 | ND | ND | ND | ND |
| 2,4DMB | 520 | 820 | 2225 | 2035 | 2325 | 2370 |
| 2,5DMB | 865 | 1675 | ND | ND | ND | ND |
| 2,6DCB | 180 | 225 | ND | ND | ND | ND |
| 3,4DMB | 265 | 415 | ND | ND | ND | ND |
| 3,5DMB | 135 | 345 | 835 | 935 | 955 | 1115 |
| 2OHB | 480 | 755 | 2595 | 2680 | 3355 | 3110 |
| 3MeB | 1320 | 1450 | ND | ND | ND | ND |
| 4MeB | 235 | 345 | ND | ND | ND | ND |

E. coli 5K (pJLR107) se transformó con pERD806 y pERD807, y, ET8000 (pERD100), con pERD811, pERD812, pERD816 y pERD817. Las células, portan los dos plásmidos, se cultivaron durante 5 horas a 30°C en presencia o en ausencia de los benzoatos que se indican, a concentración 1 mM. La actividad β -galactosidasa se determinó como se describió en la sección 6 de Materiales y Métodos. Los valores que aparecen son unidades β -galactosidasa expresadas de acuerdo con Miller. Las abreviaturas usadas para los distintos benzoatos son las mismas que en tablas anteriores. ND significa no determinado.

TABLA 10. Perfil de inducción de los dobles mutantes obtenidos por combinación de mutantes simples con el perfil de inductores alterado.

| β-galactosidasa (Nivel de inducción) | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Pm::lacZ + | | | | | | | | | |
| Efec- tor | Thr45 Gly152 | Thr45 Val288 | Thr45 Arg256 | His41 Gly152 | His41 Val288 | His41 Arg256 | Leu88 Gly152 | Leu88 Val288 | Leu88 Arg256 |
| Ninguno | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2MB | 11 | 12 | 10 | 9 | 11 | 21 | 10 | 18 | 2 |
| 3MB | 51 | 27 | 22 | 26 | 33 | 42 | 33 | 20 | 2 |
| 4MB | 20 | 12 | 9 | 12 | 10 | 22 | 16 | 8 | 2 |
| 2,3DMB | 42 | 21 | 25 | 27 | 26 | 34 | 30 | 15 | 2 |
| 2,4DMB | 5 | 5 | 3 | 4 | 4 | 4 | 5 | 3 | 2 |
| 2,5DMB | 6 | 12 | 9 | 20 | 8 | 12 | 11 | 8 | 2 |
| 2,6DCB | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 3,4DMB | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 3,5DMB | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2OHB | 6 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 1 |
| 3MeB | 28 | 13 | 15 | 13 | 17 | 20 | 10 | 11 | 2 |
| 4MeB | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 1 |

E. coli 5K (pJLR107) transformada con pERD803, pERD804, pERD805, pERD808, pERD809, pERD810, pERD813, pERD814 y pERD815, se cultivó durante 5 horas en ausencia o en presencia de los benzoatos que se indican a concentración 1 mM a 30°C en agitación y se determinó la actividad β-galactosidasa tal y como se describe en el apartado 6 de Materiales y Métodos. En esta tabla se indican los niveles de inducción obtenidos respecto a los niveles basales correspondientes que fueron, respectivamente, 130, 200, 200, 225, 165, 110, 150, 165 y 800 unidades de Miller para XylSThr45Gly152, XylSThr45Val288, XylSThr45Arg256, XylSHis41Gly152, XylSHis41Val288, XylSHis41Arg256, XylSLeu88Gly152, XylSLeu88Val288 y XylSLeu88Arg256. Las abreviaturas usadas para denominar los distintos benzoatos son las mismas que las utilizadas en las tablas anteriores.

El segundo grupo lo componían los mutantes XylSThr45Gly152, XylSThr45Val288, XylSThr45Arg256, XylSThr45Ile229, XylSThr45Val274, XylSHis41Gly152, XylSHis41Val288, XylSHis41Arg256, XylSLeu88Gly152 y XylSLeu88Val288. Todos estos mutantes presentan niveles basales similares a los obtenidos con la proteína silvestre, XylS (entre 100 y 225 unidades), pero presentaban un perfil de efectores más amplio que el silvestre, ya que reconocían como efectores benzoatos que no son efectores del regulador silvestre, como por ejemplo 2-hidroxi-; 2,4-dimetil-; 4-etoxi- y especialmente 3-metoxibenzoato. Es de señalar que todos estos mutantes han perdido la capacidad de reconocer 3,4-dimetilbenzoato como efector (Tablas 9 y 10).

En el tercer grupo se incluyó un solo mutante, XylSLeu88Arg256 (Tabla 10). Este mutante conservó el carácter semiconstitutivo (entre 750 y 800 unidades de nivel basal) que tenía el mutante simple donador de la zona amino terminal, XylSLeu88, pero prácticamente ha perdido la capacidad de reconocer otros benzoatos como efectores. Esta observación contrasta con el comportamiento de XylSLeu88Gly152 y XylSLeu88Val288, los cuales presentaban niveles basales similares al silvestre y conservaban la capacidad de reconocer distintos benzoatos como efectores (Tabla 10).

2.3.-Afinidad aparente de los mutantes dobles de xyIS por 3-metilbenzoato.

Para caracterizar las posibles alteraciones en el sitio de unión al efector de estas mutaciones, se procedió a determinar la afinidad aparente (K'_s) de los dobles mutantes por 3-metilbenzoato. Para estimar las K'_s , se siguió el procedimiento descrito con los mutantes sencillos (sección 1.4 de Resultados). La cepa de *E. coli* 5K (pJLR107) se transformó con los plásmidos pERD803, pERD804, pERD805, pERD806, pERD807, pERD808, pERD809, pERD810, pERD813 y pERD814, que codifican para las proteínas, XylSThr45Gly152, XylSThr45Val288, XylSThr45Arg256, XylSThr45Ile229, XylSThr45Val274, XylSHis41Gly152, XylSHis41Val288, XylSHis41Arg256, XylSLeu88Gly152 y XylSLeu88Val288. Con los transformantes, se determinó el efecto que la concentración de 3-metilbenzoato tenía sobre la actividad β -galactosidasa expresada desde P_m. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 11. En esta determinación no están incluidos los mutantes XylSHis41Ile229, XylSHis41Val274, XylSLeu88Arg256, XylSLeu88Ile229 y XylSLeu88Val274 ya que mediaban altos niveles basales en ausencia de efector.

Los valores de K'_s para los reguladores mutantes ensayados eran del orden de 15 a 50 μ M. Como se puede apreciar, las constantes de afinidad aparente son, en todos los casos, menores que las determinadas para la proteína silvestre (Tabla 5, página 90) y los

TABLA 11. Constante de afinidad aparente por 3-metilbenzoato de los dobles mutantes de xylS.

| 5K (pJLR107) + | K', (μ M) |
|---------------------------|----------------|
| xylS803 (XylSThr45Gly152) | 30 |
| xylS804 (XylSThr45Val288) | 40 |
| xylS805 (XylSThr45Arg256) | 30 |
| xylS806 (XylSThr45Ile229) | 40 |
| xylS807 (XylSThr45Val274) | 15 |
| xylS808 (XylSHis41Gly152) | 15 |
| xylS809 (XylSHis41Val288) | 40 |
| xylS810 (XylSHis41Arg256) | 40 |
| xylS813 (XylSLeu88Gly152) | 30 |
| xylS814 (XylSLeu88Val288) | 50 |

E. coli 5K (pJLR107) se transformó independientemente con los plásmidos pERD803, pERD804, pERD805, pERD806, pERD807, pERD808, pERD809, pERD810, pERD813 y pERD814. Las cepas transformantes se cultivaron durante 5 horas a 30°C en agitación e presencia de distintas concentraciones de 3-metilbenzoato: 0, 5, 50, 500, 1.000 y 2.000 μ M. El valor K', corresponde a la concentración de 3-metilbenzoato a la que se alcanzó la mitad de la actividad máxima.

mutantes puntuales XylSLeu88, XylSGly152, XylSVal288 y XylSArg256, pero superiores a las determinadas para el mutante XylSThr45 y del mismo orden que la calculada para el mutante XylSHis41.

2.4.-Efecto multicopia en los mutantes dobles del gen xyIS.

Dado el distinto comportamiento de los dobles mutantes se estudió el efecto que sobre la expresión desde Pm tenía el número de copias de los alelos de xyIS. La cepa de *E. coli* ET8000 (pERD100) se transformó con los plásmidos pERD818, pERD819, pERD820, pERD821, pERD822, pERD823, pERD824, pERD825, pERD826, pERD827, pERD828, pERD829, pERD830, pERD831 y pERD832. Todos son derivados de pEMBL9 y codifican las proteínas, XylSThr45Gly152, XylSThr45Val288, XylSThr45Arg256, XylSThr45Ile229, XylSThr45Val274, XylSHis41Gly152, XylSHis41Val288, XylSHis41Arg256, XylSHis41Ile229, XylSHis41Val274, XylSLeu88Gly152, XylSLeu88Val288, XylSLeu88Arg256, XylSLeu88Ile229 y XylSLeu88Val274, respectivamente. A todas las cepas resultantes se les midió la actividad β -galactosidasa desde Pm en presencia y en ausencia de 3-metilbenzoato en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

TABLA 12. Efecto multicopia de los dobles mutantes de *xylS* sobre Pm.

| 5K pERD100 + | β -galactosidasa (Unidades) | |
|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| | -3MB | +3MB |
| pERD818 (XylSThr45Gly152) | 1.917 | 4.724 |
| pERD819 (XylSThr45Val288) | 3.528 | 4.152 |
| pERD820 (XylSThr45Arg256) | 2.058 | 3.799 |
| pERD821 (XylSThr45Ile229) | 860 | 1.287 |
| pERD822 (XylSThr45Val274) | 979 | 1.261 |
| pERD823 (XylSHis41Gly152) | 3.021 | 3.272 |
| pERD824 (XylSHis41Val288) | 4.265 | 4.553 |
| pERD825 (XylSHis41Arg256) | 2.348 | 3.716 |
| pERD826 (XylSHis41Ile229) | 1.126 | 1.487 |
| pERD827 (XylSHis41Val274) | 957 | 1.522 |
| pERD828 (XylSLeu88Gly152) | 3.570 | 1.781 |
| pERD829 (XylSLeu88Val288) | 4.257 | 3.908 |
| pERD830 (XylSLeu88Arg256) | 3.665 | 3.416 |
| pERD831 (XylSLeu88Ile229) | 843 | 911 |
| pERD832 (XylSLeu83Val274) | 757 | 810 |

E. coli ET8000 (pERD100) se transformó con los derivados de pEMBL9, pERD818, pERD819, pERD820, pERD821, pERD822, pERD823, pERD824, pERD825, pERD826, pERD827, pERD828, pERD829, pERD830, pERD831 y pERD832. Los transformantes se cultivaron durante 5 horas a 30°C en agitación, en presencia (+3MB) o ausencia (-3MB) de 3-metilbenzoato a concentración 1 mM. Las actividades β -galactosidasa se expresan en unidades de Miller y se determinaron como se ha descrito en Materiales y Métodos.

Los niveles obtenidos en ausencia de efector son más elevados que los niveles basales medidos cuando los alelos estaban clonados en un vector de bajo número de copias como pKT231 (Tablas 9 y 10), y, las proporciones de inducción al añadir 3-metilbenzoato al medio fueron bajas, entre 1,5 a 3 veces. Estos resultados son similares a los obtenidos con el alelo silvestre en multicopia y los alelos parentales también en multicopia (Ver Tabla 6, página 94). Con las mutaciones dobles que conducen a un carácter constitutivo -XylSHis41Ile299, XylSHis41Val274, XylSLeu88Ile229 y XylSLeu88Val274- la clonación de los alelos en multicopia no condujo a niveles de expresión basales más altos que los medidos con los alelos en pKT231.

3.-ANÁLISIS DE MUTANTES DE XYLS OBTENIDOS POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA CON OLIGONUCLEÓTIDOS Y MUTAGÉNESIS IN VITRO CON BISULFITO.

Para delimitar mejor las funciones de la parte amino terminal del regulador XylS, se generaron 10 mutantes puntuales en esta proteína con cambios en los aminoácidos 41 y 45, ya que la evidencia experimental obtenida anteriormente sugería que los residuos en dichas posiciones podrían participar directamente en las interacciones de la proteína con los efectores. Asimismo, fueron caracterizados 3 mutantes aislados mediante mutagénesis con bisulfito en el sitio *NcoI* del gen *xy/S* por la Dra. Luming Zhou en este laboratorio. Próximo a dicho sitio de restricción se encuentra la mutación del alelo *xy/S241*, descrito en la sección 1 de Resultados. Los cambios generados en esta sección se resumen en las Tablas 13 y 14.

TABLA 13. Cambios en la secuencia de nucleótidos del gen *xylS* inducidos por mutagénesis dirigida con oligonucleótidos y los cambios subsiguientes en la estructura primaria del regulador XylS.

| Alelo | Codón | | Cambio esperado de aminoácido |
|----------------|--------|----------|-------------------------------|
| | Número | Cambio | |
| <i>xylS833</i> | 45 | AGG->AGC | Arg---->Ser |
| <i>xylS834</i> | 45 | AGG->GGG | Arg---->Gly |
| <i>xylS835</i> | 45 | AGG->AAG | Arg---->Lys |
| <i>xylS836</i> | 41 | CGC->AGC | Arg---->Ser |
| <i>xylS837</i> | 41 | CGC->GGC | Arg---->Gly |
| <i>xylS838</i> | 41 | CGC->TGC | Arg---->Cys |
| <i>xylS839</i> | 41 | CGC->CCC | Arg---->Pro |
| <i>xylS840</i> | 41 | CGC->CTC | Arg---->Leu |
| <i>xylS841</i> | 45 | AGG->TGG | Arg---->Trp |
| <i>xylS842</i> | 45 | AGG->ATG | Arg---->Met |

TABLA 14. Cambios en la secuencia de nucleótidos del gen *xylS* inducidos por mutagénesis con bisulfito y los cambios subsiguientes en la estructura primaria del regulador *XylS*.

| Alelo | Codón | | Cambio de aminoácido esperado |
|----------------|--------|----------|-------------------------------|
| | Número | Cambio | |
| <i>xylS843</i> | 91 | CAT->TAT | His---->Tyr |
| <i>xylS844</i> | 89 | CGT->CAT | Arg---->His |
| <i>xylS845</i> | 92 | GGC->AGC | Gly---->Ser |

3.1.-Aislamiento de mutantes en las posiciones 41 y 45 de la proteína XylS.

Las mutaciones de las posiciones 41 y 45 se aislaron por mutagénesis dirigida con oligonucleótidos siguiendo básicamente el protocolo descrito por Kunkel *et al.*, 1987, el cual se describe con las modificaciones introducidas en la sección 19 de Materiales y Métodos. Se sintetizaron 10 oligonucleótidos de 17 ó 21 bases de longitud, complementarios salvo en una base a la zona a mutar de la cadena codificante del alelo silvestre *xy/S*. La base cambiada se eligió de tal manera que el cambio inducido en su cadena complementaria codificase una proteína con la mutación que se deseara en el aminoácido diana. Tras hibridar las cadenas sencillas de la secuencia codificante de *xy/S* con los oligonucleótidos sintetizados, la cadena complementaria se sintetizó utilizando el oligonucleótido como cebador. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores se muestra en la Tabla 2 en la sección de Materiales y Métodos.

El plásmido pTZ19::*xy/S* se utilizó para realizar las distintas reacciones que implican la mutagénesis: aislamiento de cadenas sencillas uridiladas, hibridación con el oligonucleótido que porta la mutación deseada, extensión, ligación, etc. El ADN resultante se transformó en la cepa de *E. coli* 71/18 y, de esta transformación, se aislaron clones resistentes a ampicilina que se secuenciaron para

definir cuáles de ellos portaban las mutaciones deseadas en el alelo *xy/S*.

En todos los casos se aislaron clones con las mutaciones buscadas con una eficiencia estimada entre el 50 y el 100 %. Los cambios inducidos en la secuencia del gen *xy/S* y la proteína XylS se resumen en la Tabla 13.

3.2.-Aislamiento de mutantes en el sitio *NcoI* del gen *xy/S*.

En la sección 1 de este trabajo se identificó la posición 88 del regulador silvestre como un posible residuo implicado en el reconocimiento de benzoatos o en la activación de XylS. Con objeto de profundizar en el papel de esa región se aprovechó la existencia de un sitio *NcoI* que codificaba aminoácidos alrededor de la posición 88 y que el corte con *NcoI* genera cadenas sencillas susceptibles de ataque por bisulfito. La Dra. Zhou aisló en nuestro laboratorio tres mutantes de *xy/S* tras tratar el plásmido pJLR156 cortado con el enzima *NcoI* con bisulfito sódico. El ADN resultante se transformó en la cepa de *E. coli* 5K y se buscó entre los clones resultantes aquellos que portasen un plásmido que no se cortase con *NcoI*. La naturaleza de las mutaciones fue determinada mediante secuenciación y se seleccionaron tres clones cuyos cambios se resumen en la Tabla 14.

3.3.-Perfil de efectores de los mutantes descritos en esta sección.

Para medir las posibles variaciones en el(los) sitio(s) de interacción con el efector, fragmentos *Bam*HI de 1,7Kb que contenían los distintos alelos de *xy*/S obtenidos en el apartado anterior se aislaron de los derivados de pTZ19::*xy*/S y pEMBL9::*xy*/S descritos, y se clonaron en el sitio *Bam*HI del vector pKT231. De este modo, se obtuvieron los plásmidos pERD833, pERD834, pERD835, pERD836, pERD837, pERD838, pERD839, pERD840, pERD841, pERD842, pERD843, pERD844 y pERD845, que codifican las proteínas XylSSer45, XylSGly45, XylSLys45, XylSSer41, XylSGly41, XylSCys41, XylSPro41, XylSLeu41, XylSTrp45, XylSMet45, XylSTyr91, XylSHis89 y XylSSer92. La cepa de *E. coli* 5K (pJLR107) se transformó con los derivados de pKT231 obtenidos y se midió la actividad β -galactosidasa expresada desde Pm en presencia y ausencia de distintos benzoatos a concentración 1 mM. Los valores obtenidos se muestran en las Tablas 15, 16 y 17.

Todos los mutantes de XylS con el aminoácido 45 cambiado mediaban niveles basales de expresión desde Pm (Pm::*lacZ*) similares a los mediados por la proteína silvestre XylS, así, los niveles de actividad β -galactosidasa en ausencia de efectores fueron de entre 150 y 350 unidades de Miller. El mutante XylSSer45 presentó unos

TABLA 15. Nivel de inducción desde Pm mediado por los mutantes de XylS aislados por mutagénesis dirigida en la posición 45.

| Actividad β -galactosidasa (nivel de inducción) | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Pm::lacZ + | | | | | |
| Efactor | Ser45 | Gly45 | Lys45 | Trp45 | Met45 |
| Ninguno | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2MB | 3 | 10 | 9 | 7 | 11 |
| 3MB | 4 | 27 | 27 | 10 | 18 |
| 4MB | 5 | 18 | 11 | 4 | 10 |
| 2,3DMB | 5 | 27 | 15 | 11 | 18 |
| 2,4DMB | 2 | 5 | 5 | 2 | 4 |
| 2,5DMB | 2 | 17 | 7 | 3 | 7 |
| 2,6DCB | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3,4DMB | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3,5DMB | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2OHB | 2 | 3 | 6 | 2 | 4 |
| 3MeB | 3 | 17 | 15 | 7 | 12 |
| 4MeB | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 |

La cepa de *E. coli* 5K (pJLR107) se transformó con los plásmidos pERD833, pERD834, pERD835, pERD841 y pERD842 que codifican los reguladores XylSSer45, XylSGly45, XylSLys45, XylSTRp45 y XylSMet45, respectivamente, y se cultivaron 5 horas a 30°C en agitación en medio LB suplementado con los benzoatos que se indican a concentración 1 mM. La actividad β -galactosidasa se determinó según el procedimiento descrito en la sección 6 de Materiales y Métodos. Los niveles basales obtenidos fueron para XylSSer45, XylSGly45, XylSLys45, XylSTRp45 y XylSMet45: 200, 150, 215, 350 y 240, respectivamente. Las abreviaturas utilizadas para los distintos benzoatos son las mismas que en tablas anteriores.

niveles de inducción más bajos con todos los benzoatos que eran efectores de la proteína silvestre que ésta. Así, sólo estimuló el nivel de transcripción 4-5 veces sobre el basal, en presencia de 3- y 4-metil- y 2,3-dimetilbenzoato y entre 2 y 3 veces con 2,4-dimetil-; 2,5-dimetil-; 2-hidroxi-; 3- y 4-metoxibenzoato (Tabla 15). Estos últimos compuestos no son efectores de la proteína silvestre.

Los mutantes XylSGly45, XylSLys45, XylSTrp45 y XylSMet45 presentaron niveles de inducción similares al silvestre con los compuestos mono y disustituidos con grupos metilo o átomos de cloro. Por el contrario, estos mutantes reconocen 3-metoxibenzoato como efector ya que aumentan la expresión desde Pm de 7 a 17 veces con respecto al basal. Es de interés recordar que el mutante XylSThr45 también reconocía 3-metoxibenzoato pero, en oposición con este último mutante, los reguladores XylSGly45 y XylSTrp45 presentaron niveles bajos de activación con 2-hidroxi- y 4-metoxibenzoato. Por otro lado, el mutante XylSLys45 reconocía tanto 2-hidroxi- como 4-metoxibenzoato (Tabla 15).

Entre los mutantes obtenidos cambiando la posición 41 cabe destacar al mutante XylSCys41. Este regulador mediaba altos niveles de expresión desde Pm en ausencia de efectores, estos niveles basales eran de 5 a 8 veces más altos que los descritos para el regulador silvestre (Tabla 16). También es importante subrayar que sólo con 2- y 3-metil- y 2,3-dimetilbenzoato se obtuvieron incrementos en la estimulación de la transcripción desde Pm.

TABLA 16. Actividad β -galactosidasa expresada desde Pm y mediada por los mutantes de XylS aislados por mutagénesis dirigida en la posición 41.

| | Actividad β -galactosidasa (unidades) de Pm::lacZ + | | | | |
|---------|--|-------|-------|-------|-------|
| | Ser41 | Gly41 | Cys41 | Pro41 | Leu41 |
| Ninguno | 44 | 276 | 1118 | 57 | 233 |
| 2MB | 1157 | 359 | 2348 | 2639 | 235 |
| 3MB | 1936 | 3809 | 3913 | 4072 | 232 |
| 4MB | 1602 | 358 | 1342 | 2480 | 229 |
| 2,3DMB | 1905 | 2098 | 3242 | 5033 | 230 |
| 2,4DMB | 656 | 300 | 1115 | 661 | 232 |
| 2,5DMB | 1021 | 386 | 1453 | 1938 | 232 |
| 2,6DCB | 119 | 274 | 1110 | 120 | 232 |
| 3,4DMB | 62 | 275 | 1121 | 131 | 233 |
| 3,5DMB | 40 | 270 | 1131 | 46 | 232 |
| 2OHB | 286 | 331 | 1118 | 1488 | 231 |
| 3MeB | 568 | 469 | 1677 | 3101 | 230 |
| 4MeB | 145 | 271 | 1230 | 291 | 239 |

La cepa de *E. coli* 5K (pJLR107) se transformó con los los plásmidos pERD836, pERD837, pERD838, pERD839 y pERD840 que codifican para las proteínas XylSSer41, XylSGly41, XylSCys41, XylSPro41 y XylSLeu41, respectivamente. Las condiciones del ensayo son las mismas que en la Tabla anterior.

El regulador XylSGly41 es un mutante que mediaba niveles basales de expresión de Pm similares a los mediados por la proteína silvestre, pero en contraste con todos los demás mutantes descritos en este trabajo, tiene un patrón de efectores sensiblemente más reducido que la proteína silvestre (Tabla 16). El cambio de arginina a glicina en el aminoácido 41 condujo a un regulador que sólo activa Pm de forma considerable en presencia de 3-metilbenzoato y ligeramente, esto es de 2 a 3 veces, en presencia de 3-metoxi- y 2,3-dimetilbenzoato (Tabla 16).

Los niveles basales de expresión desde Pm mediados por los reguladores mutantes XylSSer41 y XylSPro41 y medidos como actividad β -galactosidasa fueron unas tres veces menores que los que se obtuvieron con la proteína silvestre (Tabla 16). Sin embargo, los valores absolutos de actividad β -galactosidasa que se alcanzaron con los distintos benzoatos fueron similares a los obtenidos con el silvestre y los otros mutantes definidos en este apartado. Debido a esto, los niveles de inducción fueron los más elevados (hasta 90 veces). Estos mutantes presentaron un perfil de efectores amplio siendo capaces de mediar altos niveles de expresión desde Pm con 2,4- y 2,5-dimetil- y 2-hidroxi- y 4-metoxibenzoato, reconociendo también 2,6-diclorobenzoato como efector. Finalmente, sería interesante señalar que el 3,4-dimetilbenzoato, un buen efector del regulador silvestre, es sólo un efector débil de XylSPro41 y no parece ser reconocido en absoluto por XylSSer41 (Tabla 16).

TABLA 17. Perfil de inductores de los mutantes de *xylS* aislados mediante mutagénesis por bisulfito en el sitio *NcoI*.

| Efector | Actividad β -galactosidasa (unidades) | | |
|---------|---|-------|-------|
| | Pm::lacZ + | | |
| | Tyr91 | His89 | Ser92 |
| Ninguno | 1150 | 310 | 245 |
| 2MB | 1080 | 1650 | 1300 |
| 3MB | 990 | 3260 | 4705 |
| 4MB | 970 | 1585 | 1375 |
| 2,3DMB | 1150 | 2650 | 4040 |
| 2,4DMB | 1100 | 665 | 510 |
| 2,5DMB | 1175 | 1350 | 1620 |
| 2,6DCB | 1175 | 340 | 310 |
| 3,4DMB | 995 | 385 | 330 |
| 3,5DMB | 1035 | 290 | 230 |
| 2OHB | 1045 | 725 | 480 |
| 3MeB | 920 | 1695 | 2420 |
| 4MeB | 650 | 350 | 355 |

La cepa de *E. coli* 5K (pJLR107) se transformó con los plásmidos pERD843, pERD844 y pERD845 que codifican los reguladores XylTyr91, XylSHis89 y XylSSer92. Las condiciones para el ensayo fueron las mismas que en la Tabla 15.

El mutante XylSLeu41 aunque mostraba niveles basales de actividad β -galactosidasa similares a los del regulador silvestre, había perdido la capacidad de estimular la transcripción desde Pm, cualquiera que fuese el derivado del ácido benzoico presente en el medio.

Entre las proteínas aisladas por mutagénesis con bisulfito en el sitio de restricción del enzima *Nco*I del gen silvestre, se distinguieron dos grupos. El primer grupo lo compone la proteína XylSTyr91 que es un regulador que presentaba niveles basales de 5 a 8 veces más elevados que el regulador silvestre, pero que perdía toda capacidad de inducirse en presencia de los distintos benzoatos añadidos (Tabla 17).

El segundo grupo lo constituían, XylSHis89 y XylSSer92, mutantes que mediaban niveles basales de activación desde Pm similares a los del silvestre, pero cuyo perfil de efectores era más amplio que el del silvestre, reconociendo no solo 2-, 3- y 4-metil- y 2,3-dimetilbenzoato -efectores de XylS- sino también otros benzoatos como 2-hidroxi-; 2,5-dimetil- y 3-metoxibenzoato (Tabla 17).

3.4.-Afinidad aparente por 3-metilbenzoato de los mutantes descritos en esta sección.

Para determinar la naturaleza de las interacciones entre los aminoácidos mutagenizados de la proteína XylS y el efector, se midió la constante de disociación aparente (K'_d) de las proteínas mutantes

por 3-metilbenzoato. La cepa de *E. coli* 5K (pJLR107) se transformó con los plásmidos pERD833, pERD834, pERD835, pERD836, pERD837, pERD838, pERD839, pERD841, pERD842, pERD844 y pERD845. En las células transformantes se determinó la K' , para 3-metilbenzoato como se ha descrito en el apartado 4 de la sección 1 de Resultados. Los resultados obtenidos con los mutantes descritos en esta sección se muestran en la Tabla 18.

En base a los valores de K' , se distinguieron 3 grupos de mutantes. Los mutantes XylSGly45, XylSLys45, XylSSer41 y XylSGly41, al igual que los mutantes en la zona *NcoI* XylSHis89 y XylSSer92, presentaban valores de K' , que oscilaban entre 200 y 500 μM , valores similares a los de la proteína silvestre, XylS ($\sim 350 \mu\text{M}$).

Las mutaciones que conducen a los cambios Cys41, Pro41, Trp45 y Met45 presentan una afinidad por 3-metilbenzoato al menos dos veces más elevada que la proteína silvestre, entre 40 y 100 μM , aunque ninguna alcanzaba los valores obtenidos por el mutante XylSThr45, descrito en la sección 1 de Resultados, en el que dicho cambio en la posición 45 aumentaba la afinidad hasta valores de K' , menores de 5 μM .

Por último, para el mutante XylSSer45 se midieron valores de K' , del orden 700 μM , por lo que lo consideramos en un grupo aparte, ya que ha perdido al menos la mitad de la afinidad por 3-metilbenzoato comparado con la proteína silvestre.

TABLA 18. Afinidad aparente por 3-metilbenzoato de mutantes de XylS descritos en la sección 3 de Resultados.

| 5K p(JLR107) + | K', por 3MB (μ M) |
|---------------------|------------------------|
| pERD833 (XylSSer45) | 450 |
| pERD834 (XylSGly45) | 500 |
| pERD836 (XylSSer41) | 700 |
| pERD837 (XylSGly41) | 400 |
| pERD808 (XylSCys41) | 200 |
| pERD839 (XylSPro41) | 500 |
| pERD840 (XylSLeu41) | 200 |
| pERD841 (XylSTrp45) | 50 |
| pERD842 (XylSMet45) | 100 |
| pERD844 (XylSHis89) | 40 |
| pERD845 (XylSSer92) | 40 |

La cepa de *E. coli* 5K (pJLR107) se transformó con los plásmidos pERD833, pERD834, pERD835, pERD836, pERD837, pERD838, pERD839, pERD841, pERD842, pERD844 y pERD845, que codifican los reguladores mutantes XylSSer45, XylSGly45, XylSSer41, XylSGly41, XylSCys41, XylSPro41, XylSLeu41, XylSTrp45, XylSMet45, XylSHis89 y XylSSer92, respectivamente. Las condiciones para la determinación de la K', son las descritas en la leyenda de la Figura 16 y de la Tabla 5 de la sección 1 de Resultados.

4.-ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA XYLS Y SUS MUTANTES.

A pesar de los esfuerzos realizados en distintos laboratorios no ha sido posible purificar la proteína XylS. Por ello, no se dispone de datos sobre la estructura de la misma.

Con objeto de establecer algunos puntos en relación a la posible estructura de este regulador hemos utilizados distintos algoritmos desarrollados por otros investigadores y recogidos en los programas comerciales PC-GENE (Universidad de Ginebra) y GCG (Universidad de Wisconsin).

4.1.-Composición aminoácidica.

Para lograr esta información, se usó la sección del PC-GENE que predice las posibles "secuencias de lectura abiertas" (open reading frames) y las traduce en su correspondiente secuencia de aminoácidos. Además, para cada secuencia de aminoácidos estima no

sólo la composición aminoácídica sino también el punto isoeléctrico teórico y la vida media.

El peso molecular estimado para XylS es de aproximadamente 36 kDaltons (Inouye *et al.*, 1987; Mermoud *et al.*, 1987). De las posibles fases de lectura, sólo aquélla que asigna 321 residuos aminoacídicos a XylS (PM = 36.502 Da) se ajusta a dicho peso molecular. La secuencia deducida para la proteína silvestre XylS se representa en la Figura 15 de la sección 1 de Resultados.

La vida media se estimó de acuerdo con el algoritmo de Bachmair *et al.*, 1986. Si el regulador silvestre conserva la primera metionina, la vida media se estimó en 20 horas. Sin embargo, si el primer aminoácido en la proteína madura es el aspártico codificado por el segundo codón, la vida media determinada es de 3 minutos. La información de la que se dispone sobre los intentos de purificar la proteína y sobre experimentos de marcaje de la misma con metionina radiactiva, sugieren que la metionina codificada en primer lugar se pierde en la proteína madura (Birgit Keßler, comunicación personal).

El punto isoeléctrico estimado para XylS es de 7,54.

En todos los mutantes descritos anteriormente, la composición de aminoácidos y la secuencia varía en las posiciones señaladas.

El punto isoeléctrico de todas las proteínas mutantes estuvo en el intervalo entre 6,99, para XylSHis42Gly152, y 7,78, para XylSArg256, XylSLeu88Arg256 y XylSVal288.

4.2.-Flexibilidad de la proteína.

Para predecir la flexibilidad de la proteína en cada punto se uso el programa "Flexpro" que se basa en el algoritmo descrito por Karplus y Schulz, 1985.

Este método considera tanto la flexibilidad de cada aminoácido *per se*, como la de los que lo rodean en la secuencia primaria de la proteína. Existe un valor normalizado para cada aminoácido que gira en torno a 1, si dicho valor es mayor que 1, el aminoácido se considera flexible y, si es menor, rígido. Los aminoácidos considerados como rígidos son: alanina, valina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina, triptófano, cisteína, metionina e histidina. Las zonas de mayor flexibilidad de la proteína silvestre se resumen en la Tabla 19 y, en la Figura 19, se representa la flexibilidad relativa en cada punto de la proteína. La región entre los residuos 37 y 43, donde se encuentran varios de las mutaciones descritas en este trabajo, representa la zona de máxima flexibilidad.

Se efectuó el mismo análisis con los mutantes descritos en apartados anteriores de Resultados y en todos, salvo la proteína XylSHis41, la región de mayor flexibilidad relativa fue la zona entre los residuos 37 y 43. En el regulador XylSHis41, el cambio de la posición 41 (Arg-->His) hace que la zona comprendida entre los aminoácidos 37 a 43 gane en rigidez (flexibilidad relativa = 1,063), siendo la región de 206 a 212 la más flexible en esta proteína.

TABLA 19. Regiones de mayor flexibilidad de la proteína XylS de acuerdo con el programa "Flexpro".

| | Desde | Hasta | B | Secuencia |
|----|-------|-------|-------|-----------------------------|
| 1 | 37 | 43 | 1,099 | Pro-Lys-Gly-Gly-Arg-Pro-Ala |
| 2 | 206 | 212 | 1,085 | Phe-Ser-Lys-Gly-Asn-Pro-Ser |
| 3 | 6 | 12 | 1,068 | Leu-Asn-Glu-Lys-Ser-Gln-Ile |
| 4 | 307 | 313 | 1,067 | Glu-Leu-Pro-Ser-Asp-Thr-Leu |
| 5 | 252 | 258 | 1,056 | Ala-Gly-Thr-Thr-Arg-Lys-Asn |
| 6 | 141 | 147 | 1,05 | His-Lys-Pro-Arg-Glu-Gly-Ile |
| 7 | 89 | 95 | 1,047 | Arg-Gly-His-Gly-Gln-Glu-His |
| 8 | 115 | 121 | 1,046 | Tyr-Ser-Glu-Asp-Cys-Glu-Lys |
| 9 | 261 | 267 | 1,045 | Arg-Asn-Arg-Lys-Leu-Glu-Ser |
| 10 | 197 | 203 | 1,041 | Leu-Gly-Ser-Asn-Val-Ser-Arg |

B indica el valor de flexibilidad estimado de acuerdo con el algoritmo de Karplus y Schultz, 1985.

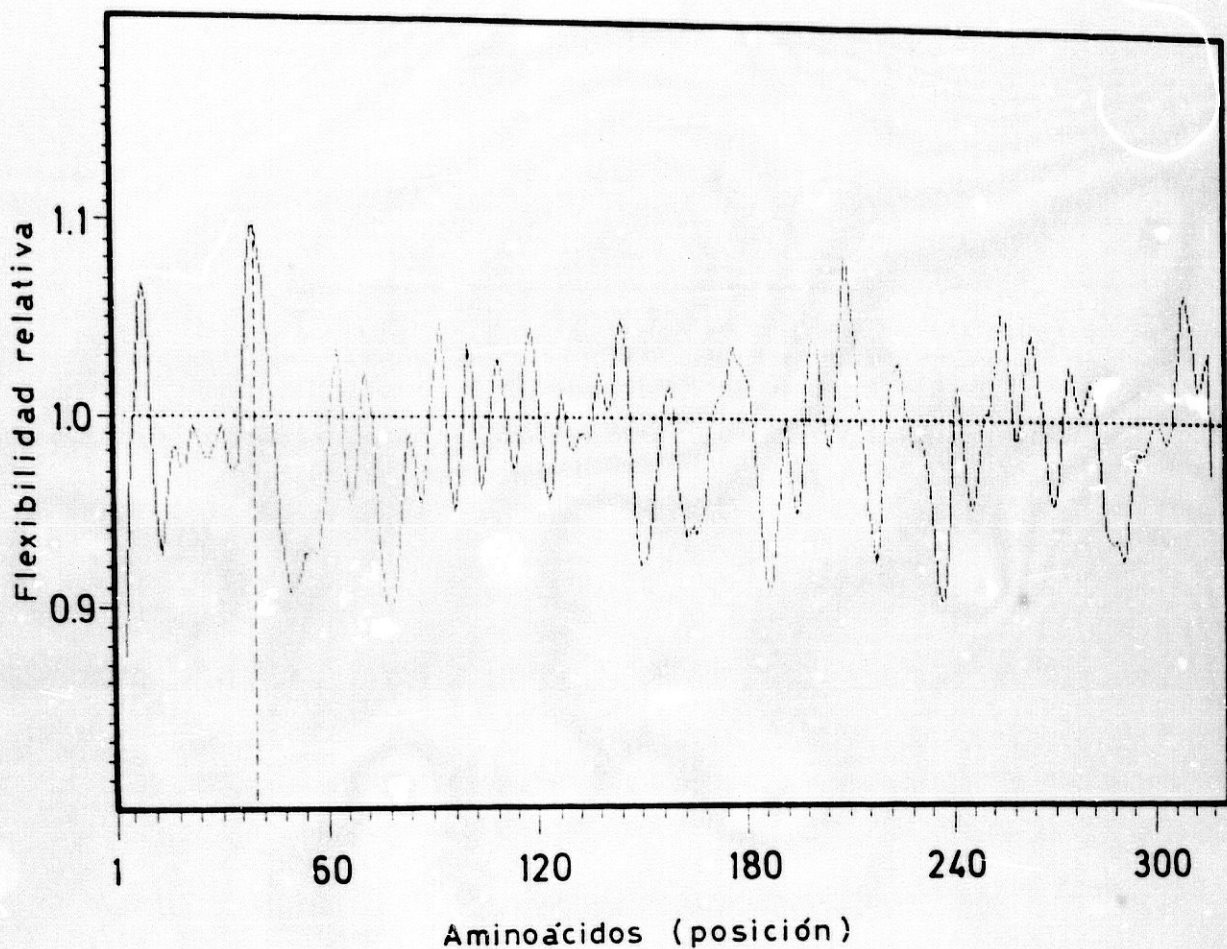


FIGURA 19. Flexibilidad relativa de la proteína XylS. Se representan los valores de flexibilidad relativa obtenidos en cada punto de la proteína mediante el programa "Flexpro". En ordenadas se representa la flexibilidad relativa y en abcisas la posición de cada aminoácido. Los valores mayores indican posiciones más flexibles. El punto de máxima flexibilidad aparece señalado por una línea discontinua.

Paralelamente, en los dobles mutantes sólo presentaron variación los cinco que portaban el cambio de arginina a histidina en la posición 41 de la proteína, XylSHis41Gly152, XylSHis41Val288, XylSHis41Arg256, XylSHis41Ile229 y XylSHis41Val274, siendo esta variación en la flexibilidad de la proteína similar a la de la proteína mutante sencilla, XylS41.

Los mutantes aislados por mutagénesis con bisulfito, XylSTyr91, XylSHis89 y XylSSer92, sólo presentaron diferencias en la flexibilidad de la región que va desde el aminoácido de la posición 89 hasta el que ocupa la posición 95. La región en general pasa a ser más rígida, la flexibilidad decreció de 1,047 a valores ligeramente inferiores, por ejemplo, 1,035 para XylSHis89.

Por último, en los mutantes aislados por mutagénesis dirigida con oligonucleótidos en las posiciones 41 y 45 de la proteína silvestre, descritos en la sección 3 de Resultados, se dieron todas las opciones posibles. Todos los reguladores que presentan cambios en la posición 45, XylSSer45, XylSGly45, XylSLys45, XylSTrp45 y XylSMet45, y la proteína con la mutación XylSLeu41, no presentaron cambios de flexibilidad apreciables. Para XylSSer41, XylSGly41 y XylSPro41 se predijo un aumento en la flexibilidad de la zona, siendo el cambio de la arginina silvestre a serina el más flexible, y el cambio a prolina el que menos se diferenció de la proteína silvestre (Tabla 20). En la proteína XylSCys41, se produjo el mismo efecto que en

TABLA 20. Flexibilidad relativa de XylS y los mutantes en la posición 41 aislados por mutagénesis dirigida con oligonucleótidos.

| Proteína | Zona considerada | | Valor de flexibilidad |
|-----------|------------------|-------|-----------------------|
| | Desde | Hasta | |
| XylS | 37 | 43 | 1,099 |
| XylSSer41 | 37 | 43 | 1,124 |
| XylSGly41 | 37 | 43 | 1,119 |
| XylSPro41 | 37 | 43 | 1,103 |
| XylSLeu41 | 37 | 43 | 1,099 |
| XylSCys41 | 36 | 42 | 1,060 |

XylSHis41, una bajada de flexibilidad hasta pasar al cuarto lugar según el orden establecido en la Tabla 19.

4.3.-Estructura secundaria.

Se usó el algoritmo de Garnier *et al.*, 1978, para predecir estructuras secundarias: α -hélice, hoja plegada en β , giro y estructura no definida. Este algoritmo predice, con un 56 % de confianza, la estructura secundaria de proteínas cuya estructura terciaria es conocida por difracción de Rayos X (Garnier, 1990).

Para cada aminoácido de una secuencia, el algoritmo calcula cuatro ecuaciones, una para cada estado conformacional. Los valores asociados con cada aminoácido se basan en estudios de proteínas de las que se conoce su estructura terciaria por cristalografía y en los que se relaciona dicha estructura terciaria con la estructura primaria.

En la Tabla 21 se representa la estructura secundaria deducida para XylS. De acuerdo con el algoritmo de Garnier *et al.*, 1978, se predice que en α -hélice hay 138 aminoácidos (lo que representa un 42,9 %), en hoja plegada β 114 (35,5 %), en giro 38 (11,8 %), y sin estructura definida 31 (9,6 %). La región amino terminal de XylS es rica en hoja plegada β (desde el aminoácido 12 hasta el 74), mientras que la región carboxilo terminal es rica en α -hélice (desde el aminoácido 167 hasta el 321). En contraste, la zona que queda entre esta dos no tiene una estructura predominante. De acuerdo con la clasificación de Levitt y Chothia (1976) la proteína

TABLA 21. Estructura secundaria de la proteína XylS.

1 **H H H H H H H H H H H H H H** E E E E E E C H T H E E E E E
 26 **E E E E E E E E E E E E** T T T C C C E E E E E E E E E
 51 E T T E E E E E E T T T T E E E E E E C T C E E H
 76 H H H H E E E E T T E T T T C C C C E E E C H H
 101 H H E E E C H T H H H E E E H H H H H H H H H
 126 E E E E E E E E E T T T T T C C C T T H H H H
 151 H H H C H E E E E E E F E E E E H H H H H H H H
 176 H C H
 201 H H E E E T T C C C E E E E E H H H H H H H H
 226 H
 251 H T T C C C T E E E E E T E E E E E E E E E C C C
 276 T C E E E E E E E E E H H H H H H E E C H H H H
 301 T T C T E E E C T T H H H H H H H H H H H

Se representa la estructura de la proteína XylS de acuerdo con el algoritmo de Garnier et al. (1978). Las letras representan las cuatro estructuras consideradas: H, α -hélice; E, hoja plegada en β ; T, giro; y C, zona sin estructura definida. Las zonas con 5 ó más aminoácidos con la misma estructura secundaria se señalan con letras en negrita.

XylS pertenece al grupo III, las proteínas $\alpha + \beta$, las cuales poseen un dominio en α -hélice y otro en hoja plegada β .

En la zona carboxilo terminal se localiza una zonas en α -hélice-giro- α -hélice (HTH) entre las posiciones 230 y 250. Aunque el giro de las posiciones 230/250 no es evidente usando el algoritmo de Garnier, sí se predice al utilizar el algoritmo de Chou y Fasman (1979) que predice un giro entre las posiciones 240 y 243, cuya secuencia es Ser-Pro-Arg-Ser. Este tipo de estructura se ha asociado con zonas de unión al ADN. Al ser XylS un regulador que actúa sobre Pm aparentemente sin necesidad de ninguna otra proteína, se supone la existencia de una zona de contacto entre ambos elementos que se localizaría en estas regiones (Pabo y Sauer, 1984; Zvelebil *et al.*, 1987).

Apoiando esta hipótesis, en el mutante puntual XylS1le229 (Zhou *et al.*, 1990), el cambio que conduce a un fenotipo constitutivo se localiza adyacente a esta región.

En todos los mutantes descritos se efectuó el mismo análisis. Los efectos fueron locales y, en el caso de los mutantes dobles, aditivos. Los cambios más bruscos fueron detectados en las regiones desde el aminoácido 85 a 95 y desde el 145 al 155, donde algunas mutaciones como XylSLeu88 pueden provocar la aparición de grandes zonas de giro.

4.4.-Índice de hidropatía.

Los algoritmos de Klein *et al.* (1985) y Kyte y Doolittle (1982) se utilizaron para predecir el índice de hidropatía a lo largo de la proteína XylS. Este índice sugiere las zonas que quedan en el exterior (hidrofílicas), y en el interior de la estructura terciaria (hidrofóbicas).

Los cálculos se realizaron asignando a cada aminoácido un valor normalizado de acuerdo a sus características y calculando la media de intervalos de 9 residuos, asignándose el valor obtenido al aminoácido que ocupaba la posición central. Se calculó el valor para todas las posiciones de la proteína y si el resultado obtenido es mayor que -5, la predicción es de zona hidrofóbica.

En la Figura 20, se representa el índice de hidrofobicidad obtenido en cada zona de la proteína XylS.

En la región amino terminal se aprecia la existencia de una zona hidrofóbica desde el residuo 50 hasta el 90. En la zona carboxilo terminal el valor global de hidropatía desde la posición 200 hasta la 321 es ligeramente menor que -5, por lo que se sugiere que esta zona es predominantemente hidrofílica. Por el contrario, en la zona central se suceden pequeñas regiones que muestran una u otra característica sin una definición general clara. En los distintos mutantes se aprecian cambios muy localizados y de escaso margen.

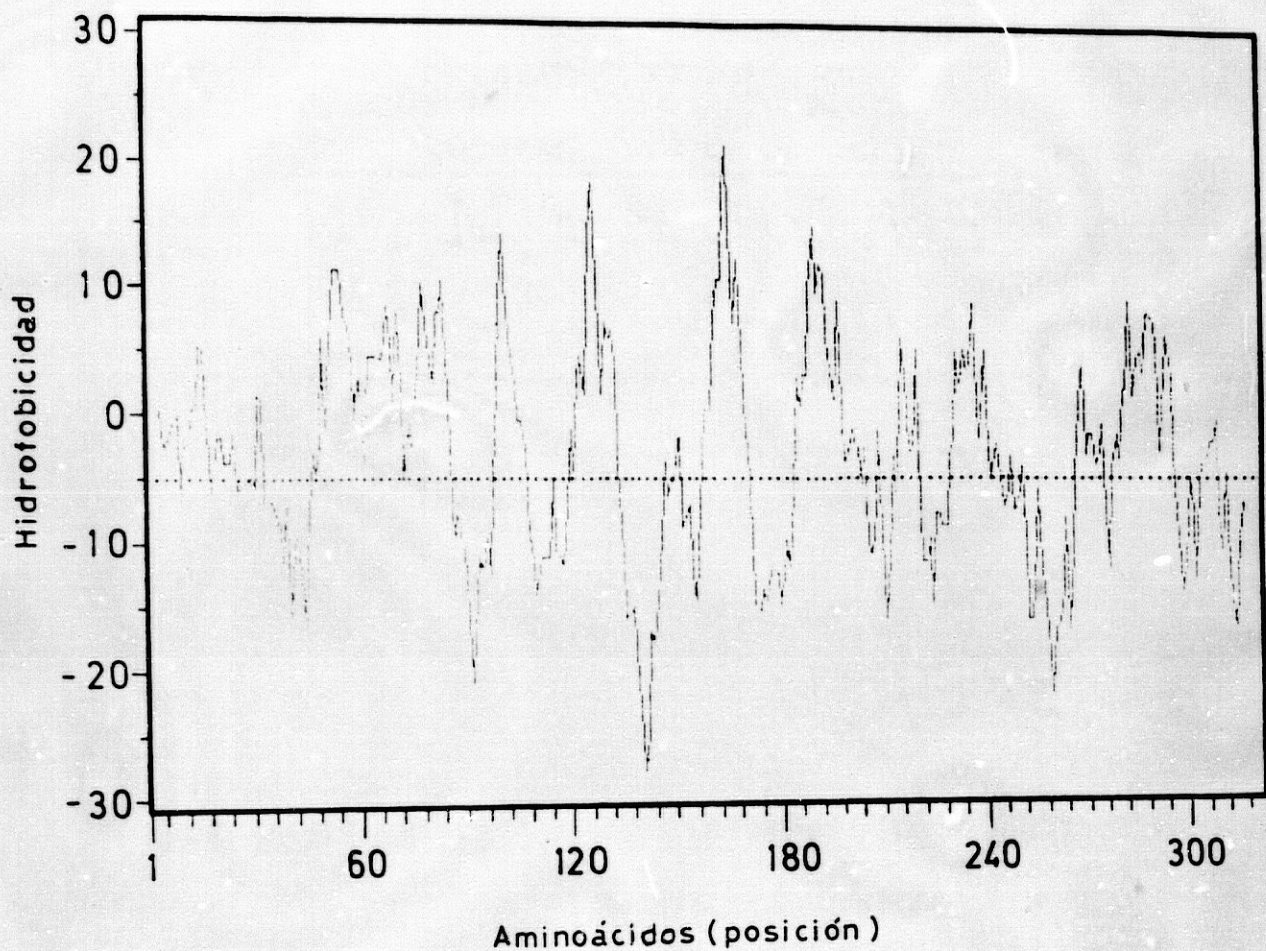


FIGURA 20. Índice de hidropatía de la proteína XylS. Se representan los valores que predice el algoritmo de Kyte y Doolittle para la hidropatía de los distintos puntos a lo largo de toda la proteína XylS (ordenadas) frente a la posición de cada aminoácido (abcisas). Los valores superiores a -5 indican regiones hidrofóbicas.

4.5.-Similitud con otras proteínas.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína XylS se realizó con las secuencias archivadas en el banco de datos "Swiss protein release 13" (Amos Bairoch, Universidad de Ginebra, Suiza) así como con secuencias publicadas por otros autores o suministradas a este grupo previamente a su publicación.

El análisis de similitud se realizó utilizando algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) con las modificaciones de Feng *et al.* (1985) tal y como se recoge en el programa P-compare del paquete comercial PC-GENE (Intelligenetics, Inc). El algoritmo compara las proteínas dos a dos, y calcula un valor de similitud, S, mediante un sistema matricial que considera la semejanza de los diferentes aminoácidos entre sí. La comparación de proteínas se realiza mediante la selección al azar del punto de iniciación, repitiéndose el procedimiento entre 10 y 100 veces. Si el valor de similitud, S, es mayor o igual a 3 se considera que las dos proteínas comparadas presentan homología significativa.

Utilizando este algoritmo Ramos *et al.* (1990) encontraron que XylS es homóloga con las proteínas de *E. coli*: AraC, RhaS, RhaR, MelR y Rns, VirF de *Yersinia enterocolitica* y AraC de *Erwinia carotovora*. Los nuevos análisis revelaron que otras proteínas como VirF y M5 de *E. coli*, AdaA de *B. subtilis*, XylS1, XylS2 y XylS3 codificadas en el plásmido TOL pWW53, y XylS del plásmido pDK1 eran homólogas con AraC y/o XylS (Tabla 23).

TABLA 23. Similitud entre reguladores de la familia de XylS/AraC.

| | XylS | AraC | RhaS | RhaR | MelR | VirF | Rns | M5 | AdaA | TetD |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| XylS | 52 | 6,6 | 9,4 | 12,2 | 4,9 | 4,7 | 2,5 | 0,8 | 0,9 | 1,7 |
| AraC | 6,8 | 51,5 | 6,4 | 7,6 | 3,5 | 4,7 | 2,1 | 4 | 4 | 1,6 |
| RhaS | 10 | 5,4 | 59 | 14,4 | 5,8 | 6,3 | 6,7 | 2,8 | 4 | 1,6 |
| RhaR | 10,9 | 6,4 | 19,3 | 39,9 | 4 | 3,3 | 8 | 3,3 | 3,6 | 0,6 |
| MelR | 4,1 | 3,5 | 6,8 | 5,6 | 52,4 | 6,3 | 3,5 | 11,2 | 11,2 | 2,4 |
| VirF | 3,9 | 4,7 | 8 | 5,2 | 4,5 | 71,5 | 7 | 3,1 | 2,2 | 0,9 |
| XylS1 | 57 | 4 | 6,1 | 6,2 | 6,6 | 5,3 | 2,9 | 1 | 2,4 | 3,9 |
| XylS2 | 19,1 | 0,1 | 0,7 | -0,4 | -0,1 | 0,1 | 0 | 0,4 | 2,4 | 6,5 |
| XylS3 | 58,5 | 3,4 | 6,3 | 8,3 | 6,7 | 10,3 | 1,2 | 0,8 | 2,6 | 7 |
| XylSD | 64,5 | 3,7 | 8,2 | 8,2 | 6,1 | 4 | 2 | 2,4 | 2,5 | 4,7 |
| Rns | 2,9 | 2,1 | 3,4 | 4,9 | 6,1 | 4,1 | 66,6 | 11,8 | 1,1 | 0,4 |
| M5 | 0,9 | 4 | 2,8 | 3,3 | 3,3 | 3,1 | 11,8 | 109 | 3,6 | 1,8 |
| AdaA | 0,9 | 5 | 4 | 3,6 | 11,2 | 2,1 | 1,1 | 3,9 | 42,1 | 2,4 |
| TetD | 1,7 | 2,3 | 1,6 | 2,4 | 2,4 | 0,9 | 0,4 | 0,9 | 3,7 | 45,6 |

Se especifican los valores de similitud, S, obtenidos al comparar las proteínas que se indican utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970). En negrita, se señalan las comparaciones en las que el valor de similitud fue mayor o igual que 3. XylS indica la proteína codificada por el plásmido pWWO y XylSD aquella codificada por el plásmido pDK1. VirF es la proteína de *E. coli*.

A su vez, todas las secuencias anteriores se compararon con el banco de datos "Swiss Protein" y secuencias recogidas de la literatura no incluidas en dicho banco de datos.

Estos análisis revelaron homología de las proteínas XylS1, XylS2, XylS3 y XylS de pDK1 con el regulador TetD de Tn10 (S entre 3,9 y 7, Tabla 23), y de RhaR con la proteína MGMT de origen humano (S = 4,2, dato no mostrado).

Dentro de este grupo de reguladores es de interés señalar la distinción de dos subgrupos, en uno de ellos todos los miembros entre sí presentan un índice de similitud mayor de 3, e incluye los reguladores XylS de pWW0 y pDK1, XylS1 y XylS3 de pWW53, AraC de *E. coli* y *E. carotovora*, RhaR, RhaS y MelR de *E. coli*, y VirF de *Y. enterocolitica* y de *E. coli*. El otro subgrupo incluye reguladores cuyo valor de similitud no fue siempre mayor que 3 con las del grupo anterior y lo forman las proteínas, XylS2 de pWW53, TetD de Tn10, AdaA de *B. subtilis* y Rns y M5 de *E. coli*.

El algoritmo de Needleman y Wunsch indica la similitud global entre dos proteínas. Para encontrar si la homología se distribuye de manera uniforme o si se restringe a determinadas zonas se efectuó el alineamiento de estas proteínas utilizando la sección "Pileup" del programa GCG desarrollado en la Universidad de Wisconsin y que utiliza una simplificación del algoritmo desarrollado por Feng y Doolittle (1987). Este método alinea las proteínas progresivamente, esto es, empieza alineando dos y toma el resultado como una sola proteína

para alinear la siguiente y así sucesivamente. Además, inserta huecos para optimizar el alineamiento. Es de señalar que para evitar distorsiones introducidas por una misma proteína de distintas fuentes se utilizó una secuencia de AraC y VirF en ambos casos de *E. coli*, y XylS de pWW0, por lo que en total se utilizaron 10 secuencias de aminoácidos incluyendo la de TetD.

El alineamiento resultante de las proteínas que componen la familia XylS/AraC se muestra en la Figura 21.

Una vez alineadas las proteínas y para definir la(s) zona(s) de mayor homología se derivó una secuencia consensus, utilizando el siguiente criterio: para cada posición se toma un aminoácido como consensus si aparecía en la misma posición en al menos 4 de las proteínas y en el resto aparecía al menos una vez un aminoácido perteneciente al mismo grupo. Los grupos de aminoácidos considerados son: (a) serina (S), treonina (T), prolina (P), alanina (A) y glicina (G), (b) asparragina (N), aspártico (D), glutámico (E) y glutamina (Q), (c) histidina (H), arginina (R) y lisina (K), (d) metionina (M), isoleucina (I), leucina (L) y valina (V), (e) fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), y (f) cisteína (C). La secuencia consensus se representa en la Figura 21.

La secuencia consensus reveló que la máxima homología de estas proteínas se concentra en la zona carboxilo terminal de las mismas, concretamente entre las posiciones 220 y 321 de XylS. Además, existen dos pequeñas zonas alrededor de las posiciones 105

y 195 de XylS que en todas estas proteínas son ricas en aminoácidos del grupo de la leucina.

FIGURA 21. Alineamiento y secuencia consensus de las proteínas de la familia XylS/AraC. Las distintas proteínas se indican por su nombre seguidas de las iniciales de la especie a la que pertenecen. La proteína XylS utilizada es la codificada por el plásmido pWVO y las proteínas AraC y VirF las de *E. coli*. En la parte inferior del alinamiento y en letra negrita se representa la secuencia consensus.

| | 1 | 50 |
|-----------|------------|---|
| AdaA-Bs | | |
| M5-Ec | | |
| Rns-Ec | | |
| XylS-Pp | MDFCLLNEKS | QIFVHAEPYA VSDYVNQYVG THSIRLPKGG RPAGRLHHRI |
| AraC-Ec | |MAEAQNDPL LPGYSFNAHL |
| VirF-Ec | | |
| RhaR-Ec |MAF | ANNANLLNVF VRHIANNQLR SLAEVATVAH QLKLLKDDFF |
| RhaS-Ec | |MTVLH SV.....DF |
| MelR-Ec | |M NTDTFMCSSD EKQTRSPLSL |
| TetD-Tr10 | | |
| | |----- |

AdaA-Bs
 M5-EcMDYVCSVCF ICQSFDLII. .NRRVISFKK
 Rns-EcMDFKYT EEKETIKINN IMIHKYTVLY TSNCIMDIYS EEEKITCFNS
 XylS-Pp FGCLDLCRIS YGGSVRVISP GLETCYHLQI ILKGHCLWRG HGQEHYFAPG
 AraC-Ec VAGLTPIEAN GYLDFIDRP LGMKGYILNL TIRGQGVKN QGREFVCRPG
 VirF-Ec MASLEIIKLE WATPIFKVVE HSQD..GLYI LLQGQISWEN SSQTYDLDEG
 RhaR-Ec ASDQQAVAVA DRYPODVFAE HTHDFCELVI VWRGNGLHVL NDRPYRITRG
 RhaS-Ec PSGNASVAIE PRLPQADFPE HHHDFHEIVI VEHGTGIHVF NGQPYTITGG
 MelR-Ec YSEYQRMIE FRAPHIMPTS HWHGQVEVNV PFDGDVEYLI NNEKVNINQG
 TetD-Tn10
 -----P-----L-I---G-----G

AdaA-BsMPDS INNGHESH
 M5-Ec NSLFI...VS DKIRREL PVC PSKL.....RIV DIDKKTCLSF
 Rns-Ec RLVFLERGVN ISVRMQKQIL SEKP.....YVA FRLNGDMLRH
 XylS-Pp ELLLLNPDDQ ADLTYSED..CEKFI VKLPSVVLDR
 AraC-Ec DILLFPPGEI HHYGRHPEA.REWYHQWV YFRPRAYWHE
 VirF-Ec NMLPLRRGSY AVRCGTKEPC QLLWIPLPGS FLSTFLHRFG SLLSEIRRDN
 RhaR-Ec DLFYIHADDK HSYASVN... ..DLV.. LQNIY.CPE RLKLNLDWQG
 RhaS-Ec TVCFVRDHR HLYEHTD... ..NLC.. LTNVLYRSPD RFQFLAGLNQ
 MelR-Ec HITLFWACTP HQLTDTGTCQ SMAIFNLP.. MHLFLSWPLD KDLINHVTG
 TetD-Tn10
 --L-----

AdaA-Bs HRISNDAEMI TDEKWQAIIN NDAAYNNQFF YAVKSTGIFC KPSCKSRVPK
M5-Ec FIDVNNELPG KFTLDKNGYI AEEEPPLSLV F..SLFEGIK IADSHSLWLK
Rns-Ec LKDALMIIYG MSKIDTNACR SMSRKIMTTE VNKTLLDELK NINSHD...N
XylS-Pp ACSDNNWHKP REGIRFAARH NLQQLDGFIN LLGLVCDFAE HTKSMPRVQE
AraC-Ec WLNWPSIFAN TGFF..... R.PDEAHQPH FSDLFGQIIN AGQEGEGRYSE
VirF-Ec ATPKPLLIFN ISPILSQSIQ NLCAMLERSD FPSVLTQLRI EELLLLLAFS
RhaR-Ec AIPGFNASAG QPHW..... RLGSMGMA.Q ARQVIGQLEH ESSQHVPFAN
RhaS-Ec LLPQELDCQY PSHW..... RVNHSVLQ.Q VRQLVAQMEQ QEGENDLPST
MelR-Ec MVIKSLATQQ LSPF..... EVRRWQQELN SPNEIRQLAI DEIGLML...
TetD-Tn10MYIEQ HSRY..... Q.....N KANNI.QLEY DDRQFHT...
-----S-----QL-----

AdaA-Bs KENVCIFPNT EQALRANFRP CKRCKPTNEK MPDSEWVDLI TEYIDKNFTE
M5-Ec ERLCISLLAM FKKRES.... VNSFILTNIN TFTCKITGII SFNIE...RQ
Rns-Ec SAFISSLIYL ISKLENNEKI IESIIYISSVS FFSKVRNLI EKDLS...RK
XylS-Pp HYAGIIASKL LEMLSN... VSREIFSKGN PSFERVVQFI EENLK...RN
AraC-Ec LLAINLLEQL LL...RRMEA INESLHPPMD NRVREACQYI SDHLA...DS
VirF-Ec SQGALFLSAL RHLGNRPE.. ERLQKFM EENYL...QG
RhaR-Ec EMAELLFGQL VMLLRHRYT SDSLPPTSSE TLLDKLITRL AASK...SP
RhaS-Ec ASREILFMQL LLLLRKSSLO EN...LENSA SRLNLLLAWL EDHFA...DE
MelR-Ec .KRFSLSGWE PILVNKTSRT HKNSVSRHAQ FYVSQMLGFI AENYD...QA
TetD-Tn10 .T..... .VIKDVLWI EHNLD...QS
----L---L--LL-----I EENL-----

AdaA-Bs KLTLESLADI CHGSPYHMR TFKKIKGITL VEYIQQVRVH AAKKYLIQTN
 M5-Ec .WHLKDIAEL IYTSESLIKK RLRDE.GTSF TEILRDTRMR YAKKLITSNS
 Rns-Ec .WTLGIIADA FNASEITIRK RLESE.NTNF NQILMQLRMS KAALLLENS
 XylS-Pp .ISLERLAEL AMMSPRSLYN LFEKHAGTTP KNYIRNRKLE SIRACLNDPS
 AraC-Ec NFDIASVAQH VCLSPSRLSH LFRQQLGISV LSWREDQRIS QAKLLLSTTR
 VirF-Ec .WKLSKFARE FGMGLTTFKE LFGTVYGISP RAWISERRIL YAHQLLLNGK
 RhaR-Ec .FALDKFCDE ASCSERVLRQ QFRQQTGMTI NOYLQVRVC HAQYLLQHSR
 RhaS-Ec .VNWDVAADQ FLSLRTLHR QLKQQTGLTP QAYLNRLRLM KARHLLRHSE
 MelR-Ec .LTINDVAEH VKLNANYAMG IFQRVMQLTM KOYITAMRIN HVRALLSDTD
 TetD-Tn10 .LLLDDVANK AGYTKWYFQR LFKKVTGVTL ASYIRARRLT KAAVELRLTK
 .--L--VAD- ---S---L-- LF----G-T- --YI---R-- -A--LL--T-

AdaA-Bs ...KAIGDIA ICVGIANAPY FITLFKKKTG QTPARFRQMS KMEETYNGNK..
 M5-Ec ...SINVVA QKCGYNSTSY FICAFKDYYG VTPSHYFEKI IGVTDGINKTID
 Rns-Ec Y...QISQIS NMIGISSA Y FIRIFNKHYG VTPKQFFTYF KGG.....
 XylS-Pp ANVRSITEIA LDYGFHLGR FAENYRSAFG ELPSDTLRQC KKEVA.....
 AraC-Ec ...MPIATVG RNVGFDDQLY FSRVFKKCTG ASPSEFRAGC EEKVNDVAVKLS
 VirF-Ec ...MSIVDIA MEAGFSSQSY FTESYRRRFG CTPSEARLTK IATTG.....
 RhaR-Ec ...LLISDIS TECGFEDSNY FSVVF^TRETG MTPSQWRHLN SQKD.....
 RhaS-Ec ...ASVTDIA YRCGFSDSNH FSTLFRREFN WSP...RDIR QGRDGFLQ....
 MelR-Ec ...KSILDIA LTAGFRSSSR FYSTFGKYVG MSPQQYRKLS QORRQTFPG...
 TetD-Tn10 ...KTILEIA LKYQFDSQQS FTRRFKYIFK VTPSYRRNK LWELEAMH....
 ...-SI-DIA ---GF-S-SY F---FKK--G -TPS--R--- -----

DISCUSIÓN

La expresión del operón que codifica la ruta *meta* del plásmido TOL de la bacteria *Pseudomonas putida* se regula positivamente desde su promotor, Pm, por el producto del gen *xyIS*, la proteína XylS. La transcripción desde Pm, tanto en *P. putida* como en *E. coli*, se estimula en presencia de efectores como benzoato y diversos derivados de éste con grupos metilo, etilo y átomos de fluor, cloro y bromo (Franklin *et al.*, 1983; Inouye *et al.*, 1981; Ramos *et al.*, 1986; Worsey *et al.*, 1978) o por la hiperproducción de la proteína XylS. Esta hiperproducción puede ser debida:

a) A la estimulación de la transcripción desde Ps, el promotor del gen *xyIS*, por la proteína XylR, el regulador de la ruta *upper*, en presencia de sustratos de esta ruta como tolueno y *m*- y *p*-xilenos (Inouye *et al.*, 1987a; Ramos *et al.*, 1987a).

b) Al incremento del número de copias del gen *xyIS* en *E. coli* mediante clonación en vectores con alto número de copias como pEMBL9 (Ramos *et al.*, 1987a).

c) A la clonación del gen *xyIS* bajo el control de promotores de expresión fuerte como P_{tac} (Inouye et al., 1987b; Spooner et al., 1987).

Para averiguar si el mecanismo de activación de esta proteína sobre P_m se debía a un proceso de regulación transcripcional sobre P_s , o a una modificación posterior en la proteína sintetizada, Ramos et al. (1987) determinaron los niveles de ARN mensajero del gen *xyIS* en células de *P. putida* (pWWO) cultivadas en glucosa y en benzoato. En glucosa el nivel de expresión del operon *meta* es muy bajo (actividad catecol 2,3-dioxigenasa del orden de 5 a 10 unidades/mg de proteína), y en benzoato, la expresión del operon es alta (tasa de actividad de catecol 2,3-dioxigenasa del orden de 7.000 unidades/mg de proteína). Los niveles de síntesis del ARN mensajero resultaron ser bajos y similares en ambos casos, representando la velocidad de síntesis del orden del 0,2 % del total de ARN mensajero sintetizado por la célula. Esto sugiere que la estimulación de la transcripción desde P_m es dependiente de benzoato y probablemente implica la activación de XylS por este ácido carboxílico aromático. Es de interés señalar que se han aislado en este trabajo mutantes de XylS (XylSLeu41 y XylSTyr91) que, en presencia de benzoato, no estimulan la transcripción desde P_m . Esto indica que esta proteína se requiere *sine qua non* para la estimulación de la transcripción desde P_m y confirma los resultados de Franklin et al. (1983) obtenidos con

mutantes de *xyIS* que llevaban insertados el transposón Tn5 dentro del gen.

Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* (1991) estudiaron el efecto de la fase de crecimiento celular en la expresión desde Pm. Sus resultados mostraron que, utilizando fusiones de Pm al gen *lacZ* desprovisto de su promotor natural, tanto en *E. coli* como en *P. putida* la activación mediada por XylS en ausencia de efectores era débil en células que estaban en fase exponencial temprana, y fuerte en fase exponencial tardía. Este efecto se mantenía en mutantes de *E. coli* defectivos en los genes *relA*, *crp* y *cya*, indicando que ni el AMP cíclico ni la guanosina 5'-difosfato 3'-difosfato (ppGpp) están implicados en este fenómeno. Resultados similares aunque con grandes fluctuaciones se han obtenido en este laboratorio. Este efecto podría deberse a la acumulación de la proteína XylS dentro de la célula en fases tardías de crecimiento producida por un nivel de expresión constante aunque a bajo nivel del gen *xyIS* desde su promotor Ps. Esta hipótesis explicaría el efecto que se obtiene al clonar *xyIS* en un vector multicopia o al expresarlo desde un promotor fuerte.

Interacción de la proteína XylS con moléculas efectoras.

Con objeto de estudiar las interacciones de XylS con sus efectores se realizaron ensayos de activación de la transcripción desde Pm tanto en *P. putida* como en *E. coli*, utilizando fusiones de este promotor al gen que codifica el enzima β -galactosidasa,

desprovisto de su promotor natural; o en *P. putida*, midiendo el enzima de la ruta *meta* catecol 2,3-dioxigenasa en presencia de al menos 50 análogos del ácido benzoico (Ramos *et al.*, 1986). Los resultados obtenidos fueron similares en todos los casos, decidiéndose entonces medir la inducción desde Pm en *E. coli* portando fusiones de Pm a *lacZ*, ya que la determinación de actividad requiere no sólo menores volúmenes de cultivo al realizarse en células permeabilizadas sino también menores periodos de tiempo.

Una de las características de la molécula de benzoato es que su estructura es plana y simétrica. Por ello, se analizaron las sustituciones que en esta molécula eran permisivas, es decir, grupos o átomos que eran admitidos como sustituyentes en la molécula de benzoato para que permitiesen la activación por XylS de la expresión desde Pm. Estos análisis revelaron que la posición 1 del benzoato sólo permite sustituciones por grupos carboxilos o aldehidos (M. A. Abril, resultados sin publicar; Ramos *et al.*, 1986). De las posiciones 2, 3 y 4 de la molécula efectora, la posición 3 es la más flexible ya que XylS es capaz de reconocer y activarse con derivados del benzoato que portan grupos metilo y etilo, y átomos de fluor, cloro, bromo y yodo en esta posición. En contraste, las sustituciones en las posiciones 2 ó 4 son más restrictivas ya que sólo admiten como sustituyentes el grupo metilo y átomos de cloro y bromo (Ramos *et al.*, 1986 y 1990; Tabla 4 de Resultados).

También se utilizaron benzoatos disustituídos en las posiciones 2,3; 2,4 y 3,4. Los resultados obtenidos mostraron que compuestos como 2,3- y 3,4-dimetil- y 2,3- y 3,4-diclorobenzoato eran efectores de XylS pero no así las correspondientes bisustituciones en las posiciones 2 y 4. Esto sugiere asimismo la mayor permisibilidad de la posición 3 en las sustituciones. Con objeto de determinar si el sitio de unión de efectores es simétrico, se utilizaron como efectores benzoatos bisustituídos en las posiciones 2,5; 2,6 y 3,5. Ninguno de los benzoatos bisustituídos en esas posiciones actuaron como efectores de XylS, incluso cuando los sustituyentes en la posición 6 fueron átomos de fluor. Dado que el tamaño de los átomos de fluor e hidrógeno son similares, se sugiere que la imposibilidad de sustitución de esta posición no implica meramente un impedimento estérico.

Ramos *et al.* (1986) establecieron la siguiente premisa: si la proteína XylS interacciona con las moléculas efectoras, debe ser posible aislar reguladores mutantes que sean capaces de reconocer benzoatos que no activan al regulador silvestre. Mediante el establecimiento de un sistema de selección directa ampliamente descrito por Ramos y Timmis (1987) se aislaron mutantes que se activaban por benzoatos que no eran reconocidos por XylS. La secuenciación de estos mutantes reveló cambios puntuales en XylS y ello demostró unívocamente que la proteína XylS interacciona con los

efectores. El análisis de estos mutantes permitió deducir otras características del sitio de unión al efector:

i) El aislamiento de mutantes de XylS que reconocen benzoatos no efectores del regulador silvestre con sustituyentes en la posición 2, se da con una frecuencia más alta que el de los que presentaban dichas sustituciones en la posición 4 del anillo aromático; la frecuencia de obtención de mutantes que reconocen 2-metoxibenzoato (aproximadamente 10^{-5} utilizando etilmetanosulfonato como agente mutagénico) es superior a la de los que reconocen 4-metoxibenzoato (menor de 10^{-7} con el mismo procedimiento). Este dato vuelve a indicar la ausencia de simetría en el sitio de unión al efector de la proteína XylS (Ramos *et al.*, 1990).

ii) Dado que se han aislado mutantes que reconocen 2,5-dimetil-, 2,6-dimetil- y 3,5-diclorobenzoato, se sugiere que el átomo de hidrógeno en las posiciones 5 y 6 del efector no es un requerimiento *sine quanon* para la activación de XylS, salvo que las alteraciones de los mutantes permita la introducción de átomos o grupos más voluminosos que participen en la estabilización de las interacciones (Ramos *et al.*, 1986 y 1990).

iii) Para la posición 1, no se han encontrado mutantes que reconozcan compuestos como el tolueno o el alcohol benzílico, por lo que es posible que el grupo carboxilo del benzoato o el carbonilo del benzaldehído presentes en esta posición sean imprescindibles para el reconocimiento de los efectores por XylS.

Localización de los distintos dominios funcionales de la proteína XylS

La secuenciación de los mutantes obtenidos en este trabajo y de otros obtenidos en este laboratorio, reveló que en todos los casos se encontraron mutaciones puntuales distribuidas a lo largo de la estructura primaria (Figura 22). Los mutantes secuenciados por otros y señalados en la Figura 22 son XylSLeu37, que permite el reconocimiento de efectores como 3-hidroxibenzoato, además de mostrar altos niveles de actividad en ausencia de efectores (Zhou *et al.*, 1991), así como XylSLeu229 y XylSVal274 (Zhou *et al.*, 1990; Tabla 7 de Resultados).

Como se aprecia en la Figura 22, el sitio de reconocimiento de efectores parece estar constituido por diversos segmentos separados en la secuencia de aminoácidos. La zona carboxilo terminal presenta una estructura secundaria predominantemente en α -helice, y la zona amino terminal, en hoja plegada β . Si el sitio de unión del efector estuviese definido por estos segmentos de manera que en la estructura terciaria estuviesen próximos, darían lugar a un sitio asimétrico que en principio podría explicar las características del perfil de efectores de la proteína silvestre, XylS.

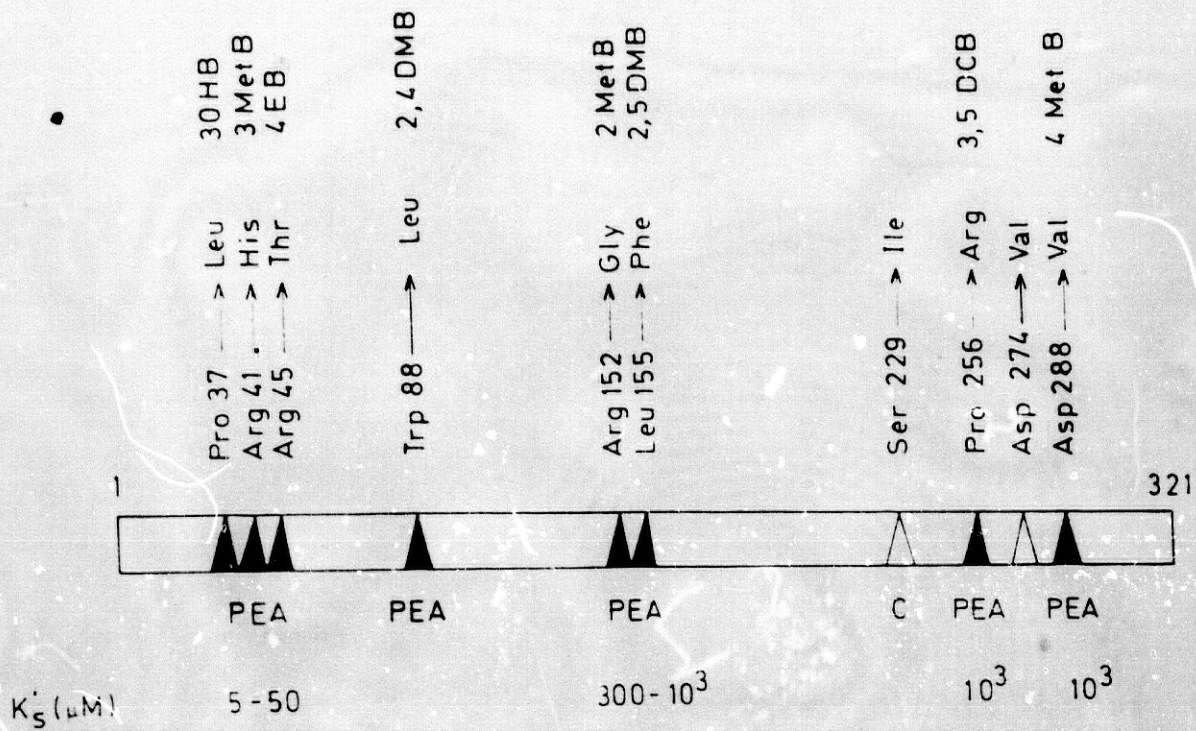


FIGURA 22. Localización de los aminoácidos cambiados en distintos mutantes de XylS y su relación con la K', por 3-metilbenzoato. Los triángulos cerrados indican mutaciones que conducen a proteínas con el perfil de efectores alterado (PEA) y los triángulos abiertos a las que presentan fenotipo constitutivo (C). En la parte superior de la figura, se indican para cada mutante con el perfil de efectores alterado, el benzoato utilizado durante su aislamiento y en la parte inferior la K', por 3-metilbenzoato. Las abreviaturas utilizadas para denominar los benzoatos son las mismas en Tablas y Figuras anteriores.

La afinidad aparente por 3-metilbenzoato de las proteínas XylSHis41, XylSThr45, XylSCys41, XylSTrp45, XylSMet45 (descritas en este trabajo) y XylSLeu37 y XylSGly44 (descritas en Zhou *et al.*, 1991) resultó ser entre 2 y 50 veces mayor que la afinidad de la proteína silvestre por este compuesto. Estas proteínas presentaban las mutaciones en la zona de máxima flexibilidad teórica del regulador silvestre. El hecho de que mutaciones en esta región incrementen la afinidad por 3-metilbenzoato sugiere una interacción directa de esta zona con las moléculas efectoras.

Paralelamente, en la proteína AraC de diversos organismos, como *E. coli* o *S. typhimurium*, que presenta grandes zonas de homología con XylS, se han realizado diversos estudios genéticos y bioquímicos para determinar los dominios funcionales del regulador. Brunelle y Schleif (1989) y Lauble *et al.* (1989) propusieron la participación de la parte amino terminal de la proteína en la unión a la L-arabinosa y en la dimerización de la proteína, mientras que en la unión al ADN estarían implicadas tanto las zonas amino como carboxilo terminal. En la estructura secundaria de esta proteína existen dos zonas en α -hélice-giro- α -hélice que van desde la posición 196 a la 215 y desde la 245 a la 264. Brunelle y Schleif (1989) determinaron que en la zona de 195 a 215 existen diversos aminoácidos que contactan con el promotor *ara*, mientras que no existen indicios de la participación de la zona de 245 a 264 en dicha unión.

En la zona carboxilo terminal de XylS también se habían aislado mutantes con el perfil de efectores alterado, que codificaban las proteínas XylSVal288, XylSPhe155, XylSGly152 y XylSArg256. Estos dos últimos reguladores presentaron una K' , más elevada por 3-metilbenzoato, es decir, una menor afinidad por este compuesto; lo que podría indicar que parte de esta región colabora, al menos, en la estructura del sitio de unión.

El aislamiento en este laboratorio por la Dra. Zhou de mutantes constitutivos con cambios puntuales localizados en las posiciones 229 y 274 de XylS, indica la unión directa de XylS al promotor Pm; y la localización de los cambios en la región carboxilo terminal de las proteínas mutadas, sugiere la participación de esta zona en la unión del regulador al ADN. La participación de esta región en las interacciones con Pm se ve apoyada por la existencia de dos zonas con estructuras en α -hélice-giro- α -hélice, típicas de unión al ADN, en las posiciones 230/250 y 282/301 (Mermoud *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1990a). Estas estructuras son altamente homólogas a las ya presentes en la proteína AraC de *E. coli* en las posiciones 196/215 y 245/264, presentando ambos reguladores los residuos más importantes de estas estructuras como son aminoácidos hidrofóbicos presentes en los puntos de contacto que se predicen para ambas hélices (Brunelle y Schleif, 1989; Ramos *et al.*, 1990a; Zhou *et al.*, 1990).

Otro dato a favor de la participación de esta región en la unión a Pm, es el hecho de que al clonar el gen *xy/S* en un vector como pTZ19 que presenta más de 200 copias por célula, se obtuvieron clones que han perdido totalmente la capacidad de estimular la transcripción desde el promotor Pm y, al secuenciarlos, presentaron una delección de unos 50 pb en la región que codifica la zona de 230/250 en la proteína (Luming Zhou, datos sin publicar).

Papel de algunos residuos de la zona amino terminal en las funciones de la proteína

Para clarificar el papel de la zona amino terminal de XylS, se aislaron todos los mutantes posibles del gen *xy/S* mediante mutagénesis dirigida con oligonucleótidos, cambiando sólo una base de los codones que codifican los aminoácidos que ocupan las posiciones 41 y 45, y, mediante mutagénesis con bisulfito en el sitio único de restricción *NcoI*, que se encuentra próximo a la zona del gen que codifica la posición 88 de la proteína, obteniéndose cambios en las posiciones 89, 90 y 91.

La arginina de la posición 45 de la proteína silvestre se cambió a serina, glicina, lisina, triptofano y metionina. Todos los reguladores mutantes, menos el que tenía el cambio a serina, presentaron un espectro de reconocimiento de efectores similar al silvestre con ligeras variaciones. La proteína XylSSer45 presentó un espectro similar al silvestre pero con niveles de activación desde Pm significativamente

más bajos, aunque la afinidad por 3-metilbenzoato era sólo ligeramente inferior a la del silvestre. La afinidad por 3-metilbenzoato de los reguladores XylSSer45, XylSLys45 y XylSGly45 era similar a la determinada para el regulador silvestre. Los otros mutantes con cambios en esta posición, esto es, XylSTrp45 y XylSMet45 presentaron valores de K'_s entre 3 y 6 veces inferiores a XylS.

Dado que determinadas sustituciones de la Arg45 por residuos como treonina, triptófano y metionina conducen a un incremento en la afinidad por 3-metilbenzoato, se sugiere que este residuo interacciona con las moléculas efectoras. El hecho de que estos cambios permitan el reconocimiento de compuestos como el 2-hidroxi- y el 4-etilbenzoato, no nos permite discernir si este residuo interacciona directamente con alguna de esas posiciones. La falta de datos estructurales no permite interpretar cómo el cambio de carga afecta al posible sitio activo, pero en principio parece plausible excluir efectos de tipo estéricos, ya que el volumen de la cadena lateral en los mutantes con mayor afinidad es muy variable, por ejemplo triptófano y treonina.

La arginina de la posición 41 de XylS se cambió a serina, glicina, cisteína, prolina y leucina. En las proteínas mutantes, se encontraron varios fenotipos: (a) pérdida total de función (XylSLeu41), (b) nivel de activación alto en ausencia de efectores sobre Pm (XylSCys41), (c) nivel basal de activación más bajo que el silvestre, aunque conservando el perfil de efectores silvestre y los niveles máximos de

inducción (XylSSer41 y XylSPro41), y (d) pérdida de reconocimiento de los benzoatos con sustituciones en la posición 2 o en la 4 (XylSGly41). La información recogida implica 4 fenotipos distintos en los 5 mutantes aislados. Esto sugiere la participación de este residuo en más de una función de la proteína: Podría ser el nexo de unión entre el centro de reconocimiento del efector y la cadena de transmisión de señal, o tener una participación directa en el sitio de unión al efector. Es de interés señalar que la pérdida total de actividad del mutante que presenta el cambio de arginina a leucina indica una anulación total del sitio de unión al efector o de la cadena de transmisión de señal. Es destacable que, aunque este último mutante presenta el cambio más hidrofóbico de los obtenidos, esta mutación no produce ninguna alteración en la flexibilidad teórica de este fragmento de la proteína mutante. Los altos niveles basales encontrados con la proteína XylSCys41 y los bajos niveles basales acompañados de la alta capacidad inductora de las proteínas XylSSer41 y XylSPro41, sólo se explican si este residuo participa activamente en la cadena interna de transmisión de señal de la proteína. Apoya esta hipótesis el hecho de que, cuando el gen *xy/S13* -que codifica la proteína XylSHis41- se clonó en un vector como pEMBL9 con alto número de copias (unas 100 copias por célula), el nivel basal de actividad β -galactosidasa medida a partir de una fusión Pm::*lacZ* en *E. coli* era 3 ó 4 veces superior al obtenido con el gen silvestre, y del orden de 50 veces superior a los niveles obtenidos

cuando estaba clonado en un vector como pKT231 cuyo número de copias es de 20 por célula. Para finalizar, este aminoácido podría estar implicado en las interacciones de este regulador con posiciones distintas de la *meta* en las moléculas efectoras, ya que la proteína que presenta el cambio de arginina 41 a glicina (el aminoácido de menor volumen), pierde drásticamente la capacidad de reconocer compuestos monosustituidos en las posiciones 2 y 4, y sólo reconoce los benzoatos con sustituciones permisivas en la posición 3. Además, este mutante reconoce efectores disustituidos si la posición 3 es una de las ocupadas.

En la sección 1 de Resultados se describió un mutante puntual, XylSLeu88, que presentaba niveles de expresión basal más altos que los de la proteína silvestre. Además este mutante exhibía un perfil de efectores alterado, ya que 2,4-dimetil-, 4-etil-, y 2,4-diclorobenzoato, compuestos que no son efectores del regulador silvestre, eran reconocidos por XylSLeu88. Esta doble capacidad puede indicar una doble funcionalidad: Este residuo puede participar directa o indirectamente en la unión al efector y al ADN ó estar localizado dentro de una hipotética cadena de transmisión de señal de un dominio a otro dentro del regulador.

Respecto a los mutantes obtenidos con bisulfito localizados en el sitio *NcoI* del gen *xyIS*, podemos encontrar dos grupos distintos en los reguladores producidos: La proteína XylSTyr91 presentaba niveles basales cinco veces más altos de activación desde Pm que el

silvestre, pero estos niveles no se incrementaron en presencia de ninguno de los benzoatos utilizados, sugiriendo que este regulador o bien no reconocía a los benzoatos o su unión no conducía a activación alguna del regulador. En cuanto a las proteínas XylSHis89 y XylSSer92, que mediaban niveles basales similares a la silvestre y exhibían asimismo un espectro de efectores similar, mostrando alrededor de 9 veces más afinidad por 3-metilbenzoato que la proteína silvestre. El conjunto de estos datos apoyan la participación de esta zona en una hipotética cadena de transmisión de señal del sitio de unión del efector hacia el sitio de unión al promotor, al exhibir distintos fenotipos asociados a la misma región o en la región de unión al efector.

Interacción entre los distintos dominios del regulador XylS

Para intentar esclarecer las posibles interacciones entre las zonas amino y carboxilo terminal se construyeron dobles mutantes *in vitro* con los genes *xy/S2*, *xy/S13* y *xy/S241* que codifican los reguladores XylSThr45, XylSHis41 y XylSLeu88 todos ellos con el cambio en la zona amino terminal y, los genes *xy/S12*, *xy/S14*, *xy/S352*, *xy/S32* y *xy/S52* que codifican las proteínas XylSGly152, XylSVal288, XylSArg256, XylSile229, XylSVal274, respectivamente, todas ellas con el cambio en la zona central o en la carboxilo terminal. Se realizaron las 15 combinaciones posibles para obtener mutantes dobles con una mutación en cada extremo de la proteína. El análisis

de los niveles basales de estimulación de la transcripción, el perfil de efectores, la afinidad aparente por 3-metilbenzoato y el efecto multicopia revelaron:

i) La existencia de una dominancia del fenotipo constitutivo en los cambios en las posiciones Ile229 y Val274 sobre las posiciones His41 y Leu88 pero no sobre la Thr45. Si la zona carboxilo terminal fuese la implicada en la unión a Pm y la zona amino terminal fuese la implicada en la unión al efector y ambas zonas actuasen independientemente, las mutaciones que afectasen a la unión con el ADN deberían de ser intramolecularmente dominantes sobre las de otras zonas de la proteína que participen en la unión al efector. El análisis de estos mutantes indican que esta hipótesis no se cumple, ya que el fenotipo del residuo 45 es dominante sobre el mostrado por el residuo 229 o el 274 en los dobles mutantes.

ii) La mayoría de las combinaciones de las mutaciones en los residuos His41, Thr45, Leu88 con los residuos Gly152, Arg256 y Val288 condujo a mutantes con un fenotipo similar, excepto en el caso del regulador XylSLeu88Arg256 que detallaremos posteriormente. Estos mutantes presentaban niveles basales de expresión similares a los del silvestre. Además, la afinidad por 3-metilbenzoato era unas 10 veces mayor que la que presenta la proteína silvestre con valores de K' , que oscilan entre 15 y 50 μM . Es de destacar, no obstante, el mutante XylSThr45Val288 que no reconoce 4-metoxibenzoato mientras que sus parentales si lo hacían.

La proteína XylSLeu88Arg256 es la única que conserva el carácter semiconstitutivo de XylSLeu88, ya que este carácter presenta un fenotipo recesivo en las combinaciones del cambio en la posición 88 con los cambios en las posiciones 152 y 288.

El hecho de que combinaciones de distintos residuos permita establecer relaciones de dominancia intramolecular, conlleven cambios en la afinidad por 3-metilbenzoato y alteren el perfil de efectores sugiere que estas regiones interaccionan en la activación de XylS y en la mediación de la transcripción desde Pm.

Comparación con otras proteínas

La comparación de la estructura primaria de este regulador con el banco de datos "Swiss Protein Release 13" (A. Bairoch, Universidad de Ginebra) reveló una gran homología de XylS con otros reguladores positivos que constituyen la denominada familia de XylS/AraC. Casi todas las proteínas que integran esta familia están implicadas en la regulación del metabolismo de diversas fuentes de carbono como arabinosa, ramnosa, melibiosa, xileno, etc, pero hay otros miembros que intervienen en procesos distintos, por ejemplo las proteínas Rns de *E. coli* y VirRF de *E. coli* y *Y. enterocolitica* que participan en procesos de patogénesis, la proteína AdaA de *B. subtilis* que activa la respuesta a la mutagénesis alquilante, ó tienen una función desconocida hasta ahora (Cornelis *et al.*, 1989; Henikoff *et al.* 1990; Ramos *et al.*, 1990b). En los componentes de esta familia

una sola proteína realiza las funciones de unión al efector y de unión al promotor regulado por ella debiendo existir en todas ellas dominios funcionales para estas dos acciones.

Todos los miembros conocidos hasta ahora presentan estructuras alineadas de α -hélice-giro- α -hélice en su zona carboxilo terminal excepto RhaR y MelR que presentan estructuras en α -hélice-bucle- α -hélice (HLH) (S. Busby, comunicación personal; Tobin y Schleif, 1989). Todas las proteínas con función conocida son reguladores y todos los genes analizados que las codifican se transcriben divergentemente respecto al promotor sobre el que ejercen su mecanismo de regulación (Henikoff *et al.*, 1990; Tobin y Schleif, 1990).

Al efectuar el alineamiento de las proteínas de la familia (ver Figura 21) se observó que la homología no se distribuía por igual a lo largo de la secuencia de aminoácidos, sino que esta se restringía preferentemente a la zona carboxilo terminal. Este dato sugiere la participación de la región amino terminal preferentemente en el reconocimiento de efectores y la de la zona carboxilo terminal en la unión al ADN. Esto sugiere además que si todas estas proteínas actúan de la misma forma, la unión de estos reguladores a sus correspondientes promotores y sus mecanismos de activación de la transcripción pueden ser similares, pero no sus mecanismos de unión a sus respectivos efectores, ya que éstos son diferentes entre sí: arabinosa, benzoato, ramnosa, melibiosa, etc (Cass y Wilcox, 1986;

Lee *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1986 y 1990b; Shleif, 1972; Schleif y Lis, 1975; Schleif y Favreau, 1982; Sheppard *et al.*, 1979; Sheppard, 1986; Vermersch *et al.*, 1990). En contrapartida, es de reseñar que se puede inducir la ruta de catabolización de la arabinosa en *E. coli* en presencia de AraC y determinados derivados del ácido benzoico como *o*- y *p*-amino-, *p*-hidroxibenzoato, etc (Kline *et al.*, 1984) y se han medido ligeros índices de activación desde Pm en presencia de XylS y arabinosa (C. Michán, datos sin publicar).

Hay otra pequeña región donde estas proteínas presentan gran homología, que se localiza alrededor de la posición 105 de XylS donde se sitúan varios residuos de leucina seguidos. La existencia de estas leucinas puede estar relacionada con mecanismos de unión proteína/proteína (Abel y Maniatis, 1989), ya que en todas las proteínas de esta familia con un mecanismo de actuación conocido, éste se realiza mediante la formación de homodímeros. En XylS no se han encontrado todavía evidencias de ello.

Henikoff *et al.* (1990) llevaron a cabo un análisis recurrente de homología y adscribieron a esta familia proteínas como OGT, PhoO y M5 de *E. coli*, Xp550 de *Streptomyces lividans* y TetD de Tn10, y Hakura *et al.* (1991) por un sistema similar describió homología de OGT y Ada de *E. coli* con Ad. de *Salmonella typhimurium*, AdaA, AdaB y Dat de *Bacillus subtilis* y MGMT una proteína alquilante humana. Al comparar estas proteínas una a una con los componentes de la familia XylS/AraC utilizando el algoritmo de Needleman y

Wunsch (1970), se encontró que ninguna de estas proteínas excepto AdaA pertenecían a la familia ya que el valor de significancia era menor que 3. Sin embargo, la proteína RhaR de *E. coli* presenta homología con MGMT de *H. sapiens* y ésta presenta homología con AdaB y Dat de *B. subtilis*, OGT de *E. coli* y Ada de *S. typhimurium*, lo que puede indicar una relación ancestral entre estos dos grupos de proteínas reguladoras.

El aislamiento de mutantes de XylS y su análisis molecular ha permitido diseccionar su organización funcional. Estos mutantes se han utilizado además en la expansión de rutas metabólicas para el catabolismo de *p*-etilbenzoato (Ramos *et al.*, 1987) y *p*-etiltolueno (Abril *et al.*, 1989) y recientemente en la construcción de bacterias controladas biológicamente (Contreras *et al.*, 1991). Es de esperar que el aislamiento de nuevos mutantes permita profundizar en el conocimiento de la estructura y función de este regulador de la transcripción en la bacteria del suelo *Pseudomonas putida*.

CONCLUSIONES

1. La degradación de benzoato y toluatos codificada por el operón *meta* presente en el plasmido TOL pWWO de la bacteria *Pseudomonas putida*, se regula positivamente a nivel transcripcional por el producto del gen *xyIS*, la proteína XylS.

2. La proteína XylS parece existir en dos estados conformacionales, uno inactivo en el cual no estimula la transcripción desde el promotor del operon *meta*, Pm, y otro activo en el que media la transcripción desde Pm. El ácido benzoico y otros efectores de esta ruta desplazan el equilibrio hacia la forma activa.

3. La superproducción de la proteína XylS conduce a un incremento de la transcripción desde Pm independiente de la presencia de efectores de la ruta.

4. El sitio de unión al efector de XylS se compone de al menos tres regiones no contiguas en la secuencia primaria de la proteína: una

en la zona amino terminal desde la posición 37 a la 45, otra en la región central alrededor de la posición 155 y otra en la zona carboxilo terminal que puede incluir residuos entre las posiciones 229 a la 288.

5. El segmento de la secuencia primaria comprendido entre las posiciones 230 y 250 exhibe estructura en α -hélice-giro- α -hélice y parece ser la región implicada en el reconocimiento de Pm.

6. Utilizando dobles mutantes se ha establecido que la acción de los dominios de unión al efector y al ADN en XylS no son independientes.

7. El regulador XylS pertenece a una familia de proteínas, denominada familia XylS/AraC, que comprende proteínas pertenecientes a distintos microorganismos como *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *Salmonella typhimurium* y el transposón Tn10.

BIBLIOGRAFÍA

ABEL, T. y MANIATIS, T. (1989). Action of leucine zippers. *Nature* 341, 24-25.

ABRIL, M. A., MICHÁN, C., TIMMIS, K. N. y RAMOS, J. L. (1989). Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* 171, 6782-6790.

ABRIL, M. A., BUCK, M. y RAMOS, J. L. (1991). Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. *J. Biol. Chem.* 266, 15832-15838.

ADHYA, S. y GARGES, S. (1990). Positive control. *J. Biol. Chem.* 265, 10797-10800.

AMEMURA, M., MAKINO, K., SHINAGAWA, H. y NAKATA, A. (1986). Nucleotide sequence of the *phoM* region of *Escherichia coli*: four open reading frames may constitute an operon. *J. Bacteriol.* 168, 294-302.

ASSINDER, S. J. y WILLIAMS, P. (1990). The TOL plasmid: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv. Microb. Physiol.* 31, 5-69.

BACHMAIR, A., FINLEY, D. y VARSHAVSKY, A. (1986). *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-186.

BAGDASARIAN, M. R., LURZ, RUECKERT, B., FRANKLIN, F. C. H., BAGDASARIAN, M. M., FREY, J. y TIMMIS, K. N. (1981). Specific purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16, 237-247.

BEYNON, J., CANNON, M., BUCHANAN-WOLLASTN, V. y CANNON, F. (1983). The *nif* promoters of *Klebsiella pneumoniae* have a characteristic primary structure. *Cell* 34, 665-671.

BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R. L., GREENE, P. J., BETLACH, M. C., HEYNEKER, H. L., BOYER, H. W., CROSA, J. H. y FALKOW, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95-113.

BOYER, H. W. y ROULLAND-DUSSOIX, D. (1969). A complementary analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**, 459-472.

BRAUS, G., ARGAST, M. y BECK, C. F. (1984). Identification of additional genes on transposon Tn10: *tetC* and *tetD*. *J. Bacteriol.* **160**, 504-509.

BRUNELLE, A. y SCHLEIF, R. (1989). Determining residue-base interactions between AraC protein and *araI* DNA. *J. Mol. Biol.* **209**, 607-622.

BURLAGE, R. S., HOOPER, S. W. y SAYLER, G. S. (1989). The TOL (pWW0) catabolic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1323-1328.

CASS, L. G. y WILCOX, G. (1986). Mutations in the *araC* regulatory gene of *Escherichia coli* B/r that affect repressor and activator functions of AraC protein. *J. Bacteriol.* **166**, 892-900.

COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y. y HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110-2117.

CORNELIS, G., SLUITERS, C., LAMBERT DE ROUVROIT, C. y MICHIELS, T. (1989). Homology between VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. J. Bacteriol. 171, 254-262.

CHOU, P. Y. y FASMAN, G. D. (1979). Conservation of chain reversal regions in proteins. Biophys. J. 26, 367-384.

DAGLEY, S. (1986). Biochemistry of aromatic hydrocarbons degradation in Pseudomonads. En: The bacteria. A treatise on structure and function. Vol. X: The Biology of *Pseudomonas*. J. R. Sokatch (ed.), Academic Press Inc. pp 527-556.

DAVID, M., DAVERAN, M. L., BATUT, J., DEDIEU, A., DOMERGUE, J., GHAI, J., HERTIG, C., BOISTARD, P. y HAHN, D. (1988). Cascade regulation of nif gene expression in *Rhizobium meliloti*. Cell 54, 671-683.

DEMPLE, B., SEDGWICK, B., ROBINS, P., TOTTY, N., WATERFIELD, M. D. y LINDAHL, T. (1985). Active site and complete sequence of the suicidal methyltransferase that counters alkylation mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2688-2692.

DENTE, L., CESARINI, G. y CORTESE, R. (1983). pEMBL: a new family of single stranded plasmids. Nucl. Acids Res. 11, 1645-1655.

DIXON, R. (1986). The *xy/ABC* promoter from the *Pseudomonas putida* TOL plasmid is activated by nitrogen regulatory genes in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 203, 129-136.

ENGLESBERG, E., IRR, J. POWER, J. y LEE, N. (1965). Positive control of enzyme synthesis by the gene C in the L-arabinose system. J. Bacteriol. 90, 946-957.

ENGLESBERG, E. y WILCOX, G. (1974). Regulation: positive control. Ann. Rev. Genet. 8, 219-242.

FENG, D. F., JOHNSON, M. S. y DOOLITTLE, R. F. (1985). Aligning amino acid sequences: comparison of commonly used methods. J. Mol. Evol. 21, 112-125.

FENG, D. F. y DOOLITTLE R. F. (1987). Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.* 25, 351-360.

FRANKLIN, F. C. H., BAGDASARIAN, M., BAGDASARIAN, M. M., y TIMMIS, K. N. (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of the genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7458-7462.

FRANKLIN, F. C. H., LEHRBACH, P. R., LURZ, R., RUECKERT, B., BAGDASARIAN, M. y TIMMIS, K. N. (1983). Localization and functional analysis of transposon mutations in regulatory genes of the TOL catabolic pathway. *J. Bacteriol.* 154, 676-685.

GARNIER, J., OSGUTHORPE, D. J. y ROBSON, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120, 97-120.

GARNIER, J. (1990). Protein structure prediction. *Biochemie* 72, 513-524.

GIBSON, D. T. y SUBRAMANIAN, V. (1984). Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. En: Microbial degradation of organic compounds. D. T. Gibson (ed.), Marcel Dekker Inc. pp 181-252.

GRALLA, J. D. (1991). Transcriptional control-lessons from an *E. coli* promoter data base. *Cell* **66**, 415-418.

HAKURA, A., MORIMOTO, K., SOFUNI, T. y NOHMI, T. (1991). Cloning and characterization of the *Salmonella typhimurium ada* gene, which encodes O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *J. Bacteriol.* **173**, 3663-3672.

HANAHAN, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

HARAYAMA, S., LEHRBACH, P. R. y TIMMIS, K. N. (1984). Transposon mutagenesis analysis of *meta* cleavage pathway operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.* **160**, 251-255.

HARAYAMA, S., REKIK, M., WUBBOLTS, M., ROSE, K. LEPPIK, R. A. y TIMMIS, K. N. (1989). Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas*

putida and identification of the gene products. J. Bacteriol. 171, 5048-5055.

HARAYAMA, S y REKIK, M. (1990). The *meta* cleavage operon of TOL degradative plasmid pWWO comprises 13 genes. Mol. Gen. Genet. 221, 113-120.

HATTORI, M. y SAKAKI, Y. (1986). Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. Anal. Biochem. 152, 232-238.

HAYAKAWA, H., KOIKE, G., y SEKIGUCHI, M. (1990). Expression and cloning of complementary DNA for a human enzyme that repairs O⁶-methylguanine in DNA. J. Mol. Biol. 213, 739-747.

HENIKOFF, S., HAUGHN, G. W., CALVO, J. M. y WALLACE, J. C. (1938). A large family of bacterial activator proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6602-6606.

HENIKOFF, S., WALLACE, J. C. y BROWN, J. P. (1990). Finding protein similarities with nucleotide sequence databases. Meth. Enzymol. 183, 111-132.

HOLTEL, A., ABRIL, M. A., MARQUES, S., TIMMIS, K. N. y RAMOS, J. L. (1990). Promoter-upstream activator sequences are

required for expression of the *xy/S* gene and upper-pathway operon on the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Mol. Microbiol.* **4**, 1551-1556.

HOLTEL, A., TIMMIS, K. N. y RAMOS, J. L. (1991). Identification of XylR and IHF binding sites in the σ^{54} -dependent TOL plasmid *xy/S* gene promoter. Enviado a prensa.

HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N., KÖHLER, T., REKIK, M. y HARAYAMA, S. (1991). Growth-phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0 catabolic genes. *J. Bacteriol.* **172**, 6651-6660.

INOUE, S., NAKAZAWA, A. y NAKAZAWA, T. (1981). Molecular cloning of gene *xy/S* of the TOL plasmid: evidence for positive regulation of the *xy/DEGF* operon by *xy/S*. *J. Bacteriol.* **148**, 413-418.

INOUE, S., NAKAZAWA, A. y NAKAZAWA, T. (1983). Molecular cloning of the regulatory gene *xy/R* and operator-promoter regions of the *xy/ABC* and *xy/DEGF* operons of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **155**, 1192-1199.

INOUE S., NAKAZAWA, A. y NAKAZAWA, T. (1986). Nucleotide sequence of the regulatory gene *xy/S* on the *Pseudomonas putida*

TOL plasmid and identification of the protein product. *Gene* 44, 235-242.

INOUE, S., NAKAZAWA, A. y NAKAZAWA, T. (1987a). Expression of the regulatory gene *xy/S* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xy/R* product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5182-5186.

INOUE, S., NAKAZAWA, A. y NAKAZAWA, T. (1987b). Overproduction of the *xy/S* gene product and activation of the *xy/DLEGF* operon on the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 169, 3587-3592.

INOUE, S., NAKAZAWA, A. y NAKAZAWA, T. (1989). Cloning and sequence analysis of the *ntrA* (*rpoN*) gene of *Pseudomonas putida*. *Gene* 85, 145-152.

JACOB, F. y MONOD, J. (1961). Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3, 318-356.

KARPLUS, P. A. y SCHULZ, G. E. (1985). Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72, 212-213.

KEMP, E. H., MINTON, N. P. y MANN, N. H. (1987). Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the M5 polypeptide gene of *Escherichia coli*. *Nuc. Acids Res.* **15**, 3924.

KLEIN, P., KANEHISA, M. y DELISI, C. (1985). The detection and classification of membrane spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **815**, 468-476.

KLINE, E.L., WEST, R. W., INK, B. S., KLINE, P. M. y RODRIGUEZ, R. L. (1984). Benzyl derivative facilitation of transcription in *Escherichia coli* at the *ara* and *lac* operon promoters: metabolite gene regulation (MGR). *Mol. Gen. Genet.* **193**, 340-348.

KODAMA, K., NAKABEPPU, Y. y SEKIGUCHI, M. (1989). Cloning and expression of the *Bacillus subtilis* methyltransferase gene in *Escherichia coli ada* cells. *Mutat. Res.* **218**, 153-163.

KÖHLER, T., HARAYAMA, S., RAMOS, J. L. y TIMMIS, K. N. (1989). Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN σ factor in regulation of various metabolic functions. *J. Bacteriol.* **171**, 4326-4333.

KUNKEL, T. A., ROBERTS, J. D. y ZAKOUR, R. A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Meth. Enzymol.* 154, 367-382.

KUSTU, S., SANTERO, E., KEENER, J., POPHAM, D. y WEISS, D. (1989). Expression of (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* 53, 367-376.

KYTE, J. y DOOLITTLE, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.

LAUBLE, H., GEORGALIS, Y. y HEINEMANN, U. (1989). Studies on the domain structure of the *Salmonella typhimurium* AraC protein. *J. Biochem.* 185, 319-325.

LEE, N., FRANCKLYN, C. y HAMILTON, E. P. (1987). Arabinose-induced binding of AraC protein to *araI*₂ activates the *araBAD* operon promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8814-8818.

LEHRBACH, P. R., MCGREGOR, I., WARD, J. M. y BRODA, P. (1983). Molecular relationships between *Pseudomonas* INC P-9 degradative plasmids TOL, NAH, and SAL. *Plasmid* 10, 164-174.

LESSIE, T. G. y GAFFNEY, T. (1986). Catabolic potential of *Pseudomonas cepacia*. En: The Bacteria. A treatise on structure and function. Vol. X: The Biology of *Pseudomonas*. J. R. Sokatch (ed.), Academic Press Inc. pp 439-482.

LEVITT, M. y CHOTHIA, C. (1976). Structural patterns in globular proteins. *Nature* 261, 552-558.

de LORENZO, V., HERRERO, M., METZKE, M. y TIMMIS, K. N. (1991). An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein regulates the σ^{54} -dependent Pu promoter of TOL plasmid. *EMBO J.* 10, 1159-1168.

MACNEIL, T., MACNEIL, D. y TYLER, B. L. (1982). Fine structure deletion map and complementation analysis of the *glnA-glnL-glnG* region in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 121, 1302-1313.

MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. y SAMBROOK, J. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, New York.

MANOIL, C. y BECKWITH, J. (1985). *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8129-8133.

MERMOD, N. (1986a). Etude de l'expression de genes cataboliques chez *Pseudomonas*. Tesis doctoral n° 2202 de Chêne-Bougeries, Ginebra (Suiza).

MERMOD, N., LEHRBACH, P. R., DON, R. H. y TIMMIS, K. N. (1986b). Gene cloning and manipulation in *Pseudomonas*. En: The Bacteria. A treatise on structure and function. Vol. X: The Biology of *Pseudomonas*. J. R. Sokatch (ed.), Academic Press Inc. pp 325-356.

MERMOD, N., RAMOS, J. L., LEHRBACH, P. R. y TIMMIS, K. N. (1986c). Vector for regulated expression of cloned genes in a wide range of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 167, 447-454.

MERMOD, N., RAMOS, J. L., BAIROCH, A. y TIMMIS, K. N. (1987). The *xy/S* gene positive regulator of TOL plasmid pWW0: identification sequence analysis and overproduction leading to constitutive expression of *meta* cleavage operon. *Mol. Gen. Genet.* 207, 349-354.

MESSING, J., GRONENGORN, B., MULLER-HILL, B. y HOFSCHEIDER, P. H. (1977). Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a *Hind*III fragment of the *lac* regulatory

region in M13 replicative form *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci USA 74, 3642-3646.

MESSING, J. (1983). New M13 vectors for cloning. Meth. Enzymol. 101, 20-78.

MILLER, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

MÍCHAN, C., KESSLER, B., de LORENZO, V., TIMMIS, K. N. y RAMOS J. L. (1991). Strick requeriment of the DNA-binding domain and the effector binding pocket for an active XylS positive regulator. Enviado a prensa.

MOROHOSHI, F., HAYASHI, K., y MUNAKATA, N. (1989). *Bacillus subtilis* gene coding for constitutive O⁶-methylguanine-DNA alkyltransferase. Nucl. Acids Res. 17, 6531-6543.

MOROHOSHI, F., HAYASHI, K. y MUNAKATA, N. (1990). *Bacillus subtilis ada* operon encodes two DNA alkyltransferases. Nucl. Acids Res. 18, 5473-5480.

NAKABEPPU, Y., KONDO, H., KAWABATA, S., IWANAGA, S. y SEKIGUCHI, M. (1985). Purification and structure of the intact Ada

regulatory protein of *Escherichia coli* K12, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. J. Biol. Chem. 260, 7281-7288.

NEEDLEMAN, S. B. y WUNSCH, C. P. (1970). General methods applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J. Mol. Biol. 48, 443-453.

PABO, C. S. y SAUER, R. T. (1984). Protein-DNA recognition. Annu. Rev. Biochem. 53, 293-321.

PALLERONI, N. J. (1986). Taxonomy of the Pseudomonads. En: The bacteria. A treatise on structure and function. Vol. X: The Biology of *Pseudomonas*. J. R. Sokatch (ed.), Academic Press Inc. pp 3-26.

POTTER, P. M., WILKINSON, M. C., FITTON, J., CARR, F. J., BRENNAND, J., COOPER, D. P. y MARGISON, G. P. (1987). Characterization and nucleotide sequence of *ogt*, the O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene of *E. coli*. Nuc. Acid. Res. 15, 9177-9193.

RAIBAUD, O. y SCHWARTZ, M. (1984). Positive control of transcriptional initiation in bacteria. Ann. Rev. Genet. 18, 173-206.

RAMOS, J. L., STOLZ, A., REINEKE, W. y TIMMIS, K. N. (1986).
Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL
plasmid *xy/S* mutants and their use to engineer expansion of the
range of aromatics degraded by bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 83, 8467-8471.

RAMOS, J. L., MERMOD, N. y TIMMIS, K. N. (1987a). Regulatory
circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding
meta-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by
Pseudomonas. Mol. Microbiol. 1, 293-300.

RAMOS, J. L. y TIMMIS, K. N. (1987b). Experimental evolution of
catabolic pathways of bacteria. Microbiol. S. , 228-237.

RAMOS, J. L., WASSERFALLEN, A., ROSE, K. y TIMMIS, K. N.
(1987c). Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL
plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. Science 237
593-596.

RAMOS, J. L., GONZALEZ-CARRERO, M. y TIMMIS, K. N. (1988).
Broad-host range expression vectors containing manipulated *meta*-
cleavage pathway regulatory elements of the TOL plasmid. FEBS
Lett. 226, 241-246.

RAMOS, J. L., MICHÁN, C., ROJO, F., DWYER, D. y TIMMIS, K. N. (1990a). Signal-regulator interactions. Genetic analysis of the effector binding site of *xyIS*, the benzoate-activated positive regulator of *Pseudomonas* TOL plasmid *meta*-cleavage pathway operon. J. Mol. Biol. 211, 373-382.

RAMOS, J. L., ROJO, F., ZHOU, L. y TIMMIS, K. N. (1990b). A family of positive regulators related to the *Pseudomonas putida* TOL plasmid XylS and the *Escherichia coli* AraC activators. Nuc. Acids Res. 18, 2149-2152.

SANGER, F., NICKLEN, S. y COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

SASSE-DWIGHT, S y GRALLA, J. D. (1988). Probing the *Escherichia coli* *glnALG* upstream activation mechanism *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8934-8938.

SCHLEIF, R. (1972). Fine-structure deletion map of the *Escherichia coli* L-arabinose operon. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3479-3484.

SCHLEIF, R. y LIS, J. T. (1975). The regulatory region of the L-arabinose operon: a physical, genetic and physiological study. *J. Mol. Biol.* 95, 417-431.

SCHLEIF, R. F. y FAVREAU, A. (1982). Hyperproduction of *araC* protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 21, 778-782.

SCHLEIF, R. F. (1989). The L-arabinose operon. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Vol II. F. C. Neidhardt (ed.), AMS, Washington D. C. pp 1473-1481.

SCHOLLMEIER, K. y HILLEN, W. (1984). Transposon Tn10 contains two structural genes with opposite polarity between *tetA* and IS10_R. *J. Bacteriol.* 160, 499-503.

SHEPPARD, D. E., ELEUTERIO, M. y FALGOUT, B. (1979). Interaction between mutant alleles of *araC* of the *Escherichia coli* B/r L-arabinose operon. *J. Bacteriol.* 139, 1085-1088.

SHEPPARD, D. E. (1986). Dominance relationships among mutants alleles of regulatory gene *araC* in the *Escherichia coli* B/r L-arabinose operon. *J. Bacteriol.* 168, 999-1001.

SINCLAIR, M. I. y HOLLOWAY, B. W. (1991). Chromosomal insertion of TOL transposon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. J. Gen. Microbiol. 137, 1111-1120.

SPOONER, R. A., LINDSAY, K. y FRANKLIN, F. C. H. (1986). Genetic, functional and sequence analysis of the *xyIR* and *xyIS* regulatory genes of the TOL plasmid pWW0. J. Gen. Microbiol. 132, 1347-1358.

SPOONER, R. A., BAGDASARIAN, M. y FRANKLIN, F. C. H. (1987). Activation of the *xyD*LEGF promoter of the TOL toluene-xylene degradation pathway by overproduction of the *xyIS* regulatory gene product. J. Bacteriol. 169, 3581-3586.

TANO, K., SHIOTA, S., COLLIER, J., FOOTE, R. S. y MITRA, S. (1990). Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for *O*⁶-alkylguanine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 686-690.

THAYER, J. R. y WHEELIS, M. L. (1982). Active transport of benzoate in *Pseudomonas putida*. J. Gen. Microbiol. 128, 1749-1753.

TOBIN, J. F. y SCHLEIF, R. F. (1990). Purification and properties of RhaR, the positive regulator of the L-rhamnose operons of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 211, 75-89.

TSUDA, M., MIANEGISHI, K. I. y INO, T. (1989). Toluene transposons Tn4651 and Tn4653 are class II transposons. *J. Bacteriol* 171, 1386-1393.

VERMERSCH, P. S., TESMER, J. J. G., LEMON, D. D. y QUIOCHO, F. A. (1990). A Pro to Gly mutation in the hinge of the arabinose-binding protein enhances binding and alters specificity. *J. Biol. Chem.* 265, 16592-16603.

VIEIRA, J. y MESSING, J. (1982). The pUC plasmid an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259-268.

WILLETTS, N. y WILKINS, B. (1984). Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiol. Rev.* 48, 24-34.

WILLIAMS, P. A. y MURRAY, K. (1974). Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 120, 416-423.

WILLIAMS, P. A. y WORSEY, M. J. (1976). Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. *J. Bacteriol.* 125, 818-828.

WILLIAMS, P. A. (1981). Catabolic plasmids. *TIBS* 6, 23-26.

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

WORSEY, M. J., FRANKLIN, F. C. H. y WILLIAMS, P. A. (1978). Regulation of the degradative pathway enzymes coded for by the TOL plasmid (pWW0) from *Pseudomonas putida mt-2*. *J. Bacteriol.* 134, 757-764.

YANISH-PERRON, C., VIEIRA, J y MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-109.

ZHOU, L., TIMMIS, K. N. y RAMOS, J. L. (1990). Mutations leading to constitutive expression from the TOL plasmid *meta*-cleavage pathway operon are located at the C-terminal end of the positive regulator protein XylS. *J. Bacteriol.* 172, 3707-3710.

ZHOU, L., GALLEGOS, M. T., MICHÁN, C., TIMMIS, K. N. y RAMOS, J. L. (1991). Amino acid substitutions of the XylS positive regulator of the TOL plasmid toluate catabolic operon that alter effector specificity and lead to high basal induction levels. Enviado a prensa.

ZOLLER, M. J. y SMITH, M. (1983). Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Meth. Enzymol.* 100, 468-500.

ZVELEBIL, M. J., BARTON, G. J., TAYLOR, W. R. y STERNBERG, M. J. E. (1987). Prediction of protein secondary structure and active sites using the alignment of homologous sequences. *J. Mol. Biol.* 195, 957-961.