

T  
15  
147

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ..10./01./00.....
ENTRADA NUM. 21.....

**FACTORES IMPLICADOS EN LA EXPRESIÓN DE  
LA RUTA *meta* DEL PLÁSMIDO TOL pWW0 DE  
*Pseudomonas putida*.**

**TESIS DOCTORAL**

BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	61968534
Nº Copia	2136562

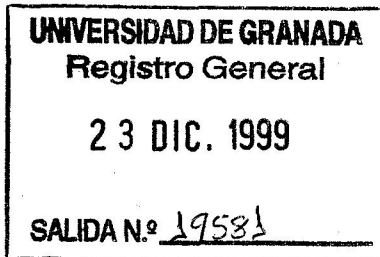
**MAXIMINO ENRIQUE MANZANERA RUIZ**

**1999**



UNIVERSIDAD DE GRANADA

COMISION DE DOCTORADO



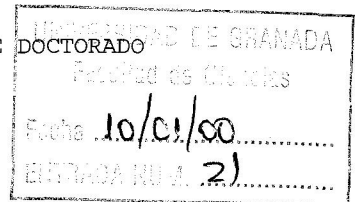
Fecha: 21 de Diciembre de 1999

Su Refª.

Nuestra Refª.

Fecha de Salida:

Unidad de Origen: COMISIÓN DE



Destinatario:

Ilmo. Sr. DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

En cumplimiento del artículo 36 de las Normas Reguladoras de los estudios de Tercer Ciclo de esta Universidad, adjunto se remite un ejemplar de la Tesis Doctoral presentada por el Doctorando D.MAXIMINO ENRIQUE MANZANERA RUIZ titulada FACTORES IMPLICADOS EN LA EXPRESION DE LA RUTA META DEL PLASMIDO TOL PWWO DE PSEUDOMONAS PUTIDA y dirigida por el Profesor/es Dr/es SILVIA MARQUEZ MARTIN, JUAN LUIS RAMOS MARTIN con objeto de mantenerla depositada desde el día 21 de Diciembre de 1999 hasta el día 08 de Febrero de 2000 para que pueda ser examinada por cualquier Doctor que así lo desee.

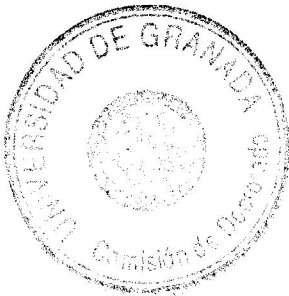
Granada, a 21 de Diciembre de 1999.

LA SECRETARIA DE LA COMISIÓN

DE DOCTORADO

S. WJ

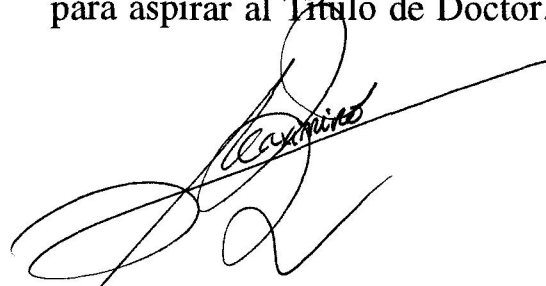
Fdo.: SULTANA WAHNON BENSUSAN  
Secretaria de la Comisión de Doctorado





**FACTORES IMPLICADOS EN LA EXPRESIÓN DE LA RUTA  
meta DEL PLÁSMIDO TOL pWW0 DE  
*Pseudomonas putida*.**

Memoria que presenta el licenciado en Biología,  
Maximino Enrique Manzanera Ruiz,  
para aspirar al Título de Doctor.



Fdo: Maximino E. Manzanera Ruiz

VºBº  
Los directores



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



Fdo: Silvia Marqués Martín  
Doctora en Biología  
Colaboradora Científica del C.S.I.C.

Universidad de Granada

1999

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



*ÍNDICE*

<b>ÍNDICE</b>	<b>IX</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Organización bioquímica de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0.	4
1.2. Organización genética de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0.	6
1.3. Modelo de control transcripcional de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0 hasta 1995.	10
1.4. Datos experimentales que llevaron al modelo de regulación de las rutas degradativas del plásmido TOL pWW0 propuesto en 1995.	12
<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
1. CEPAS BACTERIANAS	31
2. MEDIOS DE CULTIVO	31
2.1. Medios ricos	32
2.2 Medios mínimos	32
2.3 Antibióticos	32
2.4 Condiciones de cultivo	33
3. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS	33
4. PLÁSMIDOS	33
5. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO	35
5.1. Método "Qiapreps"	36
5.2. Método de lisis alcalina	36
5.3. Aislamiento de plásmidos a gran escala y purificación en gradiente de cloruro de cesio	37
5.4. Aislamiento del plásmido TOL	38
6. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL	38
7. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS	39
7.1. Por conjugación	39

7.2. Por transformación mediante choque térmico	40
7.3. Por electroporación	40
8. MANIPULACIÓN DE ADN Y ARN	
8.1. Determinación de la concentración de ADN y ARN	40
8.2. Restricción de ADN	41
8.3. Defosforilación de ADN con fosfatasa alcalina	41
8.4. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa	41
8.5. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	42
8.6. Ligación de ADN	42
8.7. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)	43
8.8. Mutagénesis dirigida con oligonucleótidos	43
8.9. Secuenciación de ADN	45
8.10. Extracción de ARN	46
8.11. Marcaje de cebadores	47
9. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE CEBADOR	48
9.1. Reacción de extensión	48
9.2. Separación de cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis	48
10. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA POR EL MÉTODO DE “SOUTHERN BLOT” E HIBRIDACIÓN	49
10.1. Transferencia de ADN	49
10.1.1. Por capilaridad	49
10.1.2. Por vacío	50
10.2. Marcaje no radiactivo de ADN lineal	50
10.3. Prehibridación e hibridación	51
10.4. Reacción inmunológica	51
11. ENSAYOS DE IMPRONTA <i>in vitro</i> O DE PROTECCIÓN DEL ADN	52

---

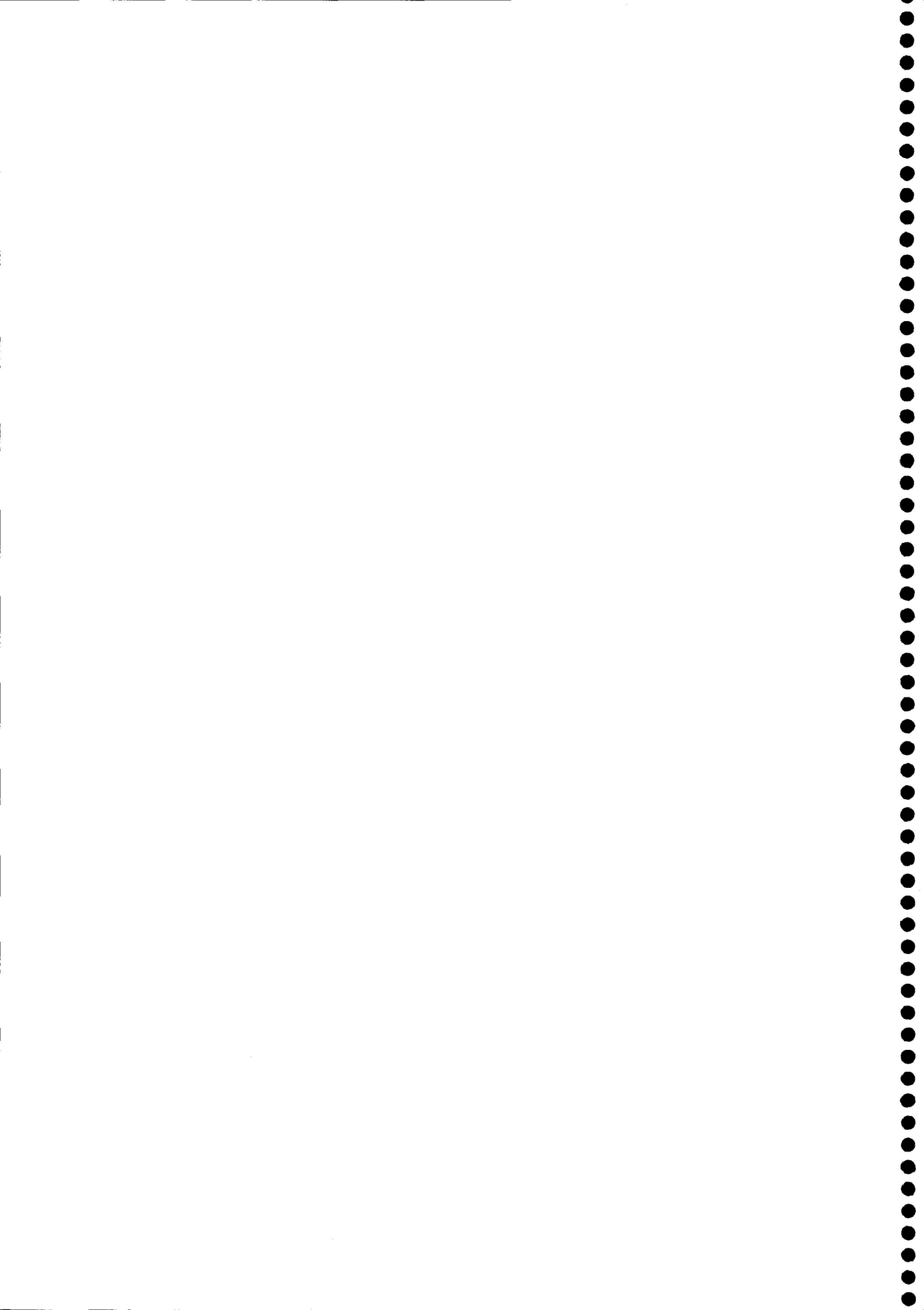
12. MEDIDA DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA	53
13. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS	54
<b>RESULTADOS</b>	57
Capítulo 1: FACTORES IMPLICADOS EN LA EXPRESIÓN DE LA RUTA <i>meta</i>	59
1.1. La transcripción desde Pm en fase exponencial es independiente de la ARN polimerasa $\sigma^{70}$	60
1.2. Pm requiere de la ARN polimerasa con $\sigma^{32}$ para su transcripción durante la fase exponencial	62
1.3. La presencia del inductor 3-metilbenzoato dispara la respuesta de choque térmico	65
1.4. Pm no se expresa en fase exponencial en ausencia de respuesta a choque térmico	66
1.5. Dsicusión del capítulo	69
Capítulo 2: EL GEN <i>rpoH</i> DE <i>Pseudomonas putida</i>	73
2.1. Aislamiento y caracterización del gen <i>rpoH</i> de <i>P. putida</i>	74
2.1.1. Clonación de un gen <i>rpoH</i> de <i>P. putida</i>	74
2.1.2. Caracterización del gen de <i>P. putida</i> homólogo a <i>rpoH</i>	75
2.2. Caracterización de la región promotora de <i>rpoH</i>	84
2.2.1. El gen <i>rpoH</i> de <i>P. putida</i> se transcribe desde 3 promotores	84
2.2.2. La expresión del gen <i>rpoH</i> no depende de $\sigma^{54}$ en <i>P. putida</i>	88
Capítulo 3: ESTUDIO DE RESIDUOS DE XylS QUE AFECTAN LA TRANSCRIPCIÓN DESDE Pm	93
3.1. Alineamiento de XylS y MarA	96

3.2. Construcción de los plásmidos pERDX802, pCMX2 y pJS7	100
3.3. Mutagénesis dirigida en los residuos conservados, comprendidos entre $\alpha$ -hélice 5 y el extremo C-terminal	104
Capítulo 4: ESTUDIO DE LA REGIÓN INTERGÉNICA <i>xyIR/xyIS</i>	117
4.1. Expresión de los promotores Pr y Ps en un fondo genético carente de XylR	118
4.2. Expresión de los promotores Pr y Ps en un fondo genético carente de IHF	121
4.3. Expresión de los promotores Pr y Ps en un fondo genético carente de <i>rpoN</i> .	126
4.4. Discusión parcial del capítulo IV	129
Capítulo 5: EFECTO DE LA PRESENCIA DE EXTRACTO DE LEVADURA EN LA EXPRESIÓN DE Pr Y Ps	133
5.1. Transcripción de <i>xyIS</i> en distintos fondos genéticos en presencia de extracto de levadura	133
5.1.1. Expresión de Pr en distintos fondos genéticos en presencia de extracto de levadura	137
5.1.2. Discusión del capítulo V	142
Capítulo 6: ESTUDIO <i>in vitro</i> DE LA UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS IHF Y XylR A LA REGIÓN INTERGÉNICA <i>xyIR/xyIS</i> .	145
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	153
1. El dominio de unión a ADN del regulador XylS	156
2. El factor $\sigma^{32}$ participa en la expresión de Pm en fase exponencial	158
3. El gen <i>rpoH</i> de <i>P. putida</i> KT2440	159
4. La expresión de la proteína XylS está integrada en un mecanismo de regulación global	161
<b>CONCLUSIONES</b>	163
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	167



## *INTRODUCCIÓN*





El género *Pseudomonas* presenta una gran versatilidad metabólica, y muchas especies de este género son capaces de asimilar aeróbicamente un gran número de compuestos, muchos de ellos contaminantes medioambientales (Furukawa *et al.*, 1992). Entre estos se encuentran hidrocarburos lineales y aromáticos originados de los combustibles fósiles (Hütter *et al.*, 1981), entre los que se encuentran moléculas xenobióticas tales como tolueno, xilenos y benceno, o sus compuestos derivados (Atlas, 1995; Chaudlhry *et al.*, 1991). En general, las rutas bioquímicas responsables de la degradación de estos compuestos están determinadas por operones policistrónicos regulados por promotores activables por el sustrato de la ruta (van der Meer *et al.*, 1992). En muchos casos, los enzimas implicados en el metabolismo de estos compuestos están codificados por genes de localización plasmídica, y por tanto, de fácil propagación. Esto podría ser la causa por la que estas rutas se encuentran en muchos microorganismos, incluyendo especies no pertenecientes al género *Pseudomonas*.

La producción de compuestos xenobióticos ha aumentado de forma alarmante en las últimas décadas. Afortunadamente este aumento en la producción viene acompañado de un aumento en los estudios encaminados a la búsqueda de soluciones a través de la microbiología y de la biología molecular. La búsqueda y estudio de microorganismos capaces de degradar compuestos xenobióticos supone una alternativa eficaz y económica frente a otras metodologías para su eliminación. Ya en 1908 Stormer describió, por primera vez, una cepa del género *Bacillus* que utilizaba tolueno y xileno como fuente de carbono y energía. En 1913 Söhngen realizó un estudio análogo para el benceno y un año más tarde Wagner aisló microorganismos capaces de crecer en una mezcla de benceno, tolueno y xileno.

En 1963 se describió por primera vez la capacidad de la cepa *Pseudomonas putida* mt-2 para crecer en *m*-toluato (3-metilbenzoato) como única fuente de carbono (Nakazawa y Yokota, 1973; Nozaki *et al.*, 1963). Posteriormente se demostró que esa capacidad residía en un plásmido de alto peso molecular, que se denominó pWW0 (Kunz y Chapman, 1981; Ramos *et al.*, 1997; Worsey y Williams 1975). En la actualidad se han descrito varios plásmidos de este tipo que difieren de pWW0 en una serie de características, como

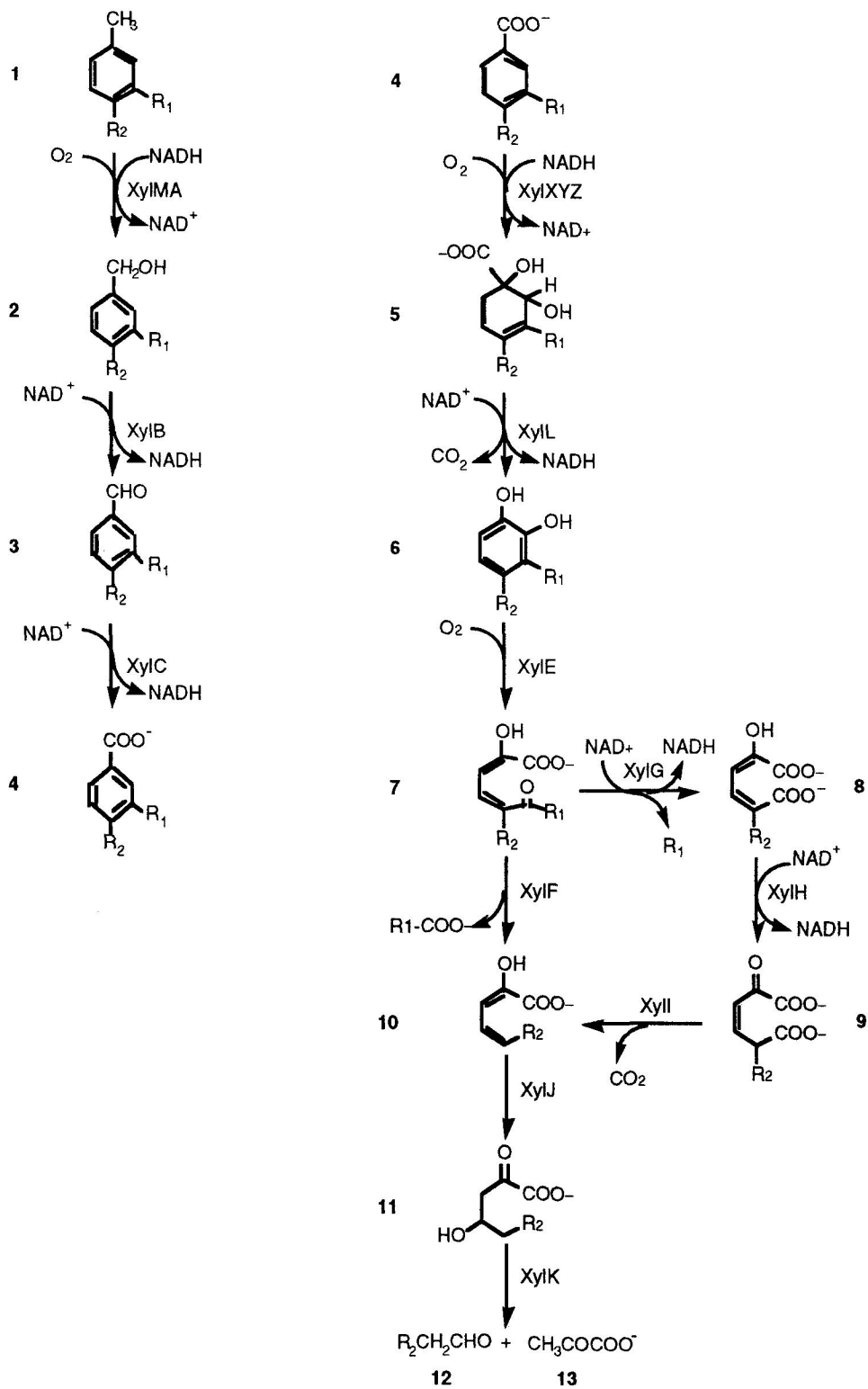
---

transmisibilidad, estructura molecular, patrones de restricción o presencia de deleciones (Assinder y Williams, 1990; Duggleby *et al.*, 1977; Worsey y Williams 1976).

Las funciones catabólicas que posteriormente se asociarían al plásmido TOL pWW0 se comenzaron a detectar a principios de los años 60. A lo largo de esta introducción describiremos su organización bioquímica y genética. Posteriormente resumiremos el modelo de control transcripcional vigente al iniciarse este trabajo en 1995, y las evidencias experimentales obtenidas a lo largo de las tres últimas décadas hasta llegar a ese modelo. El conocimiento molecular de las rutas y su regulación permite diseñar de forma racional y dirigida ulteriores trabajos de evolución *in vitro* de organismos con características mejoradas para la degradación de compuestos xenobióticos.

### 1.1 Organización bioquímica de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0.

La figura 1 muestra las reacciones implicadas en la degradación de tolueno e hidrocarburos aromáticos relacionados hasta intermediarios del ciclo de Krebs por los enzimas codificados por el plásmido TOL pWW0. El grupo metilo del carbono 1 del anillo aromático es oxidado secuencialmente vía alcohol bencílico y benzaldehído hasta el correspondiente ácido carboxílico (benzoato o los respectivos compuestos sustituidos). Este conjunto de reacciones constituye la llamada ruta *upper*. Los ácidos carboxílicos aromáticos son posteriormente metabolizados a través de la ruta *meta*, en la cual el benzoato o los alquilbenzoatos son oxidados y descarboxilados para producir catecol o alquilatecoles, que sufren una fisión *meta* para rendir el semialdehído 2-hidroximucónico o el correspondiente derivado alquílico. Dependiendo de que el benzoato tenga algún sustituyente o no y de la posición de éste, el semialdehído sigue una de las dos vías alternativas indicadas en la figura 1, que convergen posteriormente en un intermediario común: el 4-hidroxi-2-oxopentanoato, que entra en el metabolismo central a nivel de piruvato y acetaldehído. El semialdehído producido a partir de 3-metilbenzoato es metabolizado por un enzima hidrolítico que rinde 2-hidroxi-2,4-pentadienoato, mientras que el semialdehído derivado del benzoato y 4-metilbenzoato es metabolizado a través de la rama del oxalcrotonato, que implica al menos tres reacciones enzimáticas (Assinder y Williams, 1990; Harayama y



**Figura 1: Rutas metabólicas codificadas por el plásmido TOL pWW0.**

Los enzimas de la ruta *upper* son: XylMA, tolueno monooxigenasa; XylB, alcohol bencílico deshidrogenasa; XylC, benzaldehído deshidrogenasa y los de la ruta *meta* : XylXYZ, toluato 1,2-dioxigenasa; XylL, 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato deshidrogenasa; XylE, catecol 2,3-dioxigenasa; XylF, semialdehído 2-hidroximucónico hidrolasa; XylG, semialdehído 2-hidroximucónico deshidrogenasa; XylH, 4-oxalcrotonato tautomerasa; XylI, 4-oxalcrotonato descarboxilasa; XylJ, 2-hidroxi-2,4-pentadienoato hidratasa; XylK, 4-hidroxi-2-oxoalerato hidrolasa.

Los compuestos son:

Para  $R_1=H$  y  $R_2=H$ , (1) tolueno, (2) alcohol bencílico, (3) benzaldehído, (4) benzoato, (5) 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato, (6) catecol, (7) semialdehído 2-hidroximucónico, (8) 2-hidroxi-2,4-hexadien-1,6-dioato (forma enol del 4-oxalcrotonato), (9) 2-oxo-3-hexen-1,6-dioato (forma ceto del 4-oxalcrotonato), (10) 2-hidroxi-2,4-pentadienoato, (11) 4-hidroxi-2-oxopentanoato, (12) acetaldehído, (13) piruvato.

Para  $R_1=CH_3$  y  $R_2=H$ , (1) *m*-xileno, (2) alcohol 3-metilbencílico, (3) 3-metilbenzaldehído, (4) 3-metilbenzoato, (5) 1,2-dihidroxi-3-metil-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato, (6) 3-metilcatecol, (7) 2-hidroxi-6-oxo-2,4-heptadienoato, (10) 2-hidroxi-2,4-pentadienoato, (11) 4-hidroxi-2-oxopentanoato, (12) acetaldehído, (13) piruvato.

Para  $R_1=H$  y  $R_2=CH_3$  (1) *p*-xileno, (2) alcohol 4-metilbencílico, (3) 4-metilbenzaldehído, (4) 4-metilbenzoato, (5) 1,2-dihidroxi-4-metil-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato, (6) 4-metilcatecol, (7) 2-hidroxi-5-metil-6-oxo-2,4-hexadienoato, (8) 2-hidroxi-5-metil-2,4-hexadien-1,6-dioato, (9) 5-metil-2-oxo-3-hexen-1,6-dioato, (10) *cis*-2-hidroxi-2,4-hexadienoato, (11) 4-hidroxi-2-oxohexanoato, (12) propionaldehído, (13) piruvato.

Rekik, 1990; Harayama y Timmis, 1989; Harayama *et al.*, 1986; Harayama *et al.*, 1987a; Nakai *et al.*, 1983; Polissi y Harayama, 1993; Shaw y Harayama, 1990; Suzuki *et al.*, 1991).

## 1.2 Organización genética de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0.

Las rutas degradativas de tolueno y derivados están codificadas en una región de 40 kb de las aproximadamente 117 kb que tiene pWW0, que se localizan en un transposón de 56 kb llamado Tn4651 perteneciente a la familia de Tn3 (Chakrabarty *et al.*, 1978; Meulien *et al.*, 1981; Tsuda e Iino, 1987). Este transposón está a su vez incluido en otro de 70 kb de la misma familia, llamado Tn4653 (Tsuda e Iino, 1987). Estos transposones están relacionados con el transposón Tn1721 de clase II, lo que hace que estas rutas degradativas sean susceptibles de integrarse en el cromosoma por transposición, mediante formación de un cointegrado y su posterior resolución, mecanismos característicos de trasposones de clase II, requiriendo del producto de uno de sus propios genes, *impA*, para tal transposición

(Grinsted *et al.*, 1990; Sinclair y Holloway, 1991; Tsuda e Iino, 1987; 1988; Tsuda *et al.*, 1989).

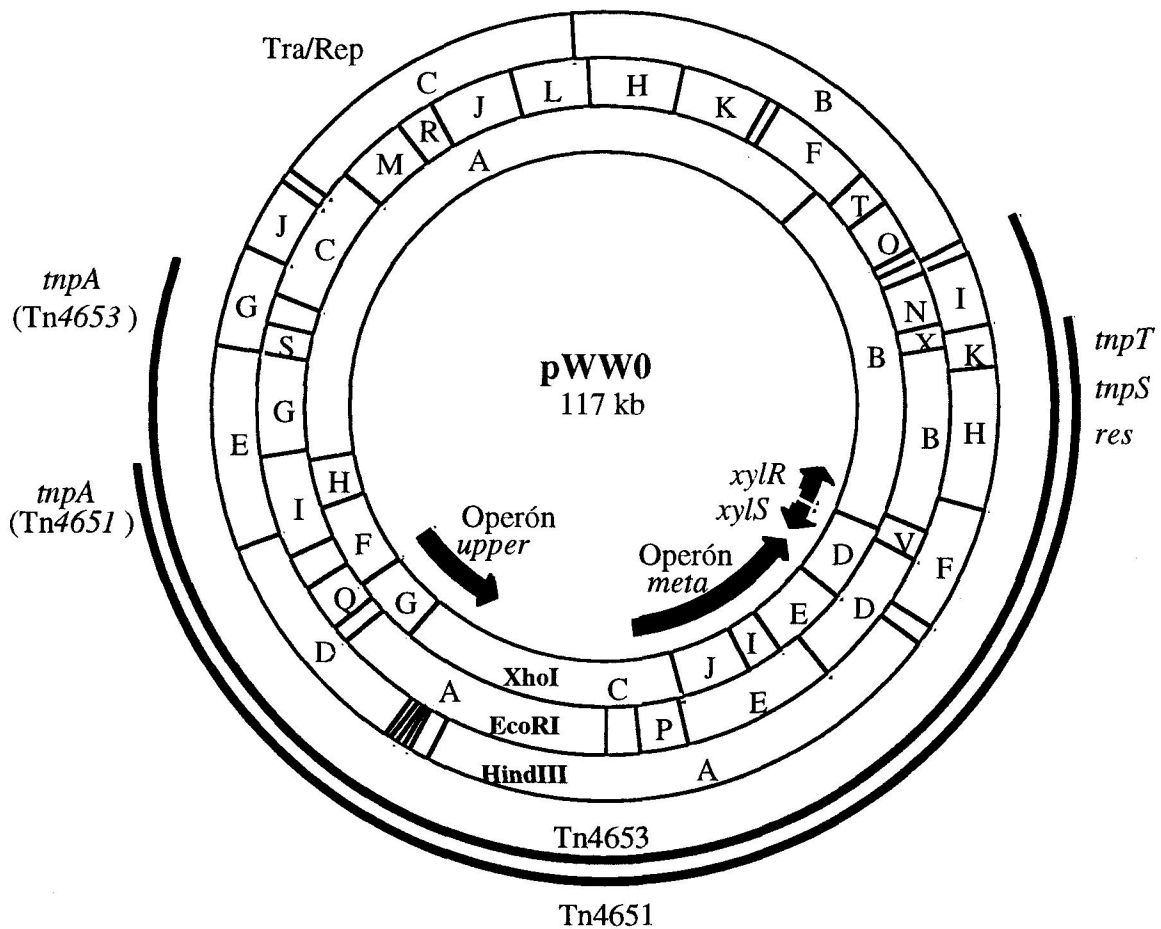
El primer mapa físico detallado de pWW0 se describió en 1979 y consta de aproximadamente 117 kb (Downing y Broda, 1979) (figura 2). Este plásmido pertenece al grupo de incompatibilidad P9 y es autotransmisible, aunque su espectro de hospedador está restringido a *Pseudomonas* pertenecientes al grupo I de ARNr y a algunas Enterobacteriáceas (Nakazawa, 1978; Ramos-González *et al.*, 1991).

La frecuencia de transferencia del plásmido pWW0 de mt-2 a pseudomonadáceas oscila entre  $10^{-1}$  y 1 transconjugantes por célula receptora (Nakazawa, 1978; Ramos-González *et al.*, 1991), y a enterobacteriáceas entre  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  transconjugantes por célula receptora (Benson y Shapiro, 1978; Jacoby *et al.*, 1978; Nakazawa, 1978; Ramos-González *et al.*, 1991). La expresión constitutiva de los genes de pWW0 que codifican el pili conjugativo podría explicar la alta frecuencia en la transmisibilidad de este plásmido (Bradley y Williams; 1982). La replicación de pWW0 parece ser termosensible, ya que en *P. aeruginosa* el plásmido no se mantuvo a 42°C (Nakazawa, 1978).

La organización de los genes catabólicos en los operones *upper* y *meta* refleja en cierta manera el funcionamiento bioquímico de la ruta. El orden y la función de estos genes se determinó mediante mutagénesis con transposones, clonación y secuenciación del ADN, así como por estudios de expresión de los mismos. La ruta *upper*, que codifica los enzimas para la oxidación de hidrocarburos aromáticos hasta sus correspondientes ácidos carboxílicos (figura 1) comprende 7 genes cuyo orden, *xyIUWCMABN*, fue definitivamente determinado por Harayama y colaboradores (1989) y Williams y colaboradores (1995 y 1996). El gen *xyIC* codifica una subunidad de 487 aminoácidos de la benzaldehído deshidrogenasa; este enzima es un homodímero y cataliza la oxidación de benzaldehído a benzoato con reducción de  $\text{NAD}^+$  (Shaw y Harayama, 1990) (figura 1). Los genes *xyIMA* codifican el heterodímero tolueno monooxigenasa, que cataliza la oxidación del grupo metilo del tolueno (o xilenos) para generar alcohol bencílico (o alcoholes alquibencílicos) (figura 1). El gen *xyIM* codifica el componente hidroxilasa de la tolueno monooxigenasa, un péptido de 348 aminoácidos, mientras que el gen *xyIA* codifica el componente del enzima que transfiere los electrones al sustrato (Harayama *et al.*, 1986). El gen *xyIB* codifica una subunidad de 366 aminoácidos de

---

la alcohol bencílico deshidrogenasa; este enzima, que es un homodímero, cataliza la oxidación del alcohol bencílico a benzaldehído con la reducción concomitante de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  (figura 1) (Shaw y Harayama, 1990). Los genes *xylU*, *xylW* y *xylN* codifican proteínas cuyas funciones no son imprescindibles para el crecimiento en tolueno o xilenos y se postula que *xylU* y *xylW* podrían codificar una proteína de la membrana externa, probablemente una porina específica de tolueno (Harayama, 1995 y Williams *et al.*, 1995; 1996).



**Figura 2:** Esquema del plásmido TOL pWW0 de *P. putida*.

Se representan los mapas de restricción del plásmido pWW0 para los enzimas *XhoI*, *EcoRI* y *HindIII*. Los fragmentos se nombran por orden alfabético en orden decreciente de acuerdo con su tamaño. Las flechas indican las regiones que contienen los operones *upper* y *meta*, así como los genes reguladores *xylR* y *xylS*, y su sentido indica el sentido de la transcripción. Se muestra la localización de los transposones Tn4651 y Tn4653, así como los genes que codifican las transposasas (*tnpA*) específicas de cada transposón, y resolvasas (*tnpS* y *tnpT*) y el sitio *res* de Tn4651, común para ambos transposones. También se indica la posición de las regiones de transferencia (Tra) y replicación (Rep).

Los enzimas necesarios para la degradación de benzoatos hasta intermediarios del ciclo de Krebs están codificados por la ruta *meta*. El orden de los genes, *xylXYZLTEGFJQKIH*, fue establecido definitivamente por Harayama y Rekik (1990). Los 13 genes se extienden a lo largo de 11 kb y constituyen uno de los operones más largos en procariotas (Harayama *et al.*, 1984; Marqués *et al.*, 1993). Los genes *xylX*, *xylY* y *xylZ* codifican las tres subunidades de 454, 162 y 336 aminoácidos respectivamente, de la toluato 1,2-dioxigenasa, que cataliza la conversión de benzoato a 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato (Harayama *et al.*, 1986; Subramanian *et al.*, 1981). El gen *xylL* codifica la 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato deshidrogenasa, de 273 aminoácidos, que cataliza la conversión de 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato a catecol (Neidle *et al.*, 1992). El gen *xylT* codifica una proteína de 112 aminoácidos necesaria para mantener catalíticamente activa a la catecol 2,3-dioxigenasa y parece ser una ferredoxina similar a la de los cloroplastos (Polissi y Harayama, 1993). El gen *xylE* codifica un polipéptido de 307 aminoácidos que constituye la catecol 2,3-dioxigenasa; la forma activa de este enzima consta de 4 subunidades idénticas y cataliza la conversión de catecol a semialdehído 2-hidroximucónico, requiriendo hierro no hemínico para su actividad (Nakai *et al.*, 1983a; 1983b). El gen *xylG* codifica una proteína de 487 aminoácidos, denominada semialdehído 2-hidroximucónico deshidrogenasa, que cataliza la conversión del semialdehído 2-hidroximucónico a 2-hidroxi-2,4-hexadien-1,6-dioato (Horn *et al.*, 1991). El gen *xylF* codifica una subunidad de 282 aminoácidos de la semialdehído 2-hidroximucónico hidrolasa; este enzima es un homodímero que cataliza la conversión de 2-hidroxi-3-metil-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato a 2-hidroxi-2,4-pentadienoato (Duggleby y Williams, 1986; Horn *et al.*, 1991). El gen *xylJ* codifica un polipéptido de 222 aminoácidos, denominado 2-hidroxi-2,4-pentadienoato hidratasa, que cataliza la conversión del 2-hidroxi-2,4-pentadienoato a 4-hidroxi-2-oxo-pentanoato (Harayama *et al.*, 1989; Horn *et al.*, 1991). El gen *xylQ* codifica una acetaldehído deshidrogenasa proteína de 312 aminoácidos dependiente de NAD<sup>+</sup> y coenzima A (Harayama y Rekik, 1993). El gen *xylK* codifica la 4-hidroxi-2-oxo-valorato hidrolasa, de 345 aminoácidos, que cataliza la conversión de 4-hidroxi-2-oxo-pentanoato en acetaldehído y piruvato (Harayama y Rekik, 1993). El gen *xylI* codifica la 4-oxalacronato descarboxilasa, de 264 aminoácidos, que cataliza la conversión de 2-oxo-3-hexen-1,6-dioato en 2-hidroxi-2,4-pentadienoato (Harayama y Rekik, 1993). Y por

---



último, el gen *xyIH* codifica la 4-oxalcrotonato tautomerasa, de 264 aminoácidos, que cataliza la conversión del 2-hidroxi-2,4-hexadien-1,6-dioato en 2-oxo-3-hexen-1,6-dioato (Harayama y Rekik, 1993).

### 1.3 Modelo de control transcripcional de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0 hasta 1995.

Adyacente al extremo 3' corriente abajo del operón *meta* se localizan dos genes reguladores, *xyIS* y *xyIR*, que se transcriben desde promotores divergentes (Inouye *et al.*, 1987a; Marqués *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1987) (figura 3). El gen *xyIR* codifica para XylR, proteína de 566 aminoácidos que pertenece a la familia de reguladores de NtrC/NifA (Morett y Segovia, 1993; North *et al.*, 1993). El gen *xyIS* codifica para XylS, una proteína de 321 aminoácidos perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales de AraC/XylS (Gallegos *et al.*, 1993; 1997; Ramos *et al.*, 1990b).

La figura 3 muestra el modelo para el control de la expresión de los operones catabólicos del plásmido TOL pWW0, vigente en 1995, año en que comenzó a elaborarse esta tesis doctoral (Marqués *et al.*, 1995). Este modelo explica la inducción de los enzimas de cada operón en células de *P. putida* (pWW0) creciendo en xilenos o toluatos. También el control catabólico de los operones refleja su organización bioquímica, existiendo dos bucles o circuitos de regulación. Un circuito funciona cuando las células están creciendo en toluatos (bucle *meta*) y el otro circuito, más complejo, funciona cuando las células están creciendo en xilenos (bucle *upper*), y asegura que tanto la ruta *upper* como la *meta* se expresen coordinadamente (Ramos *et al.*, 1987).

El circuito *meta* funciona de la siguiente manera: en células cultivadas en ausencia de efector (por ejemplo en glucosa o glicerol), el gen *xyIS* se está expresando a bajo nivel desde un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$  llamado Ps2, generándose proteína XylS a baja concentración, que se encuentra en su forma inactiva (XylS<sub>i</sub>). Cuando se añade un efector de tipo benzoato al medio de cultivo, la proteína XylS<sub>i</sub> interacciona con el efector y pasa a forma activada (XylS<sub>a</sub>) con capacidad para estimular la transcripción desde el promotor del operón de la ruta *meta* llamado Pm. El mantenimiento de altos niveles transcripcionales desde Pm a lo largo de las distintas fases de crecimiento parece requerir del factor de

transcripción  $\sigma^{70}$  en fase exponencial temprana y del factor  $\sigma^{38}$  en fase exponencial tardía o fase estacionaria.

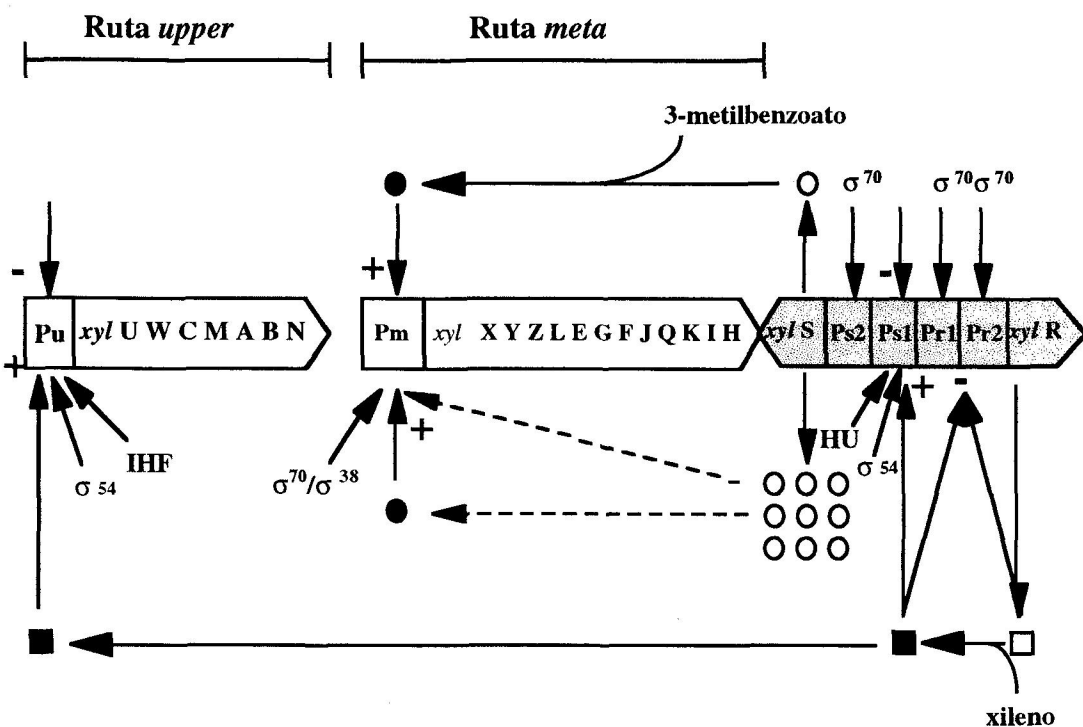


Figura 3. Modelo de regulación de las rutas degradativas del plásmido TOL.

La activación (+) o represión (-) ejercida por cada proteína sobre los promotores correspondientes se indica mediante flechas. También se representa: XylR inactivo (cuadrados blancos), XylR activo (cuadrados negros), XylS inactivo (círculos blancos), XylS activo (círculos negros), IHF, HU,  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{54}$ .

El circuito *upper* o en cascada funciona de la siguiente manera: en células creciendo en xilenos el regulador clave o fundamental en el control de las rutas catabólicas es XylR, proteína que se transcribe desde los dos promotores en tandem de *xylR* dependientes de  $\sigma^{70}$ , proceso en el que XylR controla su propia síntesis. La proteína XylR se encuentra siempre unida al ADN, cuyo blanco se encuentra a gran distancia del promotor (más de 100 pb), en lo que se conoce como “secuencias corriente arriba para la activación” (UAS) (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991). En presencia de efector, la proteína inactiva (XylR<sub>i</sub>) pasa a forma activa (XylR<sub>a</sub>) cuando se une al tolueno o xilenos. En esta forma activa se produce la unión de la proteína XylR estimulando la transcripción desde el promotor del operón de la ruta *upper* llamado Pu. En este proceso se requiere la ARN polimerasa con el factor de

transcripción  $\sigma^{54}$  y la proteína conocida como Factor de Integración del Hospedador (IHF), cuya función es curvar el ADN, gracias a lo cual el regulador unido a distancia al ADN contacta con la ARN polimerasa (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991). Paralelamente la forma activa de la proteína XylR estimula la transcripción del gen *xylS* al activar un segundo promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  que llamamos Ps1 (Inouye *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1987). Este proceso parece estar ayudado por la proteína asociada a cromatina HU, la cual también induce curvatura en el ADN (Pérez-Martín y de Lorenzo 1995a). En esta situación, el gen *xylS* se está expresando desde sus dos promotores Ps2 (constitutivo e independiente de XylR) y Ps1 (dependiente de  $\sigma^{54}$  y de XylR). Cuando el gen *xylS* se sobreexpresa, la proteína XylS se hiperproduce y como consecuencia de la alta concentración de proteína XylS, presumiblemente ésta se vuelve activa, dado que bajo estas condiciones se da transcripción desde Pm incluso en ausencia de efector de la ruta *meta* (Inouye *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1987).

La expresión desde los operones del plásmido TOL está integrada en un control metabólico general en *P. putida*, dado que tanto el promotor del operón de la ruta *upper*, como el promotor Ps1 de *xylS* están bajo control de represión catabólica, y en consecuencia, la expresión del operón de rotura en *meta* en presencia de tolueno y derivados también está sujeto de forma indirecta a represión catabólica (Duetz *et al.*, 1994; Marqués *et al.*, 1994).

#### **1.4 Datos experimentales que llevaron al modelo de regulación de las rutas degradativas del plásmido TOL pWW0 propuesto en 1995.**

En 1972 se definió por primera vez la ruta de rotura en *meta* para el catabolismo de benzoato, 3- y 4-metilbenzoato por *Pseudomonas putida* (pWW0) (entonces conocida como *Pseudomonas arvilla* mt-2), la cual se elucidó por estudios de espectrofotometría (Murray *et al.*, 1972).

Un año más tarde se describió una segunda ruta para el metabolismo de benzoato en mutantes espontáneos de *Pseudomonas putida* mt-2 deficientes en dos enzimas de la ruta *meta*. Esta segunda ruta se denominó ruta de rotura en *orto* por su mecanismo de rotura del anillo aromático (Nakazawa y Yokota, 1973).

En 1974 se constató que los genes que codificaban para la ruta *meta* se localizaban en un plásmido, y que la capacidad de crecer en 3- ó 4-metilbenzoato se perdía cuando *P. putida* crecía en ausencia de aromáticos y en presencia de mitomicina C. La ruta *orto* se localizó en el cromosoma, dado que no se perdió la capacidad para crecer en benzoato en estas condiciones (Williams y Murray, 1974). Por otra parte, este mismo año se determinó la transmisibilidad del plásmido TOL pWW0 (Wong y Dunn, 1974).

Los primeros datos bioquímicos de la ruta *upper* se publicaron en 1975 (Worsey y Williams, 1975), aunque fue en 1978 cuando, mediante estudios de complementación de mutantes obtenidos con nitrosoguanidina, quedó prácticamente definida la organización de los genes codificantes para los enzimas de esta ruta (Worsey *et al.*, 1978). Ya en este último trabajo se atribuyó un papel regulador a los genes *xylR* y *xylS* y se propuso un primer modelo para la regulación de estas rutas catabólicas, en el que no quedaban demostradas las funciones reguladoras de ninguna proteína, y en el que no se definía la especificidad de los inductores.

En 1979 se publicó el primer mapa de restricción del plásmido TOL (Downing y Broda, 1979) (figura 2). A comienzos de la década los 80 se clonó el operón *meta*, así como el gen *xylS*, en pBR322 y pACYC177 respectivamente, y se analizó la inducción del operón en una cepa de *E. coli* que contenía ambas construcciones. Así se demostró que el gen *xylS* codificaba para un regulador activable por inductores específicos (Inouye *et al.*, 1981). Sin embargo la organización genética de esta ruta así como la de la ruta *upper* se definió en el primer trabajo relevante del profesor Timmis en el ámbito del plásmido TOL (Franklin *et al.*, 1981).

El mismo tipo de estudio genético descrito anteriormente para la identificación del regulador positivo XylS se realizó en 1983 para definir el papel de XylR (Franklin *et al.*, 1983). El mismo grupo también clonó el gen *xylR* y fusionó el promotor de la ruta *upper* (Pu) al gen *chivato xylE*, con lo que mediante ensayos de actividad catecol 2,3 dioxigenasa (actividad del enzima codificada por el gen *xylE*) demostraron que *xylR* codifica para un regulador activable por inductores específicos con capacidad de estimular la expresión desde el promotor de la ruta *upper* y con capacidad de activar la ruta *meta* cuando el gen *xylS* estaba presente (Franklin *et al.*, 1983; Inouye *et al.*, 1983). De esta forma se propuso un

---

modelo más definido del sistema regulador que rige la expresión de las rutas catabólicas de TOL pWW0.

Las regiones promotoras de las rutas *upper* (Pu) y *meta* (Pm) se definieron en los años 1983 y 1984 respectivamente, cuando el origen transcripcional de ambos operones se definió por mapeo con nucleasa S1 y transcripción reversa (Inouye *et al.*, 1983; 1984a; 1984b; Mermod *et al.*, 1984), lo que permitió predecir las secuencias consenso para la unión de la ARN polimerasa de estos promotores.

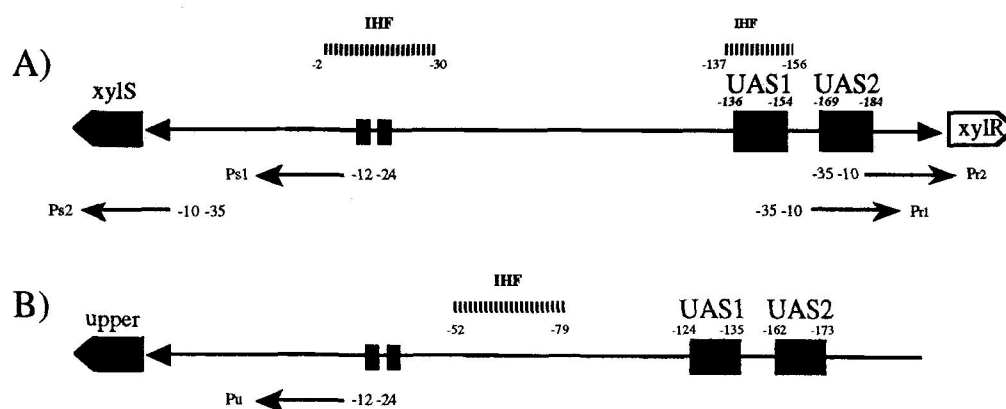
En 1985 se definió la región promotora del gen *xyIR* mediante mapeo con nucleasa S1 y con transcripción reversa, localizándose los dos orígenes transcripcionales de este gen (Inouye *et al.*, 1985). Las secuencias nucleotídicas de *xyIS* y de *xyIR* no se determinaron hasta 1986 y 1988 respectivamente (Inouye *et al.*, 1986; 1988; Mermod *et al.*, 1988). Inouye y colaboradores (1987) determinaron el efecto represor que XylR causa sobre los promotores desde los que se transcribe su propio gen (Inouye *et al.*, 1987a). También en el año 1987 Mermod y colaboradores clonaron el gen *xyIS* en pBR322 tanto a favor como en contra del promotor del gen de resistencia a tetraciclina y determinaron la actividad catecol 2,3-dioxigenasa generada por la expresión desde Pm en una fusión Pm::*xyIE*, con lo que describieron por primera vez el efecto por el cual la superproducción del gen *xyIS* conlleva una activación de la ruta *meta* en ausencia de efector específico, llegándose a esta conclusión en este mismo año por dos grupos independientes (Mermod *et al.*, 1987; Inouye *et al.*, 1987b). A mediados de este año apareció el primer modelo para la regulación de las rutas catabólicas basado en los dos bucles definidos en el apartado 1.3 de esta sección, que se realizó en base a los datos aportados anteriormente y a estudios de actividad  $\beta$ -galactosidasa de una fusión Pm::*lacZ* en cultivos con distintos efectores. En este trabajo se estableció la dependencia de Pu y de Ps1 del factor transcripcional NtrA ( $\sigma^{54}$ ) (Ramos *et al.*, 1987; Inouye *et al.*, 1987a), que posteriormente se corroboró con trabajos de fusiones de estos promotores al gen *lacZ* en los que se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas de *E. coli* y *P. putida* deficientes o no en el factor  $\sigma^{54}$ , definiéndose la región -12/-24 típica de promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  en Pu y Ps (Köhler *et al.*, 1989; Inouye *et al.*, 1987a; Ramos *et al.*, 1987). En 1989 se estudió el perfil de efectores de XylR, observándose que una gran

variedad de hidrocarburos aromáticos podían mediar la activación de XylR (Abril *et al.*, 1989).

En la década de los 90 se comenzó un estudio más detallado de los reguladores XylR y XylS, así como de su interacción con los promotores que regulan. Durante la primera mitad de esta década también se estudió la integración del catabolismo de aromáticos en una regulación global.

Así, en 1990 se describen las “secuencias para la activación corriente arriba” (UAS) en Ps y un año más tarde en Pu mediante un estudio comparativo y un análisis por mutaciones en ambos promotores, definiéndose estas como unas dianas con estructura de repeticiones invertidas para XylR localizadas entre -136 y -154 (UAS1) y entre -169 y -184 (UAS2) con respecto a Ps1 y entre -173 y -162 y entre -135 y -124 para Pu (Inouye *et al.*, 1990; Holtel *et al.*, 1990; Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991) (figura 4).

En 1991 Holtel y colaboradores sugirieron la existencia de un sitio con consenso para la unión de IHF en estos promotores. Pero no es hasta 1991 cuando se demostró la unión de IHF al promotor Pu por ensayos de retardo en gel (de Lorenzo *et al.*, 1991), demostrándose el requerimiento de este factor para la transcripción desde Pu: en un fondo genético IHF se obtuvo un nivel de transcripción desde Pu del 10 al 20% del alcanzado en el fondo silvestre (Abril *et al.*, 1991; Pérez-Martín y de Lorenzo, 1995a), y hasta 1992 cuando se demostró la participación de IHF en la expresión desde Ps también mediante ensayos de retardo en gel y



**Figura 4: Estructura de los promotores dependientes de XylR.**

A) Se representa la estructura de la región intergénica a *xylS* y a *xylR* en la que se encuentran los dos promotores de Ps (Ps1 y Ps2), y las UAS correspondientes a Ps1. También se indican los sitios propuestos para la unión de IHF. B) estructura de Pu en la que se representan las UAS y

el sitio propuesto para la unión de IHF. En ambos promotores se indican las regiones para la unión de la ARN polimerasa con  $\sigma^{54}$  en -12/-24 con respecto al inicio de la transcripción.

mediante medidas de actividad  $\beta$ -galactosidasa de este promotor en fondos carentes de IHF (Holtel *et al.*, 1992). Posteriormente, la interrupción de la secuencia de reconocimiento de IHF en Pu mediante inserciones específicas, condujo a una pérdida significativa de la expresión desde Pu en un fondo IHF (Abril y Ramos, 1993; Delgado *et al.*, 1995). También se demostró que la introducción de secuencias que curvan el ADN de modo natural en el promotor Pu, podían sustituir el sitio de unión de IHF (Pérez-Martín *et al.*, 1994), mostrando estos promotores alterados entre el 40 y el 100% de la actividad del silvestre y pasando a ser independientes de IHF. Por todo ello, se propuso que IHF intervenía en la regulación de Pu curvando el ADN, más que interaccionando directamente con la ARN-polimerasa, e incluso se sugirió que IHF podría impedir la activación cruzada de Pu por otros miembros de la familia de XylR, como NtrC y NifA (Pérez-Martín y de Lorenzo 1995a). Además del segmento -35/-47 homólogo al sitio de unión de IHF, en Ps se encontró un segundo sitio por homología de secuencia en -137/-156 (Holtel *et al.*, 1992; 1995). Altas concentraciones de IHF retardaron específicamente el ADN de Ps conteniendo secuencias desde +1 a -200 en ensayos de retardo en gel. Ensayos de protección *in vitro* contra digestión con ADNasa demostraron que IHF se une a Ps en la región distal mencionada y, sorprendentemente, entre +1 y -30 en la región proximal (Holtel *et al.*, 1995). Gomada y colaboradores (1992), Holtel y colaboradores (1992, 1995) y Pérez-Martín y de Lorenzo (1995b) coinciden en que IHF no participa estimulando la transcripción en Ps, ya que en una cepa deficiente en IHF, la actividad máxima de Ps fue al menos tan alta como en la silvestre correspondiente. Holtel y colaboradores (1995) sugirieron que IHF podría inhibir la expresión de Ps, ya que en un fondo *ihfA* los niveles de expresión de Ps fueron más altos que en la cepa silvestre, aunque esto no se había confirmado en otros laboratorios.

También a principios de los 90 se definió la región -120/-180 de Pu y Ps como la reconocida por el regulador XylR, mediante el estudio de deleciones y mutaciones puntuales en Pu (Abril *et al.*, 1991; Inouye *et al.*, 1990) y en Ps (Gomada *et al.*, 1992; Holtel *et al.*, 1990; 1992). En 1991, de Lorenzo y colaboradores definieron los sitios de unión de XylR en Pu por estudios de protección *in vitro* a ADNasaI (de Lorenzo *et al.*, 1991) y Abril y colaboradores lo hicieron mediante análisis de impronta *in vivo* que revelaron que las

---



regiones -140 y -180 exhibían patrones diferentes de protección/metilación dependiendo de la presencia o no de efectores. Análisis densitométricos demostraron claramente que XylR está siempre unido a las secuencias activadoras, pero que los contactos son diferentes en presencia y en ausencia de efectores (Abril *et al.*, 1991). Posteriormente se comprobó que los sitios de unión de XylR (UAS) en el promotor del gen *xylS* solapaban con los dos promotores de *xylR*, y se propuso este hecho como explicación de autorregulación de *xylR*, ya que al unirse XylR a las secuencias activadoras en Ps, podría impedir el acceso de la ARN polimerasa a los promotores Pr1 y Pr2 (Holtel *et al.*, 1992). Inouye y colaboradores demostraron que las secuencias de unión de XylR se pueden trasladar a una distancia de entre 200 pb y 1 kb en el promotor Pu, manteniendo su función (Inouye *et al.*, 1990). Gomada y colaboradores describieron que esas secuencias se conservaban activas cuando se trasladaban hasta 3,9 kb en el promotor Ps, aunque se observó dependencia de la periodicidad de la hélice de ADN, ya que la delección o inserción de 5 pb (media vuelta de hélice) entre las UASs y el promotor Ps disminuyó la expresión de éste un 60-70%, mientras que la inserción de una vuelta de hélice no tuvo efecto. Por tanto, se demostró, que para la activación de Ps es necesario que las UAS y el promotor estén en la misma cara del ADN (Gomada *et al.*, 1992).

Igualmente mediante proyecciones planares, se observó que los sitios de unión de XylR y del complejo ARN-polimerasa/ $\sigma^{54}$  en Pu estaban localizados en la misma cara del ADN, mientras que el sitio de unión de IHF se localizaba en la cara opuesta (de Lorenzo *et al.*, 1991). La introducción de media vuelta de hélice entre los sitios de unión de IHF y de XylR disminuyó la estimulación de la transcripción un 90% (Abril y Ramos, 1993) y, sin embargo, la introducción de una vuelta completa de hélice no alteraba la estimulación de la transcripción desde Pu. De acuerdo con el mecanismo de activación propuesto, y como en otros promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ , XylR necesitaba que el ADN se doblara para contactar con la ARN-polimerasa con  $\sigma^{54}$  unida a la región promotora (Khan *et al.*, 1986).

En 1992 Gomada y colaboradores sugirieron que la autorrepresión de XylR disminuía en un fondo genético carente de  $\sigma^{54}$ , independientemente de la presencia de Ps en *cis*, indicando que, bien  $\sigma^{54}$  o bien la ARN-polimerasa con  $\sigma^{54}$  podrían participar de alguna manera en el reconocimiento de las UAS por XylR (Gomada *et al.*, 1992). En cualquier caso,



Pérez-Martín y de Lorenzo (1996a) pusieron de manifiesto que una forma truncada de XylR se une *per se* a las UAS del gen *xylS*, lo que explicaría porqué está impedido el acceso de la ARN-polimerasa con  $\sigma^{70}$  a los dos promotores de *xylR*.

El estudio en detalle de la activación del promotor Pm comenzó en los años 80 cuando se observó que la expresión desde Pm requería de alrededor de 85 pb en 5' con respecto al punto de inicio de la transcripción (Ramos *et al.*, 1987; Spooner *et al.*, 1986). Además, dado que inserciones y deleciones en la región de -25 a -30 anularon la estimulación de la transcripción desde Pm, se dedujo que esta era la zona donde contacta la ARN polimerasa (Ramos *et al.*, 1987). Posteriormente Kessler y colaboradores generaron deleciones y mutaciones puntuales en este promotor, y analizaron la transcripción generada por los promotores mutantes mediada por XylS activado por 3-metilbenzoato (Kessler *et al.*, 1992; 1993). Sus resultados sugirieron que la zona de unión de XylS a Pm estaba organizada como dos motivos homólogos repetidos en tandem (5'-TGCAAPuAAPuPyGGNTA-3'), separados por 6 pb y parcialmente solapantes con la región -35 para la unión de la ARN polimerasa, proponiéndose como motivo de reconocimiento de XylS las repeticiones directas e imperfectas del motivo, de aproximadamente 36 pb, que incluían tres vueltas y media de la hélice del ADN. Recientemente y mediante una exhaustiva mutagénesis dirigida en la región entre -41 y -78 se han redefinido las dianas de unión de XylS como dos repeticiones directas de secuencia TGCAN<sub>6</sub>GGNCA localizadas entre las regiones -70 a -56 y de -49 a -35 (González-Pérez *et al.*, 1999). También recientemente Kaldalu y colaboradores han realizado ensayos de unión de una variante de XylS que porta el epítipo de una hemaglutinina en su extremo N-terminal al promotor Pm. Utilizando esta variante de XylS unida a una matriz de sefarosa, se realizaron ensayos de protección de Pm en los que se observó que XylS se une a lo largo de una de las caras del ADN, cubriendo 4 vueltas de hélice (desde -28 a -72) y que realiza contactos específicos de base con cuatro surcos mayores adyacentes (Kaldalu *et al.*, 1996).

El hecho de que los sitios propuestos para la unión de XylS estén muy cerca o parcialmente solapando con el sitio de unión de la ARN polimerasa, sugirió que el regulador podría contactar con la ARN polimerasa, como ocurre en otros promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  (Collado-Vides *et al.*, 1991). La interacción entre XylS y la ARN polimerasa podría estar

---

favorecida por la presencia de una serie de 6 adeninas localizadas entre -41y -46, las cuales curvan la molécula del ADN (Gallegos, 1996; González-Pérez *et al.*, 1999). En un fondo de *P. putida* carente de *xylS* se observó una ligera activación de Pm en respuesta a la adición de benzoato. Esta activación podría explicarse por causa de regulación cruzada mediada por algún regulador de origen cromosómico (por ejemplo BenR) (Jeffrey *et al.*, 1992; Kessler *et al.*, 1994).

Inicialmente se consideró que Pm era un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$ , a pesar de la poca similitud existente con la secuencia consenso típica de un promotor de esta clase, tal y como ocurre con otros promotores dependientes de este factor sigma (Collado-Vides *et al.*, 1991). Sin embargo experimentos realizados a mediados de la década, cuando se estableció este modelo transcripcional, donde se determinó la actividad transcripcional generada desde Pm en fondos de *E. coli* carentes de  $\sigma^{38}$ , demostraron que Pm dependía de este factor transcripcional durante la fase exponencial tardía y la fase estacionaria de crecimiento (Marqués *et al.*, 1995). Esto hizo pensar que Pm pertenecía a la familia de promotores dependientes de ARN polimerasa con  $\sigma^{70}$  o con  $\sigma^{38}$  en función de la fase de crecimiento (Altuvia *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1993; Jishage y Ishihama., 1995; 1997).

Como se ha dicho anteriormente, durante la primera mitad de la década de los 90 se avanzó mucho en el conocimiento de las proteínas reguladoras de los operones de las rutas metabólicas, gracias al desarrollo de las bases de datos y de la disponibilidad de programas informáticos adecuados.

Respecto a XylS, fue en 1990 cuando se estableció por primera vez la familia de AraC/XylS mediante alineamiento de 8 proteínas con el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) (Ramos, *et al.*, 1990). Esta familia se amplió en 1993 con 27 proteínas más, mediante el algoritmo de Lipman (Pearson y Lipman, 1988) usando la base de datos Swiss Protein existente en 1992, en la que se encontró que la conservación de las proteínas estaba restringida al tercio más cercano al extremo C-terminal de XylS, que incluía cerca de 300 aminoácidos. Se observó que todas las proteínas de esta familia estaban implicadas en el metabolismo del carbono, patogénesis o respuesta a agentes alquilantes en bacterias (Gallegos *et al.*, 1993). La última ampliación publicada de la familia AraC/XylS se realizó en 1997 mediante la comparación de los 99 últimos aminoácidos de las 27 proteínas entonces

---

constituyentes de la familia AraC/XylS mediante el algoritmo de Lüthy (Lüthy *et al.*, 1994), quedando la familia ampliada a más de 100 proteínas (Gallegos *et al.*, 1997). Sin embargo los estudios sobre XylS se vieron ampliados sobre todo mediante el análisis de mutantes puntuales. En estos estudios se determinó su capacidad para activar a Pm, y el perfil de efectores capaces de activar a XylS e inducir la expresión desde el promotor. La interacción de XylS con moléculas efectoras que determina la expresión mediada por XylS desde Pm fusionado a *'lacZ* se estudió en presencia de más de 50 compuestos análogos de benzoato. Estos estudios revelaron que muchos benzoatos sustituidos son efectores de XylS, aunque no todas las posiciones en el anillo son equivalentes; así, la posición 3 es altamente permisiva, ya que grupos metilo, etilo y átomos de F, Cl, Br y I como sustituyentes permiten la activación de XylS. Sin embargo, las posiciones 2 y 4 son más restrictivas y permiten sustituyentes tales como grupos metilo y átomos de F y Cl, pero no el grupo etilo ni átomos de Br ni I (Ramos *et al.*, 1986). Además, hasta la fecha no se han descrito benzoatos sustituidos simultáneamente en las posiciones 2 y 6 que sean efectores de XylS, y dado que sólo algunos derivados disustituidos en las posiciones 2 y 3, 2 y 5, y 3 y 4 permiten la activación de XylS, se sugirió que las interacciones del regulador con el efector son asimétricas. También se aislaron y caracterizaron una serie de reguladores mutantes que fueron capaces de reconocer como efectores benzoatos sustituidos que no eran reconocidos por la proteína silvestre, con mutaciones localizadas en las posiciones 37-45, 88-92, 151-155 y 288 (Michán *et al.*, 1992a; Ramos *et al.*, 1990a). Estos resultados sugirieron que en XylS el sitio de reconocimiento de los efectores podría estar constituido por dos o más segmentos no contiguos en la estructura primaria.

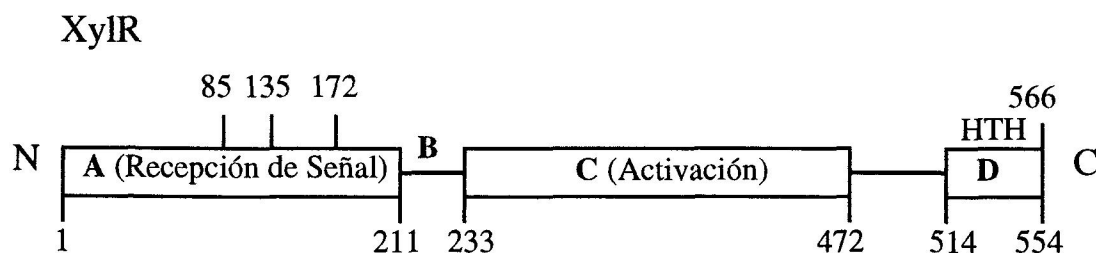
El residuo Arg41 parece ser un residuo crítico para la interacción con los efectores, ya que cambios en esta posición dieron lugar a mutantes con un comportamiento similar al silvestre (XylSR41S y XylSR41P), mutantes capaces de estimular la transcripción desde Pm en ausencia de efector (XylSR41C), mutantes con especificidad de efectores alterada (XylSR41G) y mutantes incapaces de responder a benzoatos (XylSR41L) (Michán *et al.*, 1992a).

No se conoce todavía cómo la interacción de XylS con los benzoatos conduce a la activación del regulador y a la estimulación de la transcripción desde Pm. Se ha propuesto

---

que, después de la unión del efector, se transmite una señal intramolecular desde el extremo amino de la proteína al carboxilo, de modo que XylS se une al ADN e induce la expresión desde Pm. Otra posibilidad es que la unión del efector favorezca la dimerización de XylS y el dímero sea la forma activa de esta proteína. Independientemente del mecanismo, los motivos de unión al efector y de unión al ADN no son completamente independientes, como se demostró por la dominancia intramolecular de mutaciones en el extremo carboxilo terminal sobre mutaciones en el extremo amino terminal y viceversa, en dobles mutantes de XylS construídos *in vitro* (Michán *et al.*, 1992b).

Respecto a XylR, fue en 1993 cuando North y colaboradores distinguieron los 4 dominios funcionales A, B, C y D de las proteínas de la familia NtrC/NifA, tres de los cuales (B, C y D) están muy conservados en todos los miembros de esta familia de reguladores positivos (North *et al.*, 1993) (figura 5). El dominio carboxilo terminal D



**Figura 5: Esquema de la estructura secundaria de la proteína XylR.**

Los 4 dominios de XylR están indicados en negrita como A, B, C y D, y debajo se indica entre qué aminoácidos se localiza cada uno. Las letras sin resaltar N y C se refieren a los extremos amino y carboxilo terminal respectivamente. Sobre el dominio A se representan los tres residuos donde se localizaron mutaciones que alteraron la especificidad o el requerimiento de efector.

contiene un motivo  $\alpha$ -hélice-giro- $\alpha$ -hélice de unión a ADN; el dominio central C, el mejor conservado en la familia, parece estar implicado en las interacciones con la ARN-polimerasa y en la hidrólisis de ATP que podría permitir la formación del complejo abierto en la transcripción. El dominio B ("linker" Q) es una región pequeña e hidrofílica, cuya misión es, probablemente, servir de unión entre los dominios C y A. Los reguladores de la familia se activan, bien mediante la fosforilación de un residuo de aspártico situado en el extremo amino terminal del dominio A (Ninfa y Magasanik, 1986), como en NtrC, o bien mediante la unión de efectores, como en XylR o DmpR (Abril *et al.*, 1989; 1991; Delgado y Ramos,

1994, Shingler *et al.*, 1993; Shingler y Moore, 1994). Por tanto, el dominio A parece estar implicado en la recepción de señal en esta familia de reguladores, y en todos los casos comprende unos 120-200 aminoácidos (North *et al.*, 1993). Las evidencias bioquímicas y genéticas que apoyaron esta hipótesis fueron que el Asp54 es el residuo que se fosforila en NtrC (North *et al.*, 1993) y que la mutación E172L en XylR dio lugar a un regulador mutante con especificidad de efector alterada, que era capaz de reconocer 3-nitrotolueno como efector, a diferencia del regulador silvestre (Delgado y Ramos, 1994). Además, se observó que, al reemplazar el módulo sensor de DmpR por el de XylR, la proteína quimérica respondía a los efectores de XylR (Shingler y Moore, 1994).

Para profundizar en el estudio de la activación de los promotores Pu y Ps por XylR, se aislaron mutantes constitutivos de XylR tras mutagénesis con nitrosoguanidina (Delgado *et al.*, 1995). De estos mutantes, dos fueron puntuales con mutaciones en el extremo amino terminal: XylRD135N y XylRP85S, lo que sugirió que estas sustituciones suprimían el requerimiento de efector. Otra característica interesante del mutante XylRD135N fue su capacidad para estimular la transcripción desde promotores Pu mutantes que habían perdido una de las UAS. Esto probablemente fue debido a que su afinidad por las UAS se vio incrementada como consecuencia del cambio conformacional producido en el regulador por la mutación en el dominio sensor. Análisis de la autorregulación de la expresión de los promotores de *xylR* sugirieron que la afinidad del regulador mutante por sus secuencias de unión era mayor, ya que la expresión desde los promotores Pr1 y Pr2 fue más eficientemente reprimida por el mutante XylRD135N que por el regulador silvestre. El carácter constitutivo conferido a XylR por el cambio D135N fue abolido por la mutación E172K, dado que el doble mutante XylRD135N,E172K había perdido el carácter constitutivo (Delgado *et al.*, 1995). Esto sugirió que la unión del efector a XylR induce cambios conformacionales que probablemente son transmitidos a los dominios central y de unión al ADN para estimular la transcripción, y que la alteración de esta cadena de transmisión de señal puede tener consecuencias importantes sobre la actividad transcripcional del regulador.

Se ha propuesto que el dominio A de este regulador ejerce un efecto inhibitor sobre la unión al ADN y la actividad ATPasa de los dominios carboxilo terminal y central. Este

---

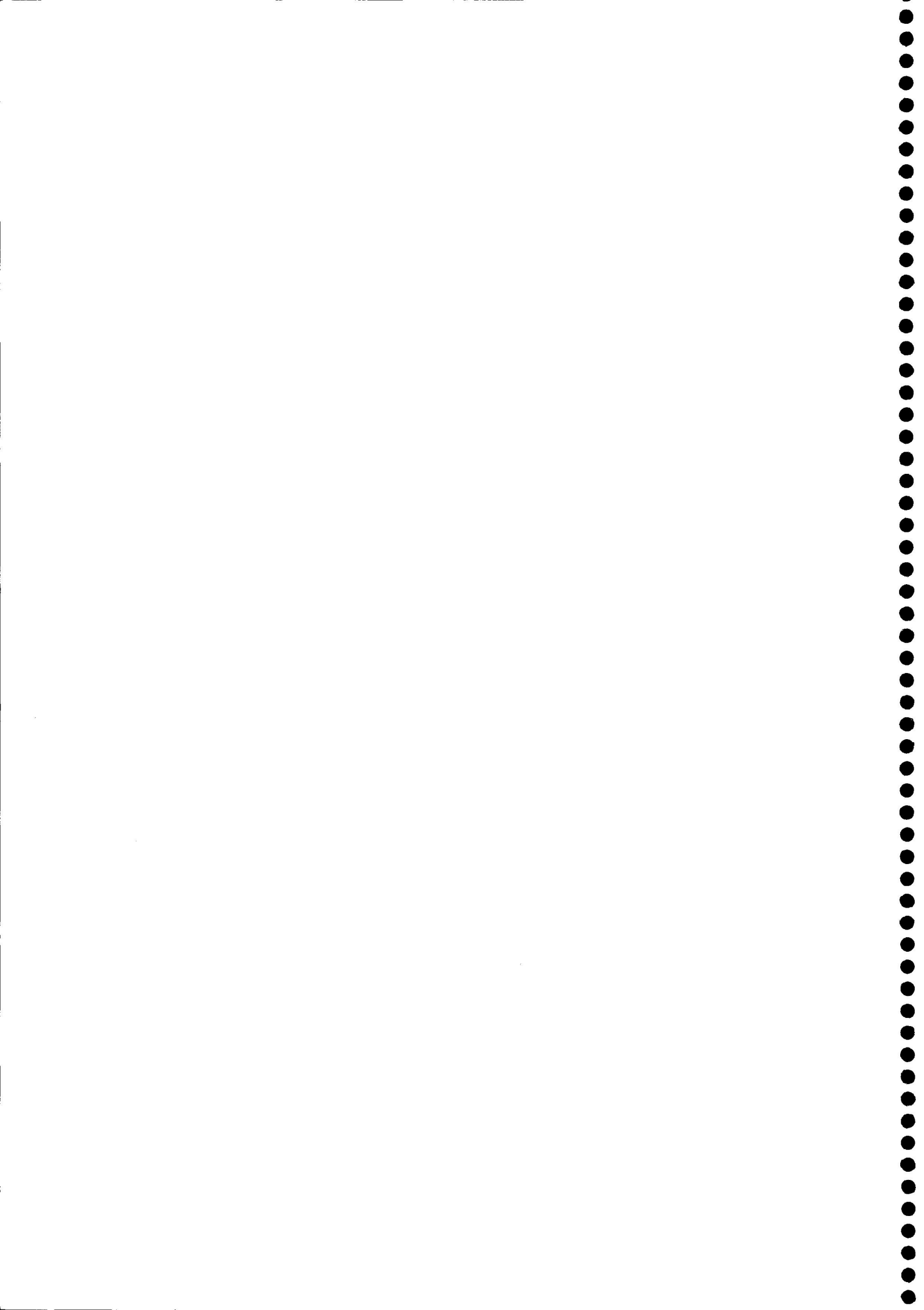
efecto represor se eliminaría mediante la unión de efectores o por mutaciones en el dominio amino terminal. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la eliminación del dominio amino terminal de XylR dio lugar a una proteína truncada que estimuló la transcripción constitutivamente desde Pu y Ps y presentó incrementada su actividad ATPasa (Fernández *et al.*, 1995; Pérez-Martín y de Lorenzo, 1995a; 1996a).

Para finalizar, en estos últimos años se han realizado diversos estudios sobre la integración del metabolismo de los compuestos aromáticos anteriormente citados en una regulación global. En 1990 se demostró que los operones catabólicos de TOL en células cultivadas en medio rico no se inducen inmediatamente tras la adición del aromático a no ser que el cultivo se encuentre en fase exponencial tardía, tanto en *P. putida* como en *E. coli*. Estos estudios se realizaron mediante fusiones de los distintos promotores de TOL al gen '*lacZ*', analizando la expresión de los promotores en función de la fase de crecimiento (Hugouvieux-Cotte-Pattat, *et al.*, 1990). Posteriormente, en 1994, se demostró que cuando las rutas de TOL se inducían en un medio rico, como LB, la respuesta a la adición del efector era lenta y se producían periodos de retardo relativamente largos antes de alcanzar un nivel máximo de expresión (Marqués *et al.*, 1994). Este fenómeno también ocurrió cuando se cultivaron las células en medio mínimo con el sustrato aromático y además se le añadía 1,5% de glucosa, sugiriendo que las rutas catabólicas de TOL están sujetas a represión catabólica (Duetz *et al.*, 1994; 1996; Holtel *et al.*, 1994). Las observaciones que han llevado a demostrar que los dos promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  y regulados por XylR están sujetos a represión catabólica son: a) altas concentraciones de glucosa (1,6% p/v) inhibieron la síntesis de ARNm desde Pu y Ps1 en *P. putida* (pWW0) creciendo en medio mínimo en presencia de alcohol bencílico (Holtel *et al.*, 1994); b) la expresión desde estos dos promotores mediada por efector se reprimió fuertemente durante las primeras horas de crecimiento en medio rico, en contraste con la inmediata y alta expresión cuando las células se cultivaron en medio mínimo con el inductor como única fuente de carbono (Marqués *et al.*, 1994); c) los promotores Pu y Ps1 se reprimieron totalmente en bacterias cultivadas en quimiostato a una tasa de crecimiento cercana a la máxima, en presencia de concentraciones no limitantes de succinato y en presencia de *o*-xileno (inductor no metabolizable). Se observó una expresión máxima de Pu y Ps1 en cultivo continuo a baja velocidad de crecimiento, cuando no había

exceso de succinato en el medio. La velocidad de crecimiento no era el factor limitante, ya que cuando se controló la velocidad de crecimiento con limitación de sulfato o fosfato en lugar de con fuente de carbono, las concentraciones de succinato presente (6 mM) provocaron la represión total del promotor Pu (Duetz *et al.*, 1994). Como resultado de la represión del promotor Ps1, la proteína XylS no se hiperproduce y por lo tanto la expresión del promotor Pm producida mediante el bucle en cascada o *upper* está sujeto también a represión catabólica, aunque esto no ocurre cuando el bucle para la activación de Pm es el *meta* (Duetz *et al.*, 1994). La represión catabólica en *Pseudomonas* no está relacionada con la descrita para enterobacteriaceas, dependiente de AMPc (Collier *et al.*, 1996; Holtel *et al.*, 1994), y parece estar más bien relacionado con condiciones metabólicas que producen cambios en el nivel y actividad de  $\sigma^{54}$  (Cases *et al.*, 1996; Du *et al.*, 1996). Esto se dedujo al observarse que una sobreproducción de  $\sigma^{54}$  reducía la represión observada en un cultivo en LB sobre una fusión de Pu::'lacZ insertada en el cromosoma de *P. putida* (Cases *et al.*, 1996). Recientemente se ha estudiado el conjunto de genes adyacentes a la secuencia de *rpoN* de *P. putida* y su relación con la regulación del metabolismo del carbono a nivel del promotor de la ruta *upper*, Pu. En esta región, que consta de 4 marcos de lectura abierta que codifican proteínas semejantes a los componentes del sistema fosfoenolpiruvato:azúcar fosfotransferasa, encontramos el gen *ptsN* que codifica la proteína IIA<sup>Ntr</sup>. Mutantes deficientes en esta proteína liberan a Pu de la represión catabólica ejercida por la glucosa descrita (Cases *et al.*, 1999).

## *OBJETIVOS*





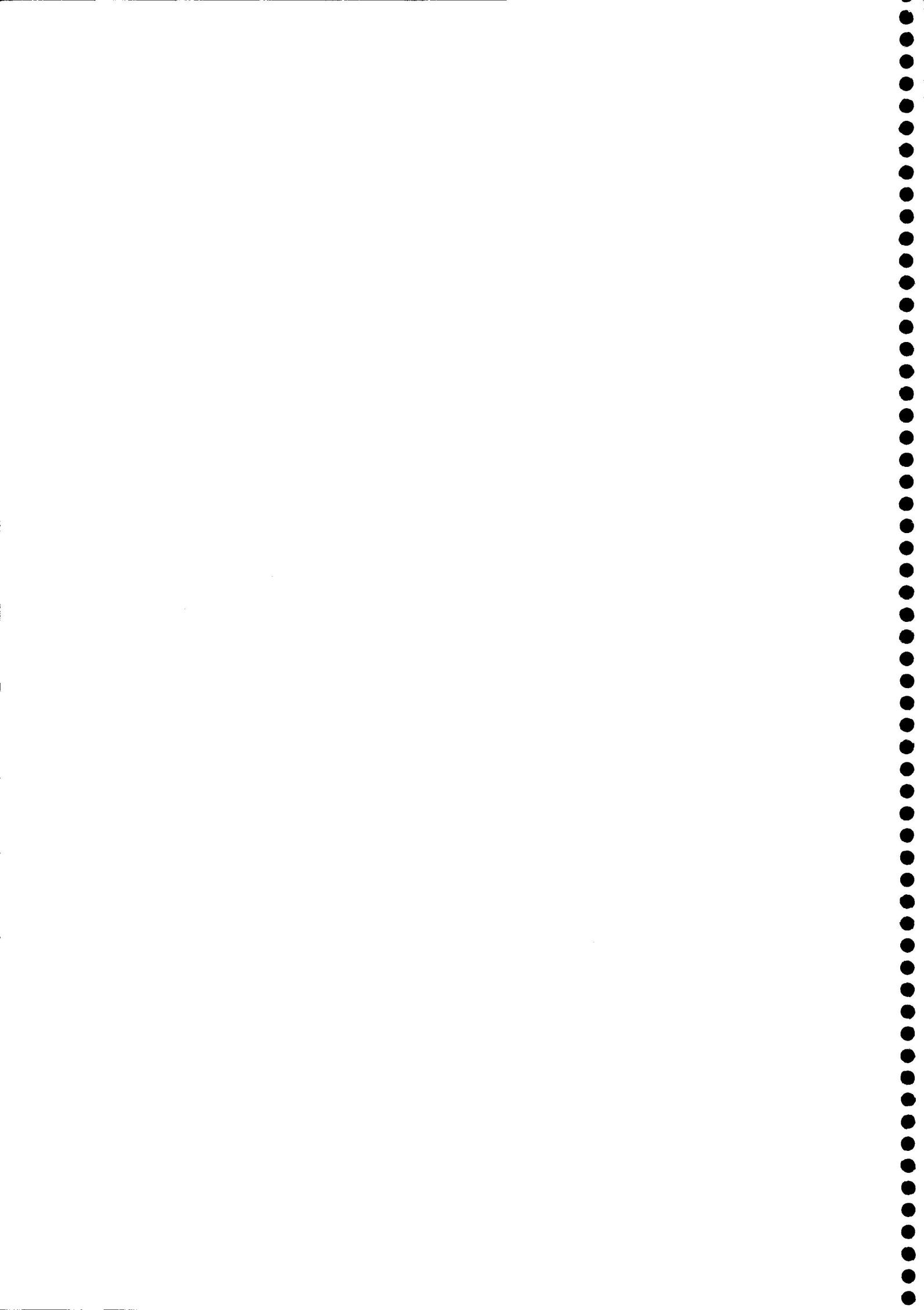
El modelo de regulación expuesto en la introducción y vigente al inicio de esta tesis doctoral dejaba una serie de puntos pendientes de aclaración con respecto a la regulación de la expresión de la ruta *meta*. Por una parte, los trabajos realizados anteriormente en nuestro grupo indicaban la participación del factor  $\sigma^{38}$  en la expresión desde Pm durante la fase de crecimiento estacionaria. Sin embargo, se desconocía la naturaleza del factor sigma involucrado en la expresión durante la fase exponencial.

Por otra parte respecto a la activación de Pm mediada por XylS, era escasa la información sobre los dominios de XylS que intervienen directa o indirectamente en la unión al promotor y la posterior activación.

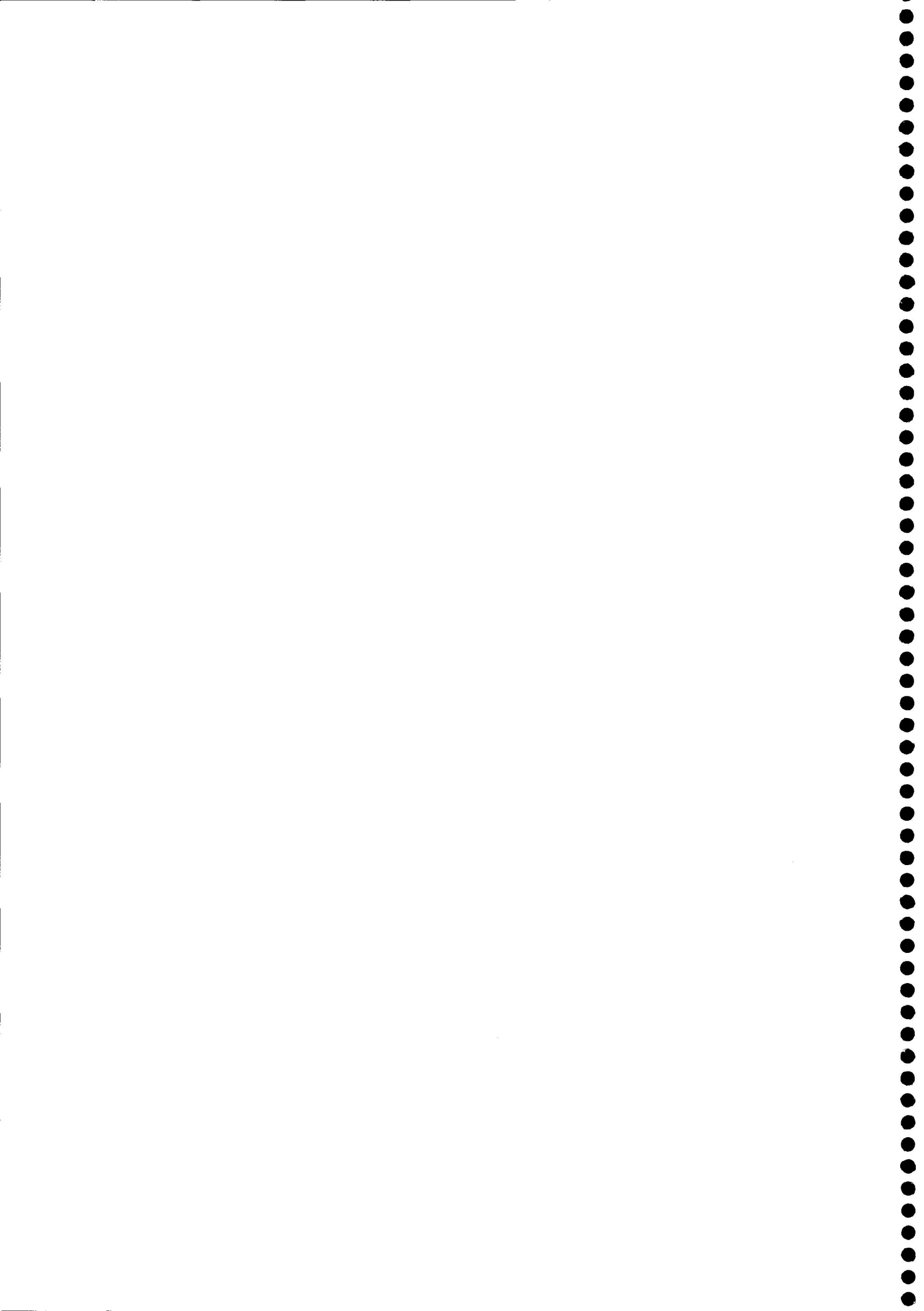
Como se ha descrito en la introducción, la activación de Pm es consecuencia directa de la concentración del regulador XylS en la célula, existiendo un mecanismo de activación independiente de efector cuando este promotor se activa a través del circuito de activación en cascada. Dado que la concentración de proteína XylS en la célula depende de la expresión de los promotores del gen *xylS*, era necesario estudiar los distintos factores que intervenían en la expresión de este gen y del gen divergente *xylR* que participa en su expresión.

Con objeto de aclarar estos puntos, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Identificación del factor sigma de la ARN polimerasa encargado de la transcripción desde Pm durante la fase exponencial de crecimiento.
  - 2.- Aislamiento y caracterización del gen que codifica el factor sigma en la transcripción desde Pm durante la fase de crecimiento exponencial.
  - 3.- Estudio de la región de XylS con función en la unión al ADN.
  - 4.- Caracterización de la expresión de los promotores divergentes *xylS* y *xylR* en distintos fondos genéticos. Estudio de la integración de esta expresión en un sistema de regulación global.
-



*MATERIALES Y MÉTODOS*



## 1. CEPAS BACTERIANAS

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

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo/fenotipo	Fuente o referencia
<i>Escherichia coli</i>		
KY1429	MC4100, <i>rpoH6</i> , (AM), <i>zhf-50::Tn10</i>	Zhou <i>et al.</i> , 1988
MC1061-14	$\Delta(lacZ)X74$ , <i>Ddrc</i> , <i>drs</i> , <i>irk</i> , <i>hns504</i> , <i>rpoS::kan<sup>r</sup></i>	Arnqvist <i>et al.</i> , 1994
MC4100	F <sup>-</sup> , <i>araD139</i> , $\Delta(argF-lac)U169$ , <i>rpsL150</i> , <i>relA1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>deoC1</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rpsR</i> .	M. Casadaban (no publicado)
MC4100 $\lambda$ pF13-( <i>PrpoD<sub>hs</sub>-lacZ</i> )	MC4100 lisogenizada con $\lambda$ pF13-( <i>PrpoD<sub>hs</sub>-lacZ</i> )	Yano <i>et al.</i> , 1987
RH90	MC4100, <i>rpoS59::Tn10</i>	Lange y Hengge-Aronis, 1991
SM25	KY1429 <i>rpoS::kan<sup>r</sup></i>	Marqués <i>et al.</i> , 1999
P90A5c	<i>thi lacZ4 argG75</i>	Harris <i>et al.</i> , 1978
UQ285	P90A5c <i>rpoD285</i>	Harris <i>et al.</i> , 1978
K165	F <sup>-</sup> , <i>lacZ53</i> , <i>phoA5</i> , $\lambda$ , <i>supC47</i> , <i>supC91</i> , <i>trp-48</i> , <i>relA1</i> , <i>rpsL</i> , <i>malT66</i> , <i>htpR1</i> , <i>spoT1</i> .	Cooper y Ruethinger, 1975
K165R	K165, <i>Rif<sup>r</sup></i>	Este trabajo.
HB101	F <sup>-</sup> , <i>supE44</i> , <i>hdsS20(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>-)</i> , <i>recA13</i> , <i>ara14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl5</i> , <i>mtl1</i> .	Boyer y Roullan-Dussoix, 1969
<i>P. putida</i>		
KT2440	<i>hsdMR</i> , Ben <sup>+</sup>	Franklin <i>et al.</i> , 1981
KT2440- <i>rpoN</i>	KT2440, <i>rpoN::Km</i>	Köhler <i>et al.</i> , 1989
KT2440-IHF3	KT2440, <i>ihfA::Km</i>	Marqués <i>et al.</i> , 1998

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla a continuación. Todos los medios y soluciones se esterilizaron en autoclave por calor húmedo a 120°C y 1 atmósfera de presión, o por filtración utilizando filtros de 0,22  $\mu$ m de diámetro de poro.

## 2.1 Medios ricos

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

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

## 2.2 Medios mínimos

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

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

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

Como fuente de carbono se utilizó succinato a una concentración final de 10 mM. El succinato se preparó como solución madre a una concentración de 1M, se esterilizó mediante autoclave y se almacenó a 4°C. Para la preparación de medio mínimo sólido se añadió bacto-agar a una concentración final del 2% (p/v). El bacto-agar se esterilizó previamente mediante autoclave en soluciones en H<sub>2</sub>O a una concentración de 2,25% (p/v).

**Extracto de levadura:** Cuando se requirió se añadió al cultivo extracto de levadura de una solución madre al 20% (p/v) en H<sub>2</sub>O que se esterilizó mediante autoclave.

Los aromáticos utilizados como efectores se prepararon como se describe a continuación:

***o*-xileno:** se preparó en una solución madre 2M en dimetilformamida.

**3-metilbenzoato:** se preparó en una solución madre 0,5M y su pH se ajustó a 7.

## 2.3 Antibióticos

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

(Cb), 500; cloramfenicol (Cm), 30; estreptomicina (Sm), 50; kanamicina (Km) 25; rifampicina (Rif), 20 y tetraciclina (Tc), 20.

#### 2.4 Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37°C y las cepas de *P. putida* se cultivaron a 30°C. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 200 rpm en un incubador orbital.

### 3. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

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

### 4. PLÁSMIDOS

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

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Fuente o referencia
pCM2	pSELECT-1, <i>xylS</i> , Tc <sup>r</sup> .	C. Michán. Este laboratorio.
pCMX2	pSELECT-1, <i>xylS</i> <sub>XhoI</sub> , Tc <sup>r</sup> .	Este trabajo.
pERD100	Tc <sup>R</sup> , Pm::'lacZ, IncP1	Ramos <i>et al.</i> , 1990
pERD103	pKT231, <i>xylS</i> , Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> .	Zhou <i>et al.</i> , 1990
pERD138	<i>IncQ</i> , <i>xylS</i> 37 (Pro-37 a Leu), Km <sup>r</sup> .	Michán <i>et al.</i> , 1992
pERD802	pTZ18, fragmento <i>NcoI/BamHI</i> de <i>xylS</i> .	C. Michán. Comunicación personal.
pERDX802	pTZ18, fragmento <i>NcoI/BamHI</i> del alelo <i>xylS</i> <sub>XhoI</sub> .	Este trabajo.
pEZ2a	pUC18, Pr-Ps	de Lorenzo. Comunicación personal
pHH5	pLARF3, <i>rpoH</i> , Tc <sup>r</sup> .	Este trabajo
pJB3KmD.1	pJB3KD, Ap <sup>s</sup> .	Gallegos, 1996
pJLR107	pBR322, Pm::'lacZ, Ap <sup>r</sup> .	Ramos <i>et al.</i> , 1986
pJS5	pJB3KmD.1, <i>xylS</i> , Km <sup>r</sup> , Ap <sup>s</sup> .	Este trabajo.

(Continúa en página siguiente)



(Continuación)

pJS7	pJB3KmD.1, <i>xyIS<sub>xhoI</sub></i> Km <sup>f</sup> , Ap <sup>s</sup> .	Este trabajo.
pMT500	pPR510, <i>xyIS</i> , Cm <sup>f</sup> .	Marqués <i>et al.</i> , 1998
pNM185	pKT231, <i>xyIS</i> , Pm, Km <sup>f</sup> .	Mermod <i>et al.</i> , 1986
pUNØ19	pUC19, pRP4 Mob <sup>+</sup> , Ap <sup>f</sup>	Marqués <i>et al.</i> , 1998
pWWΩXylR	pWW0:: <i>xyIR</i> ::ΩSm	Marqués <i>et al.</i> , 1998
pWW0	IncP9, <i>mob<sup>+</sup> tra<sup>+</sup></i> , 3MB <sup>+</sup>	Worsey y Williams, 1975
pSH27	pUNØ19, <i>rpoH P. putida</i> . Ap <sup>f</sup> , Cb <sup>f</sup> .	Este trabajo.

**pCM2:** Plásmido derivado de pSELECT-1 que contiene un fragmento de 1,7 kb *Bam*HI en el que se encuentra el gen *xyIS* expresado desde sus dos promotores naturales Ps1 y Ps2. Codifica resistencia a tetraciclina. (C. Michán. Comunicación personal).

**pCMX2:** Plásmido construido en este trabajo. Derivado de pCM2 en el que se ha introducido un sitio *Xho*I en el triplete codificante para la glicocola 266 de *xyIS* y a cuyo alelo llamamos *xyIS<sub>xhoI</sub>* siendo esta mutación silenciosa.

**pERD100:** Plásmido portador de una fusión Pm::*lacZ*, que se construyó clonando un fragmento *Pst*I de 401 pb que contiene el promotor de la ruta *meta* del plásmido TOL (Pm), proveniente de pJLR101, en el sitio *Pst*I de pMP220 (Ramos *et al.*, 1990a) Tc<sup>f</sup>.

**pERD103:** Plásmido que se construyó clonando en el sitio *Bam*HI de pKT231 el fragmento *Sau*3A de 1,7 kb procedente del plásmido TOL pWW0, que contiene el gen *xyIS*. Km<sup>f</sup>, Sm<sup>f</sup> (Zhou *et al.*, 1990).

**pERD138:** Similar a pERD103, pero con el alelo *xyIS*138, que representa una mutación puntual que, al traducirse, genera el cambio Pro37 a Leu en el regulador XylS (Michán *et al.*, 1992).

**pERD802:** Plásmido derivado de pERD800 (que a su vez deriva de pTZ18 por inserción de sitio *Nco*I en sitio *Hinc*II mediante un adaptador o linker), en el que se clonó el fragmento de 1 kb *Nco*I/*Bam*HI de pCM2 que codificaría la región C-terminal de *xyIS*. Codifica resistencia a ampicilina (C. Michán, comunicación personal).

**pERDX802:** Similar a pERD802, en el que se ha introducido un sitio *Xho*I que dista 523 bases de *Nco*I y 526 de *Bam*HI. Ap<sup>f</sup>. Este trabajo.

**pEZ2a:** Plásmido derivado de pUC18 que contiene el fragmento de 283 pb *Stu*I/*Taq*I en el que se encuentra la región de los promotores de *xyIS* y *xyIR*, clonada en el sitio *Hinc*II. Ap<sup>f</sup>. (V. de Lorenzo, comunicación personal).

**pHH5:** Cósmido derivado de pLARF3 que porta un inserto del cromosoma de *P. putida* construido por la Dra Ramos-González (1993). Este cósmido se seleccionó por su capacidad de complementar el genotipo *rpoH* de la cepa *E. coli* K165R. Tc<sup>f</sup>. Este trabajo

**pJBKmD.1:** Derivado Ap<sup>s</sup> de pJB3KmD que se obtuvo tras digerir dicho plásmido con *ScaI*, que corta dentro del gen que codifica el enzima β-lactamasa, y eliminar parte de él con la exonucleasa *Bal31*. Codifica resistencia a kanamicina (Gallegos, 1996).

**pJLR107:** Plásmido derivado de pMD1405 que contiene la fusión Pm::'*lacZ*, que se obtuvo clonando un fragmento *EcoRI-HindIII* de pJLR100 que contiene Pm. ColE1, Ap<sup>r</sup>. (Ramos *et al.*, 1986).

**pJS5:** Plásmido derivado de pJBKmD.1 en el que se clonó en el sitio *BamHI* en contra de *Plac* el fragmento de 1,7 kb *BamHI* de pCM2 que contiene el gen *xylS*. Km<sup>r</sup>. Esta tesis doctoral.

**pJS7:** Plásmido derivado de pJBKmD.1 en el que se clonó en el sitio *BamHI* en contra de *Plac* el fragmento de 1,7 kb *BamHI* de pCMX2 que contiene el gen *xylS*<sub>ChoI</sub>. Km<sup>r</sup>. Esta tesis doctoral.

**pMT500:** Plásmido derivado de pPR510 que contiene el gen *xylS*. (Cm<sup>r</sup>) (Marqués *et al.*, 1999).

**pUNØ19:** Plásmido derivado de pUC19 en el que se cual el sitio *NdeI* se ha cambiado por un sitio *NotI*, y en este último sitio se ha clonado el fragmento *EagI* de 0,7 kb que contiene el OriT (derivado de RP4) que le permite ser conjugado a *Pseudomonas*. (Marqués *et al.*, 1998).

**pSH27:** Plásmido derivado de pUNØ19 que contiene el gen *rpoH* de *Pseudomonas putida* clonado como fragmento de restricción parcial *PstI* de 1,7 kb de pHH5. Ap<sup>r</sup>. Este trabajo.

**pWWΩXylR:** Plásmido derivado de TOL en el que el gen *xylR* fue interrumpido por el interposón Ω Km<sup>r</sup> (Marqués *et al.*, 1998)

**pWW0:** Plásmido TOL arquetipo de *Pseudomonas putida*. Codifica las rutas catabólicas para el metabolismo de tolueno, *m*-xileno y 3-metilbenzoato. Es autotransmisible (mob<sup>+</sup>, tra<sup>+</sup>) (Worsey y Williams, 1975).

## 5. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

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

La cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó en agitación durante 6-14 horas a 30°C en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes.

### 5.1 Método "Qiapreps"

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

### 5.2 Método de la lisis alcalina

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

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

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

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

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

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

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

### **5.3 Aislamiento de plásmidos a gran escala y purificación en gradiente de cloruro de cesio.**

Para la preparación de plásmidos a gran escala se utilizó el procedimiento de Jouanin y colaboradores (1981).

Se partió de un preinóculo de 10 ml de la cepa portadora del plásmido a aislar cultivada durante 12-16 horas. El cultivo se diluyó 100 veces en 500 ml de LB suplementado con los antibióticos adecuados y se incubó a 30°C con agitación durante 12-16 h. Las células se recogieron por centrifugación a 4.000 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en 30 ml de GTE. A continuación se lisaron mediante la adición de 60 ml de solución SDS/NaOH recién preparada mezclando suavemente por inversión. Esta mezcla se mantuvo en hielo durante 5 min y el lisado obtenido se neutralizó añadiendo 45 ml de KAcF (acetato de potasio 3M; ácido fórmico 1,8M). Después de incubar 15 min en hielo, las proteínas y gran parte del ADN cromosómico precipitados por la neutralización, se retiraron por centrifugación a 5.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se añadieron 80 ml de isopropanol mantenido a -20°C; el ADN se precipitó centrifugando a 12.000 x g durante 15 min. El sedimento se drenó, se secó al vacío y se resuspendió en 10 ml de TE.

Posteriormente se realizó la purificación del ADN plasmídico mediante centrifugación en gradiente isopícnico de cloruro de cesio. A la solución de ADN en 10 ml de TE se añadieron 11 g de CsCl y 0,5 ml de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml). Los restos de proteína se eliminaron por centrifugación a 4.000 x g durante 15 min a temperatura ambiente para evitar la precipitación del CsCl. El sobrenadante se transfirió a tubos de ultracentrífuga con ayuda de una pipeta Pasteur y, una vez equilibrados, se sellaron por calor. El gradiente de CsCl se obtuvo por ultracentrifugación a 145.000 x g en un rotor Beckman 50Ti durante 48 h a 15°C. Las bandas de ADN plasmídico y cromosómico se visualizaron exponiendo los tubos a luz ultravioleta de 360 nm, y la banda inferior correspondiente al ADN plasmídico se extrajo mediante succión con una jeringa.

El bromuro de etidio de la preparación se eliminó por extracción con solventes orgánicos. Se adicionó 1 volumen de butanol, se mezcló y se centrifugó a 12.000 x g durante 2 min. La fase superior con el bromuro de etidio se descartó, y la operación se repitió hasta que la fase acuosa aparecía incolora. El ADN se precipitó añadiendo 2 volúmenes de H<sub>2</sub>O y 6 volúmenes de etanol absoluto, y tras incubar a -20°C durante 2 h, se recogió por centrifugación a 12.000 x g durante 10 min. El ADN precipitado se secó al vacío y se resuspendió en un volumen variable de H<sub>2</sub>O o TE, entre 100 y 400 µl, dependiendo del número de copias del plásmido aislado.

#### 5.4 Aislamiento de plásmidos TOL

Para la preparación de ADN del plásmido TOL pWW0 de *P. putida* y de sus derivados, se utilizó el método modificado descrito por Kado y Liu (1981). Se partió de un cultivo en LB de la cepa portadora del plásmido. Las células se recogieron de 0,5ml de un cultivo crecido durante 12 horas por centrifugación a 12.000 x g durante 2 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 400 µl de solución A y se incubaron a 4°C durante 5 minutos. A continuación se añadieron 200 µl de solución B, se agitó el tubo por inversión y se incubó durante 45 minutos a 55°C. Posteriormente se añadieron 0,1 volúmenes de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M y se agitó el tubo por inversión. El ADN se extrajo con 1 volumen de fenol neutro, tras centrifugar la mezcla a 12.000 x g durante 10 min, seguido de una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y de otra extracción con cloroformo-alcohol isoamílico. Finalmente, el ADN de la fase acuosa se precipitó por centrifugación a 12.000 x g durante 15 min tras añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,5 y dos volúmenes de etanol absoluto frío. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 12.000 x g durante 5 min. El sedimento de ADN se dejó secar a 37°C y se resuspendió en 50 µl de TE.

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

**Solución A:** Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM; EDTA-Na<sub>2</sub> pH 8,0, 25 mM; Sacarosa, 20% (p/v)

**Solución B:** SDS, 2% (p/v) y NaOH, 0,3 N.

**Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico:** se utilizó una solución de fenol saturado de la marca comercial Amresco (Ref:1-800-448-442), la solución se saturó con Tris-HCl hasta alcanzar un pH de 7,9. Finalmente, se mezclaron el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (v/v/v). La solución se conservó a 4°C en oscuridad.

**Cloroformo/alcohol isoamílico:** se mezclaron el cloroformo y el alcohol isoamílico en proporción 24:1 (v/v). La solución se conservó a 4°C en oscuridad.

#### 6. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL

Se siguió el método utilizado para el aislamiento de plásmidos TOL (apartado 5.4 de esta sección), eliminando la incubación durante 30 minutos a 55°C.

## 7. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS:

### 7.1 Por conjugación:

La conjugación bacteriana se utilizó para la transferencia de ADN plasmídico desde *E. coli* a cepas de *Pseudomonas*. El sistema utilizado fue el denominado "triparental". En este sistema de cruce, las funciones de transferencia (*tra*) son aportadas en *trans* por un plásmido auxiliar autotransferible (pRK600), el cual moviliza el plásmido en cuestión; de esta forma, la bacteria portadora del plásmido auxiliar también forma parte del cruce (de Lorenzo *et al.*, 1990). Este sistema implica que las cepas donadora y receptora, así como la cepa auxiliar, deben estar marcadas adecuadamente con resistencias a antibióticos o con capacidades metabólicas específicas que permitan la selección de los transconjugantes y la contraselección de donadores, receptores y cepa auxiliar.

Se partió de cultivos de las cepas donadora y receptora del plásmido en cuestión, así como de la cepa portadora del plásmido auxiliar, que habían sido cultivadas a 30°C en agitación durante 12-16 horas. Se recogieron aproximadamente  $10^8$  células de cada cultivo por centrifugación a 12.000 x g durante 5 minutos. Las células sedimentadas se lavaron 2 veces con 1 ml de medio 1xM9, posteriormente, las células se mezclaron y se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 2 minutos. A continuación, se suspendieron en 20 µl de 1xM9 y la suspensión bacteriana se depositó sobre un filtro de nitrocelulosa estéril de 0,22 µm de diámetro de poro colocado sobre la superficie de una placa de LB sólido, incubándose a 30°C durante 16-20 horas. Transcurrido este tiempo, el filtro con las células se colocó en un tubo con 5 mL de medio 1xM9, y las células se resuspendieron por agitación. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas en el mismo medio y se sembraron placas de medio selectivo para los transconjugantes. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de los transconjugantes. Las cepas donadora, receptora, y auxiliar, se sometieron al mismo tratamiento y se sembraron en placas del mismo medio selectivo, sirviendo de esta manera como controles negativos de la conjugación.

Simultáneamente, se hicieron siembras en los medios correspondientes para el crecimiento de las cepas donadora, receptora, y auxiliar, con objeto de realizar el conteo del número de bacterias totales iniciales presentes en el cruce. La frecuencia de transferencia del plásmido se expresó como el número de transconjugantes por receptor. En el caso de conjugación del plásmido TOL o sus derivados el procedimiento fue el mismo eliminándose el uso de la cepa con el plásmido auxiliar.

## 7.2 Por transformación mediante choque térmico:

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

## 7.3 Por electroporación:

La transformación de células de *Pseudomonas* se realizó mediante el método de Enderle y Farwell (1998). Para ello se partió de un cultivo saturado de *Pseudomonas* en medio sólido crecido a 30°C durante 10-14 horas que no se hubiera incubado a 4°C o temperaturas inferiores. De este cultivo se tomaron 3 mg de células evitando arrastrar el agar del medio y se resuspendieron en 0,5 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Las células de la mezcla homogénea se precipitaron por centrifugación a 12.000 x g, tras lo que se eliminó el sobrenadante y el precipitado se volvió a resuspender nuevamente en 500  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O destilada estéril, y a precipitar en las mismas condiciones. Posteriormente se resuspendieron en 40  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O destilada estéril y a partir de este momento todos los pasos se mantuvieron en hielo cuando hasta el pulso eléctrico. Las células preparadas según se ha descrito se mezclaron con 5-15ng de ADN limpio de sales y esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporar donde recibieron un pulso eléctrico mediante el Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad, ref. 165-2098). Tras el pulso eléctrico se añadieron 800  $\mu\text{l}$  de LB a temperatura ambiente a la mezcla y la suspensión se incubó 1 hora a 30°C. A partir de esta mezcla se hicieron diluciones seriadas en el mismo medio y se sembraron placas de medio selectivo para los transformantes.

## 8. MANIPULACION DE ADN Y ARN

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

Para estimar la concentración de ADN de una solución se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Sambrook y colaboradores (1989).

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



## 8.2 Restricción de ADN

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima fijadas por el fabricante. Las reacciones contenían habitualmente 0,5-5 µg de ADN, 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente suministrado por la casa comercial (10 veces concentrado), y 0,5-5 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-30 µl completados con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril. Las digestiones de plásmidos se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante, mientras que las restricciones de ADN total se incubaron durante 12-16 h.

## 8.3 Defosforilación de ADN con fosfatasa alcalina

El ADN ya cortado con enzimas de restricción se mezcló con la décima parte del tampón suministrado por el fabricante, y 0,1 a 0,5 unidades de fosfatasa alcalina de gamba ártica (USB. Amersham, ref. 70092), por cada 1,0 pmoles de extremos de ADN. Tras una incubación a 37°C de 1 hora la fosfatasa se inactivó por calor, incubando la reacción a 65°C durante 15 min.

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

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

Las moléculas de ADN se tñieron por inmersión en una solución con bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 10 minutos. Tras lavar en agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio, el ADN se visualizó mediante exposición del gel a luz ultravioleta (254 nm).

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

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



**Tampón TAE:** Tris-base, 4,84 g; ácido acético glacial, 1,14 ml; EDTA-Na<sub>2</sub> 0,5 M pH 8, 2 ml y H<sub>2</sub>O hasta 1 litro. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en el autoclave.

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

Los marcadores de peso molecular se prepararon de la siguiente forma: se cortaron 80 µl de ADN del fago λ (250 µg/ml) con 1,5 unidades de los enzimas *Hind*III y/o *Eco*RI por µg de ADN. Una vez digerido, se calentó a 80°C para separar las regiones *cos* de λ, y a la reacción se añadieron finalmente 80 µl de tampón de carga, completándose el volumen hasta 400 µl con TE, de forma que la concentración final de ADN en la solución fue de 50 µg/ml.

Cuando fue necesario la separación y visualización del ARN total también se realizó por electroforesis en geles de agarosa, para comprobar si existía contaminación de ADN genómico en las muestras. El procedimiento fue el mismo descrito para ADN, con las variaciones siguientes: todo el material de electroforesis se enjuagó previamente en SDS 10% y se aclaró con una solución 1:1.000 de DEPC en H<sub>2</sub>O autoclavada. El tampón TAE se preparó por dilución del 50 veces concentrado (anteriormente descrito) en solución 1:1000 de DEPC en H<sub>2</sub>O autoclavada. La concentración de la agarosa en el gel fue de 1,5% en lugar de 0,8% y se acompañó de 0,1% de SDS. Todo el material de vidrio para preparar estas soluciones se trató previamente con cloroformo para eliminar posibles ARNasas.

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

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

### 8.6 Ligación de ADN

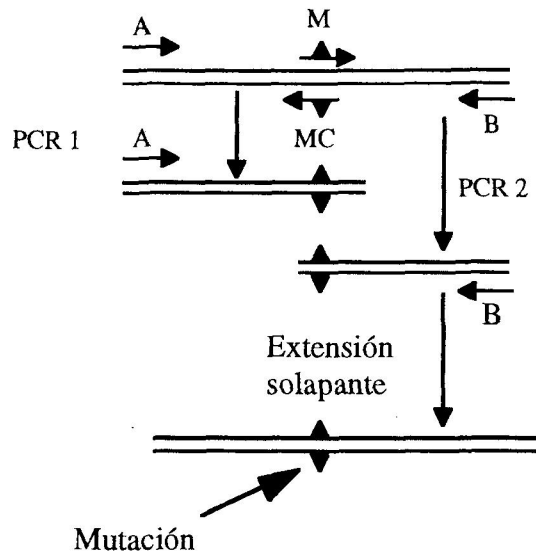
Para la ligación de moléculas de ADN se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. El vector linearizado y el fragmento de ADN obtenido por digestión con uno o varios enzimas de restricción y purificado (según se indica en el apartado 8.4 y 8.5), se mezclaron en una proporción adecuada y se añadió 0,1 volumen de tampón de ligación (suministrado por el fabricante) y 1 unidad de ADN-ligasa del fago T4 en un volumen final de 15-20µl completados con H<sub>2</sub>O. La mezcla se incubó a 14°C durante 8-14 horas, tras lo que se transformó por los métodos descritos en los apartados 7.2 y 7.3.

### 8.7 Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)

Este método se utilizó para la amplificación de fragmentos de ADN del cromosoma, para el análisis de colonias obtenidas tras la transformación de ligaciones (para encontrar de forma rápida el fragmento de interés), y para la realización de mutagénesis dirigida con oligonucleótidos (ver apartado 7 de esta sección). La reacción de amplificación contenía: ADN molde, 0,2 ng de ADN cromosómico o 10 pg de ADN plasmídico; cebador, 50-100 pmoles; tampón Taq ADN-polimerasa (KCL, 50 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM; Tris-HCl, 10 mM pH 9); dNTPs, 100-200 μM de cada uno; Taq ADN-polimerasa, 0,5 U/100 μl; H<sub>2</sub>O hasta 100 μl. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, se realizaron 25 ciclos en las siguientes condiciones: 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 50°C (temperatura de hibridación) y 1 minuto por cada 2 kb de ADN a extender a 72°C, seguido de una extensión de 10 minutos a 72°C. La temperatura de hibridación se varió en función de la temperatura de fusión de los cebadores utilizados. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria se combinaron distintas modificaciones en la concentración de MgCl<sub>2</sub> (incrementándola a 3 ó 4,5mM) y/o la presencia de ciertos compuestos en la mezcla de reacción, como por ejemplo glicerol al 10% (v/v) o DMSO al 5% (v/v). Ocasionalmente, el producto obtenido tras la amplificación se purificó utilizando el sistema comercial "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN, ref. 28104) para eliminar los cebadores y los dNTPs.

### 8.8 Mutagénesis dirigida con oligonucleótidos

Para la obtención de mutantes puntuales de *xyIS* se empleó el método de extensión de fragmentos solapantes (Higuchi, 1990; Ho *et al.*, 1989). Este método se basa en la utilización de 4 cebadores, de los cuales dos poseen al menos parte de sus secuencias complementarias y contienen la mutación que se desea introducir (ver tabla 3). Se llevan a cabo dos reacciones de PCR paralelas (figura 9): en primer lugar se realizan dos reacciones de PCR paralelas, una utilizando los cebadores A y M (éste último porta la mutación); y otra usando los cebadores MC y B (donde MC porta la mutación y es complementario a M), de forma que se generan dos fragmentos de ADN que tienen un extremo con una secuencia común que además contiene la mutación deseada. Posteriormente, se mezclan los dos fragmentos en una nueva reacción de polimerización cíclica en la que se extiende desde los cebadores A y B.



**Figura 9: Esquema del método de mutagénesis dirigida por extensión con PCR mediante fragmentos solapantes.**

En la figura se indican los nombres de los oligonucleótidos A, B, M (de mutante) y MC (de mutante complementario). Se nombran PCR 1 y PCR 2 para indicar que se tratan de reacciones separadas. La tercera reacción de extensión solapante utiliza como sustratos de la reacción híbridos productos de la PCR 1 con la PCR 2 que sirven como cebadores para obtener un fragmento suma de los dos productos que se amplifica con los oligonucleótidos A y B.

En la tabla 3 se muestran los oligonucleótidos usados para generar mutantes mediante esta técnica, y que hemos llamado genéricamente M y MC en este subapartado.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
A286G	AACTGAGATAG <u>G</u> CCTAGACTAC
A286GC	AGTCTAGG <u>C</u> CTATCTCAGT
F291V	CTACGGC <u>G</u> TCTTACATT
F291VC	AATGTAAG <u>A</u> CGCCGTAG
F291Y	CTACGGCT <u>A</u> CTTACATT
F291YC	AATGTAAG <u>T</u> AGCCGTAG
F297V	CATTTGGGACGC <u>G</u> TCGCTGAAAAC
F297VC	GTTTTCAGCGA <u>C</u> GCGTCCCAAATG
F297Y	CATTTGGGACGC <u>T</u> ACGCTGAAAAC
F297YC	GTTTTCAGCGT <u>A</u> GCGTCCCAAATG
G266XhoI	CAAGCTCGA <u>G</u> AGCATCCGC
G266XhoIC	GCGGATGCT <u>C</u> TCGAGCTTG
G290A	AGACTACGC <u>A</u> TTCTTACA
G290AC	TGTAAGA <u>A</u> TGCGTAGTCT

(Continúa en página siguiente)

(Continuación)

G306D	AGCGCGTT <u>CGA</u> CGAGTTGCC
G306DC	GGCAACTCGT <u>CGA</u> ACGCGCT
I282E	GCGTAGT <u>GTA</u> ACTGAGATAGCCC
I282EC	GGGCTATCTCAGT <u>TACT</u> ACTACGC
I282S	GCGTAGT <u>GTA</u> ACTGAGATAGCCC
I282SC	GGGCTATCTCAGT <u>TACT</u> ACTACGC
I282V	GCGTAGT <u>GTA</u> ACTGAGATAGCCC
I282VC	GGGCTATCTCAGT <u>TACT</u> ACTACGC
L313R	CCGACACCC <u>G</u> GCGTCAATG
L313RC	GCATTGACGC <u>C</u> GGGTGTCGGA
P309E	CGGCGAGTT <u>GGA</u> ATCCGAC
P309EC	GTCGGAT <u>TCCA</u> ACTCGCCG
P309H	CGGCGAGTTG <u>CA</u> TTCGAC
P309HC	GTCGGAA <u>TG</u> CAACTCGCCG
P309V	CGGCGAGTTG <u>GTT</u> TCCGAC
P309VC	GTCGGAA <u>AAC</u> CAACTCGCCG
Y301F	CTGAAAAC <u>T</u> TAGGAGCG
Y301FC	CGCTCCTA <u>AA</u> AGTTTTTCAG
Y301S	GAAAAC <u>C</u> TAGGAGCGCG
Y301SC	CGCGCTCCTA <u>G</u> AGTTTTTC
Y301V	GCTGAAAAC <u>G</u> TTAGGAGCG
Y301VC	CGCTCCTA <u>ACG</u> TTTTTCAGC

**Tabla 3: Cebadores utilizados para la generación de mutantes dirigidos por PCR.**

Los oligonucleótidos señalados son complementarios a su ADN diana excepto en la secuencia en negrita y subrayada que indican los cambios introducidos con respecto a la secuencia original.

## 8.9 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN plasmídico se realizó tanto de forma manual como automática. Para la secuenciación manual se siguió tanto la versión original de las instrucciones del sistema comercial "T7 Sequencing Kit" (Pharmacia P-L Biochemicals, ref. 27-1682-01) basado en el método de Sanger *et al.*, (1977), usando [ $\alpha$ - $^{35}$ S]dATP y la polimerasa del fago T7, como una variación de este sistema en el que en lugar de usar [ $\alpha$ - $^{35}$ S]dATP se utilizó 5-10 pmoles de cebador previamente marcado con  $10^5$  cpm en su extremo 5' con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (según se describe en el apartado 8.11), y en la que a la reacción de marcage se le añadió 16  $\mu$ M de dATP frío (esta variación de secuenciación se utilizó como patrón de peso molecular en las determinaciones de orígenes de transcripción mediante

análisis de extensión a partir de cebador). La secuenciación automática se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra del CSIC en Granada, utilizando un aparato Applied Biosystems (modelo 373 STRECHT), así como en el servicio de secuenciación automática del Grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC en Granada, utilizando el aparato ABI PRISM™ (modelo 310) de Perkin Elmer. El método de secuenciación fue el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISM™ Dye Terminator que utiliza en la reacción de extensión el enzima comercializado como "AmpliTaQ ADN Polymerase" (ref. 402122), y emplea dideoxinucleótidos marcados diferencialmente con cromóforos fluorescentes.

**Tabla 4. Cebadores usados para la secuenciación de fragmentos de ADN.**

Nombre	Secuencia (5' → 3')
ASH	GCGCTGCAGGGCCTGGACGAG
BSH	TCGGCCTGATGAAAGCCGTCA
CSH	GCCTTGATCCAGTGCACGGC
Reverso	CAGGAAACAGCTATGACCATG
SHR1	AACTTTGAATGCAGCCCGGC
SHR2BIS	CCGCTGCCGGGTCAAAGGCC
SHU1	CCTGGCGTTGGCGGACGCCC
SHU2	GCTGGCGTGGGGCATCC
Universal	GTTGTAAAACGACGGCCAGTG

### 8.10 Extracción de ARN

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

Para la preparación de ARN se recogieron fracciones alícuotas de volumen variable en función del estado de crecimiento del cultivo, en tubos previamente enfriados en nitrógeno líquido. Los sedimentos celulares obtenidos por centrifugación en frío se mantuvieron a una temperatura de -80°C hasta la extracción del ARN. Para la extracción se añadió 1,4 ml de solución de lisis y se mezcló y agitó vigorosamente con los sedimentos de cada muestra, tras lo cual se incubó a 60°C durante 10 min, sometiendo la mezcla a agitación periódica durante este tiempo. Pasado el tiempo de incubación, se añadió 0,28 ml de cloroformo, agitándose de nuevo para homogenizar la muestra. Se centrifugó a 10.000 x g en frío durante 10 min, y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio al que se le añadió 0,66 ml de isopropanol frío, que se mezcló e incubó a -20°C durante 15 min. Los ácidos nucleicos se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 15 min, y el sedimento se lavó con etanol al 70%. Una vez seco se resuspendió en 75 µl de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>.

A los ácidos nucleicos extraídos se les eliminó el posible ADN presente mediante tratamiento con ADNasa, para lo cual se preparó una mezcla de ADNasaI y se añadió 25µl por muestra a los 75µl de ácidos nucleicos anteriormente extraídos. Este tratamiento se realizó durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se trató con proteinasa K para eliminar las proteínas presentes en las muestras. Para ello se preparó una mezcla de proteinasa K y se añadió 110 µl de esta mezcla a la anterior mezcla ya tratada con ADNasaI. Este tratamiento también se realizó durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se realizó una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y otra con corofomo:alcohol isoamílico. El ARN presente en la fase acuosa de esta última extracción se precipitó añadiendo 0,1 volumen de acetato sódico 3M pH 4,8 y 2 volúmenes de etanol frío. Tras mantener la mezcla a -80°C durante 30 minutos se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos y el sedimento se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 30 µl de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>. La concentración de ARN de la solución resultante se cuantificó espectrofotométricamente según se describe en el apartado 8.1 de esta sección.

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

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

**Solución D:** Guanidium isotiocianato, 4M; Na Citrato, 25mM; N-lauril Sarcosina 0,5% (p/v), H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> hasta 50ml. Una vez disuelta la mezcla, se esterilizó por autoclave y se le añadió 0,36 ml de β-mercaptoetanol.

**Mezcla de ADNasaI:** RNase inhibitor, 20 U (inhibidor de ARNasas); DTT (ditiotreitól) 0,1M, 1 µl; MgCl<sub>2</sub> 1M, 1 µl; ADNasa I (libre de ARNasa) 10 U, H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> hasta 25 µl.

**Mezcla de Proteinasa K:** Tris 0,2 M pH 7 /NaCl 0,1 M, 100 µl; SDS 10%, 4 µl, EDTA 0,5 M, 4 µl, Proteinasa K (libre de ARNasa), 56 µg.

El resto de soluciones se preparó en una solución 1:1.000 de DEPC en H<sub>2</sub>O, y tras 1 hora de incubación se inactivó el DEPC mediante esterilización en autoclave. El H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> es el resultado esterilizar en autoclave una solución 1:1.000 de DEPC en H<sub>2</sub>O.

### 8.11 Marcaje de cebadores

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se marcaron por fosforilación en su extremo 5' con [γ-<sup>32</sup>P]ATP. Cada reacción contenía en un volumen final de 10 µl 10 pmoles de oligonucleótido, 1 µl de [γ-<sup>32</sup>P]ATP (>3.000 mCi/mmol) y 1 unidad de polinucleótido quinasa del fago T4 y 1 µl de tampón de polinucleótido quinasa 10 veces concentrado,. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 1 hora y la quinasa se eliminó tratando con

fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. El exceso de nucleótido radiactivo se eliminó por filtración a través de una columna rellena con gel Sephadex G-25.

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

## 9. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE CEBADOR.

### 9.1 Reacción de extensión

Como cebadores complementarios a las cadenas de ARN se utilizaron los oligonucleótidos que se muestran en la tabla 5; éstos hibridan con secuencias próximas al extremo 5' de los ARNm de los genes en estudio, generalmente dentro de la región codificante. Para la hibridación de los oligonucleótidos marcados con las cadenas de ARN se mezclaron 2 µl de tampón de hibridación, 10<sup>5</sup> cpm del oligonucleótido marcado y 10-60 µg de ARN total en un volumen final de 10 µl. La mezcla se incubó a 85°C durante 5 minutos, se pasó a un baño a 65°C y se dejó enfriar hasta 45°C. La reacción de extensión se realizó añadiendo 40 µl de tampón de transcriptasa reversa que contenía: 1 mM de cada uno de los 4 desoxinucleótidos, 20 U de RNase Inhibitor, 3 µg de Actinomicina D y 7 U de transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de ave, y se incubó a 44°C durante 1 hora. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 µl de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 150 µl de etanol.

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

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

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

**Tabla 5: Oligonucleótidos usados para realizar ensayos de extensión de cebadores.**

Nombre	Secuencia (5' → 3')
OSP <sub>s</sub>	GAGACTGCATAGGGCTCGGCGTGG
OSX <sub>y</sub> IX	GATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG
Pr	ACGGATCTGGCTGCTAAGGTCTTGC
RPOHPE2	GCTCATAATAGAGACGCTCGCCC

### 9.2 Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis

La separación de las cadenas con distinta longitud se llevó a cabo mediante electroforesis en geles (40 x 20 cm) desnaturizantes de poliacrilamida al 6% (p/v) en TBE, a potencia fija de 40 W y voltaje variable entre 1.500 y 2.000 V.



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

La composición de las soluciones utilizadas fue la siguiente:

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

**Solución concentrada de acrilamida 40%:** acrilamida, 38 g; N,N'-metilenbisacrilamida, 2 g y H<sub>2</sub>O hasta 100 ml. Esta solución se filtró a través de membrana de nylon mediante vacío. La solución filtrada se almacenó en oscuridad a 4°C.

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

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

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

## 10. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA POR EL MÉTODO DE "SOUTHERN BLOT" E HIBRIDACIÓN

La técnica utilizada es la descrita en el libro de métodos "Current protocols in molecular biology" (Ausubel *et al.*, 1991).

### 10.1 Transferencia de ADN.

#### 10.1.1 Por capilaridad.

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

El gel se sumergió en una solución 0,25 N de HCl durante aproximadamente 15 minutos hasta que se produjo el viraje del azul de bromofenol de azul a amarillo, este tratamiento ácido permite introducir mellas en el ADN y depurarlo, lo que facilita la



transferencia. El ADN se desnaturalizó introduciendo el gel en una solución de NaOH 0,5 M, hasta que se observó de nuevo el viraje del indicador ahora de amarillo a azul.

Sobre un cristal, se colocó una tira de papel Whatman 3MM, del mismo ancho que el gel, de manera que los extremos quedasen sumergidos en la solución de transferencia (NaOH 0,5 M), colocada en un reservorio inferior. Sobre el papel se colocó el gel en posición invertida y sobre éste la membrana, sobre la cual se depositaron tres tiras de papel Whatman 3MM previamente humedecido, abundante papel absorbente y un peso de aproximadamente 0,5 Kg. De esta forma la solución de transferencia ascendió por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó retenido. La transferencia total del ADN del gel a la membrana requirió entre 12 y 16 h.

La membrana se lavó posteriormente en 2xSSC durante 5 min permitiendo su neutralización y la eliminación de posibles restos de agarosa.

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

### 10.1.2 Por vacío.

Tiene el mismo fundamento que la técnica descrita en el apartado 10.1.1, pero la transferencia del ADN del gel de agarosa a la membrana de nailon se realizó por aplicación de vacío, utilizando el aparato "VacuGene XL Vacuum blotting System" (Pharmacia, ref. 56-1130-80) según las indicaciones recomendadas por el fabricante.

## 10.2 Marcaje no radiactivo de ADN lineal

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

En algunos casos el marcaje de la sonda se hizo por PCR utilizando el paquete comercial de Boehringer Mannheim "digoxigenina-11-dUTP" (ref. 1093088) que provoca una incorporación múltiple de dUTP marcado, ya que puede ser usado como sustrato por la Taq polimerasa, reemplazando al dTTP durante la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de reacción contenía: ADN molde, 0,05-1 µg; cebador 25 pmoles; tampón Taq ADN-polimerasa (10X) 5 µl; dNTPs: 0,2 mM de dATP, dCTP y dGTP; 0,18 mM de dTTP y 0,02 mM de dig-dUTP; Taq ADN-polimerasa 1,2 U y H<sub>2</sub>O hasta 50 µl. Para la amplificación se usó el programa descrito en el apartado 8.7 para la amplificación de genes cromosómicos.

### 10.3 Prehibridación e hibridación

Se utilizó un horno de hibridación (Techne Hybridiser HB-1D, Cambridge). Tras 2-8 horas de prehibridación a 42°C con 20 ml de solución de hibridación por cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana, ésta se retiró parcialmente, manteniéndose 2,5 ml/100 cm<sup>2</sup>. Entonces, se añadieron 20-200 ng de sonda marcada y desnaturalizada, y posteriormente se realizó la hibridación durante 6-15 horas a 42°C. El lavado de las membranas se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 10 min cada uno a temperatura ambiente en 2xSSC + 0,1% (p/v) de SDS y dos lavados de 15 min a 68°C en 0,1xSSC + 0,1% (p/v) de SDS. Cuando se emplearon sondas heterólogas se omitieron los dos últimos lavados a 68°C, sustituyéndolos por dos lavados de 10 minutos con 1xSSC + 0,1% (p/v) de SDS a temperatura ambiente.

La composición de las soluciones de hibridación fue la siguiente: 5xSSC; formamida, 50% (v/v); 0,02% (p/v) SDS; 5% (p/v) agente bloqueante; H<sub>2</sub>O hasta 20 ml.

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

### 10.4 Reacción inmunológica

Esta reacción se realizó según protocolo detallado por Boehringer Mannheim después de la hibridación la membrana con solución tampón-1, y se incubó en 100 ml de solución tampón-2 durante 30 minutos. A continuación se lavó con tampón-1 y se incubó con 20 ml de solución de anticuerpo (anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina conjugado) diluido en tampón-1 durante 30 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15 min con 100 ml de tampón para eliminar el anticuerpo no unido. A continuación, la membrana se equilibró con 20 ml de solución tampón-3 durante 2 minutos y finalmente se incubó con 10 ml de la solución colorante durante 20 horas en oscuridad. La reacción se detuvo lavando con 50 ml de TE durante 5 minutos.

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

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

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

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

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

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

El bloqueante y las soluciones de NBT y BCIP fueron suministradas en el paquete comercial de Boehringer Mannheim (ref. 1093657).

## 11. ENSAYOS DE IMPRONTA *in vitro* O DE PROTECCIÓN DEL ADN

Para identificar los sitios de unión de proteínas a secuencias específicas de ADN, se realizaron ensayos de impronta *in vitro* o de protección del ADN a la acción de la ADNasaI. Para ello se aisló el fragmento de ADN a analizar, se marcó radiactivamente sólo en uno de sus extremos y se incubó con ADNasaI en presencia de la proteína a ensayar. Sólo los sitios protegidos por la proteína evitaron el corte de la ADNasaI, que se caracterizaron posteriormente en una electroforesis en condiciones desnaturizantes por la ausencia de banda o por un cambio en la intensidad de la misma. El fragmento de ADN a ensayar se obtuvo cortando con dos enzimas distintas, una de las cuales produjo extremos romos, no rellenable con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa, y la otra enzima produjo extremos biselados susceptibles de rellenarse con nucleótidos radiactivos mediante el fragmento Klenow de la ADN polimerasa, de forma que la molécula de ADN quedase marcada solamente en un extremo. Dado el pequeño tamaño de los fragmentos utilizados en este tipo de experimento, el aislamiento de la banda no se realizó como se describe en los apartados 8.4 y 8.5, si no que se aisló después de separarlo en geles de acrilamida. Los fragmentos de ADN de la restricción se separaron en gel al 4% (p/v) de acrilamida en TBE. La banda del gel que contenía el fragmento de ADN de interés se escindió e incubó en 1 ml de tampón de elución en agitación a 37°C durante 8-14 horas, tras lo cual se retiró la banda de acrilamida, y el ADN del sobrenadante se precipitó con 100 µl de acetato sódico 3 M, pH 4,8 y 2 volúmenes de etanol. Se centrifugó a 12.000 x g durante 15 min y el precipitado se lavó con 1 volumen de etanol 70%. El precipitado se secó y resuspendió en 75 µl de H<sub>2</sub>O.

Para el marcaje del fragmento así obtenido se mezcló 1-2 ng del fragmento purificado con 2,5 µl de tampón KGS (10 veces concentrado), 1 µl de una mezcla 5 mM de dCTP, dGTP y dTTP; 20-30 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (el desoxinucleótido marcado varía en función de las bases rellenables en el sitio de restricción), 1 U de fragmento Klenow de la ADN polimerasa y se completó a un volumen final de 25 µl con H<sub>2</sub>O. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora, tras lo cual se le añadieron 50 µl de H<sub>2</sub>O y el exceso de nucleótidos se eliminó por filtración a través de una columna de Sephadex G-25. El fragmento marcado se guardó a -20°C hasta su uso, durante un máximo de 2 semanas.

Para la reacción de ADNasaI se utilizó de 1 a 2 µl de fragmento marcado por muestra. Se añadieron concentraciones crecientes de proteína a cada muestra y el aumento de volumen provocado por el aumento de proteína se compensó con tampón de proteína. Todas las muestras se llevaron a un volumen final de 100 µl con el mismo volumen de tampón de reacción. Las mezclas se preincubaron a 30-37°C durante 5 min, tras lo cual se añadieron

3 pg de ADN<sub>N</sub>asal en 1 mM de CaCl<sub>2</sub> y se incubó 2,5 min a 37°C, tras lo cual la reacción se paró con 50 µl de Tampón de Parada y 350 µl de etanol. El ADN se precipitó por centrifugación a 12.000 x g durante 30 min, y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Tras secarse, el precipitado se resuspendió en 15 µl de tampón de muestra. Las cadenas de ADN de la muestra se separaron por electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes junto a una reacción de A+G que sirvió de marcador de peso molecular. Esta electroforesis, así como el revelado del gel se realizó como se indica en el apartado 9.2.

Para la reacción de A+G se utilizó una fracción alícuota del fragmento marcado que se ha descrito anteriormente. Para la realización de esta reacción se mezcló de 1-5 ng de fragmento marcado, 1 µg de ADN de esperma de salmón, 10 µl de ácido fórmico 10% y se llevó a un volumen final de 25 µl con H<sub>2</sub>O. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min tras lo cual se le añadió 150 µl de piperidina 1M, y se incubó a 95°C durante 10 min. La reacción se precipitó con 17,5 µl de acetato sódico 3M pH 6,7 y 400 µl de etanol, junto a 60 µg de ARN<sub>t</sub> de levadura, centrifugándose a 12.000 x g durante 30 min. La reacción se resuspendió en 15 µl de tampón de muestra.

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

**Tampón de elución:** Acetato amónico 0,5 M; acetato magnésico 10 mM; EDTA 1 mM pH8; SDS 0,1% (p/v) y H<sub>2</sub>O hasta 10 ml.

**Tampón KGS 10 veces concentrado:** Tris-HCl 66 mM pH 7,5; MgCl<sub>2</sub>, 66 mM; NaCl, 500 mM; DTT, 20 mM.

**Tampón de proteína:** Tris HCl 20 mM pH 7,5; β-mercaptoetanol 1 mM; EDTA 1 mM; ClNa 100 mM; glicerol 50%.

**Tampón de reacción:** BIS-TRIS 10 mM pH7; MgCl<sub>2</sub> 2mM; EDTA 0,1mM; KCl 50 mM; BSA 100 µg/ml y ADN de espera de salmón 15 µg/ml.

**Tampón de parada:** EDTA, 0,1 M; SDS 0,1%; acetato amónico 1,6 M y 0,3 mg/ml de ADN de esperma de salmón.

**Tampón de muestra:** Tris HCl 20 mM pH 7; Urea 7 M; xilencianol y azul de bromofenol 1 mg/100 ml.

## 12. MEDIDA DE ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA

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

Se partió de cultivos de las células correspondientes en medio LB suplementado con los antibióticos necesarios, que habían sido incubadas a 30°C con agitación durante 12-16 horas. Las células se diluyeron 100 veces en 3 ml del mismo medio y se incubaron a 30°C en agitación durante 3 horas. Cuando fue necesario las células se indujeron con el inductor adecuado. Tras un periodo de incubación determinado se tomaron alícuotas de 100 µl del cultivo y se añadió el mismo volumen de una solución del detergente bromuro de alquil-trimetil-amonio (MATAB) con objeto de permeabilizar las células. Esta mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos.

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

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

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

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

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

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

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

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

### 13. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS

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

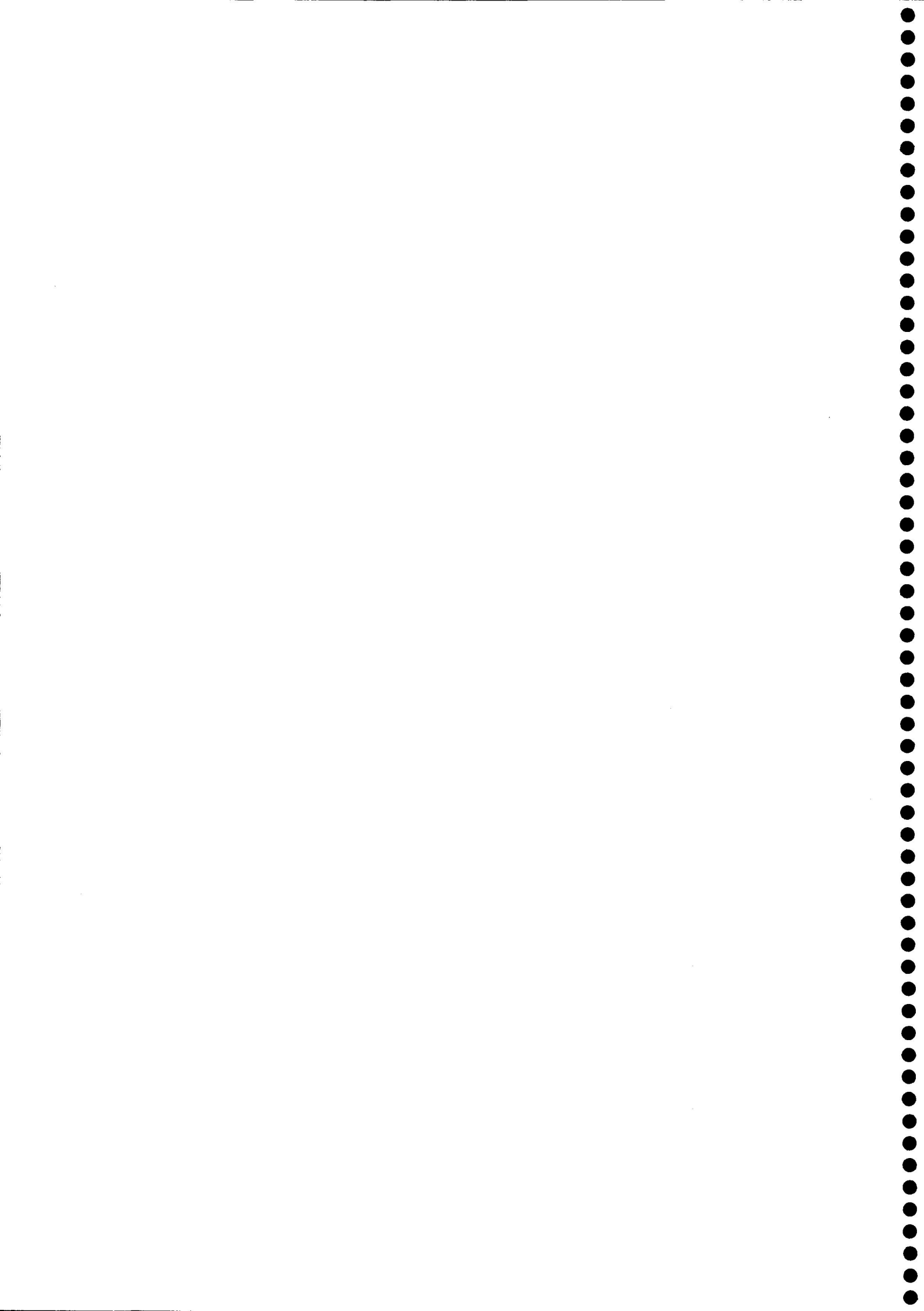
Para el diseño y análisis de oligonucleótidos (para secuenciación y PCR) se utilizaron los programas informáticos OLIGO v. 4.05 (W. Rychlik, National Biosciences, Inc., 1992) y Amplify v.2.52 $\beta$  (B. Engels, University of Wisconsin, 1996). Para la estimación de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos se usó el programa "Tm determination" (Breslauer *et al.*, 1986) disponible en Internet (tabla 6) que, además de la composición de bases, también tiene en cuenta su secuencia.

La comparación de nuevas secuencias (de nucleótidos y aminoácidos) con las distintas bases de datos, se realizó con la ayuda de los programas BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponible en el servidor de internet del NCBI, y FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988) disponible en el servidor de Internet del EMBL-EBI (tabla 6). El alineamiento de secuencias peptídicas se realizó con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) disponible en el servidor de Internet del PBIL (tabla 6). Con todos estos programas se usaron las opciones estándar. Los alineamientos obtenidos se trataron con el programa MacBoxShade v. 2.01 (M.D. Baron, Mercutio MDEF, 1997) que, además de generar secuencias consenso para los alineamientos, permite colorear o dar sombreado a los aminoácidos en función de su identidad o similitud.

La predicción de la estructura terciaria de proteínas se realizó con la ayuda del programa Swiss-PdbViewer v.3.1 (Guex, 1996; Guesx y Peitsch 1996; 1997) disponible en el servidor de Internet del PDB (tabla 6).

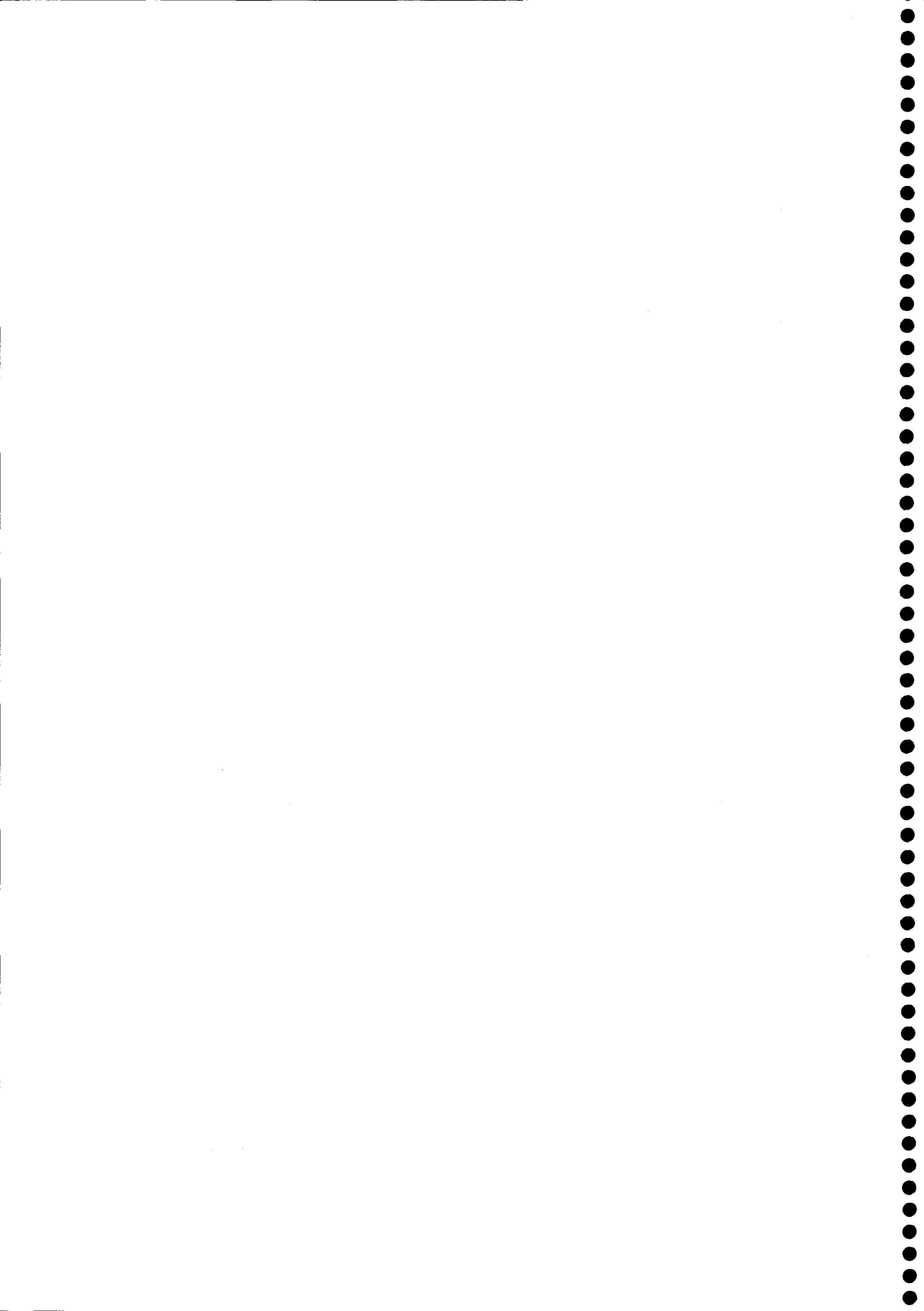
**Tabla 6: Localización de los programas utilizados de internet.**

Programa	Dirección
BLAST	<a href="http://ulrec3.unil.ch/software/WUBLAST_form.html">http://ulrec3.unil.ch/software/WUBLAST_form.html</a>
Clustal W	<a href="http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalW.html">http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalW.html</a>
FASTA3	<a href="http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/">http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/</a>
SPdb-Viewer	<a href="http://expasy.hcuge.ch/spdbv/text/amin.htm">http://expasy.hcuge.ch/spdbv/text/amin.htm</a>
Tm determination	<a href="http://alces.med.umn.edu/rawtm.html">http://alces.med.umn.edu/rawtm.html</a>



## *RESULTADOS*



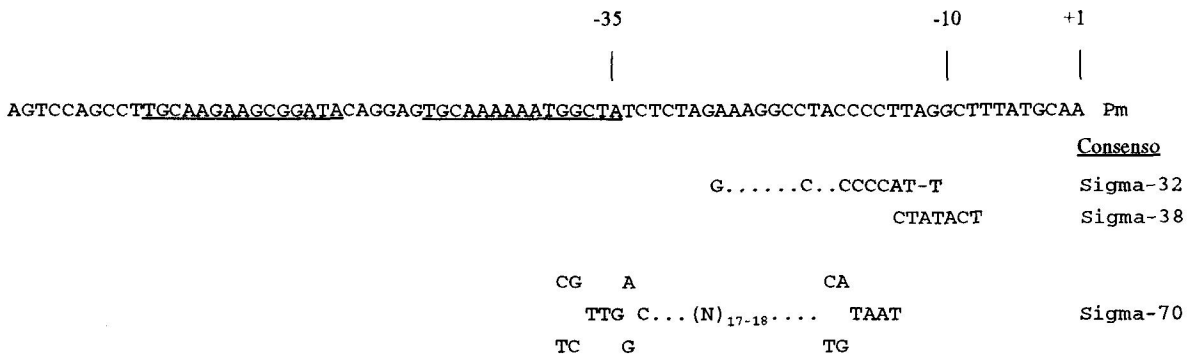


## 1. FACTORES SIGMA IMPLICADOS EN LA EXPRESIÓN DE LA RUTA *meta*.

Como se ha indicado en la *Introducción*, la oxidación de ciertos alquilbenzoatos en *P. putida* (pWW0) se realiza por acción de las enzimas de la ruta de rotura en *meta*, las cuales están codificadas en el llamado operón *meta*. Este operón se transcribe desde el promotor Pm, activado por el regulador XylS en presencia de un efector, generalmente sustrato de la ruta, o bien por hiperproducción del regulador (Inouye *et al.*, 1987a; 1987b; Ramos *et al.*, 1987; Spooner *et al.*, 1987). Para la expresión del promotor Pm se requieren alrededor de 80 pb en 5' con respecto a su punto de iniciación transcripcional. En esta región se localizan los sitios de unión para XylS, recientemente descritos como dos secuencias repetidas TGCA(N)<sub>6</sub>GGNTA localizadas entre -70 y -56 y entre -49 y -35 (González-Pérez *et al.*, 1999; Kessler *et al.*, 1993).

El promotor Pm se consideró inicialmente como un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$ , aunque las regiones -10/-35 no guardaban el consenso típico con un promotor de este tipo (Marqués *et al.*, 1995). Por ejemplo la caja -35 de secuencia CTATCTC no mantiene el consenso con una caja típica (C/T)(G/C)TTG(A/G)C propuesta para promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  en *Pseudomonas* y la caja -10 de secuencia TTAGGC se desvía especialmente del consenso (T/C)(A/G)TTAT de los promotores dependientes de *Pseudomonas* del factor de transcripción principal sigma ( $\sigma^{70}$ ) (Ronald *et al.*, 1992) (figura 7). En los últimos años, se ha podido demostrar que la expresión desde el promotor Pm en fase estacionaria depende directamente del factor  $\sigma^{38}$ , siendo independiente de este factor en fase exponencial (Marqués *et al.*, 1995). Esto llevó a proponer que la expresión de Pm se realizaba gracias a un intercambio de factores de transcripción entre  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{38}$ , siendo este promotor dependiente de  $\sigma^{70}$  durante la fase exponencial temprana, y dependiendo exclusivamente de  $\sigma^{38}$  durante la fase exponencial tardía y la fase estacionaria (Marqués *et al.*, 1995). En ambos casos la expresión era dependiente de la presencia del regulador XylS activado por un efector. Sin embargo, si tenemos en cuenta que el factor  $\sigma^{70}$  está presente a lo largo de toda la curva de crecimiento, resultaba difícil explicar porqué  $\sigma^{70}$  era incapaz de activar la transcripción desde Pm en la fase exponencial tardía y en la fase estacionaria. Con

objeto de analizar esta aparente contradicción, decidimos analizar en profundidad la expresión desde Pm en las primeras fases de crecimiento.



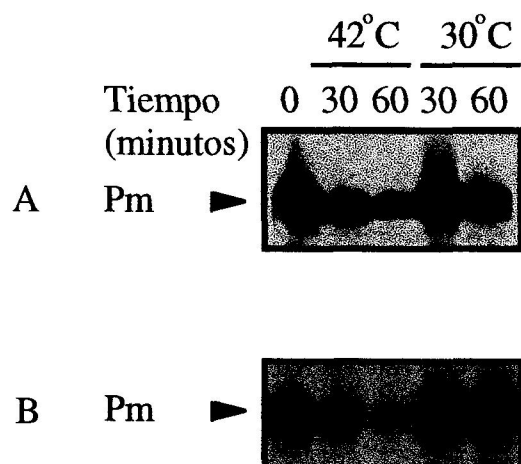
**Figura 7: Alineamiento de la secuencia de Pm con las secuencias consenso propuesto para distintos factores sigma:**

Se indica la secuencia nucleotídica del promotor Pm. El sitio indicado con +1 es el origen transcripcional determinado por ensayo de transcripción reversa (Inouye *et al.*, 1981; Marqués *et al.*, 1993). Las bases -10 y -35 está indicadas sobre el promotor Pm. Los sitios propuestos para la unión de XylS está subrayados (González-Pérez *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 1993). También se indican los alineamientos con la secuencia consenso -10/-35 para la unión de la ARN polimerasa con  $\sigma^{70}$  para las *Pseudomonas* (Ronald *et al.*, 1992), así como la región -10 propuesta para la unión de  $\sigma^{38}$  (Loewen y Henнге-Aronis, 1994) y para la unión de  $\sigma^{32}$  (Gross, 1996) en *E. coli*.

### 1.1 La transcripción desde Pm en fase exponencial es independiente de la ARN polimerasa $\sigma^{70}$ .

En primer lugar, para confirmar si  $\sigma^{70}$  era el factor requerido para la transcripción desde Pm durante la fase exponencial, analizamos la expresión del promotor en presencia y ausencia de este factor sigma. El factor  $\sigma^{70}$  está implicado de forma directa o indirecta en la transcripción de la mayoría de los genes bacterianos y por lo tanto un mutante nulo en este gen es inviable. Para estudiar la expresión desde Pm en este fondo genético, se utilizó la cepa de *E. coli* UQ285, la cual presenta una delección interna en el gen *rpoD* de forma que el factor  $\sigma^{70}$  que codifica es inestable a 42°C, eliminándose la síntesis de los ARNm de los promotores  $\sigma^{70}$ -dependientes entre 10 y 20 minutos después de la subida de temperatura (Harris *et al.*, 1978; Nakamura *et al.*, 1983). La cepa *E. coli* UQ285 y su isogénica P90A5c silvestre para *rpoD* se transformaron con el plásmido pNM185, derivado de pKT231, el

cual porta el gen *xyIS* y el fragmento *PstI* de 0,4-kb del plásmido pWW0 en el que se encuentra Pm (Mermod *et al.*, 1986). Las cepas UQ285 (pNM185) y P90A5c (pNM185) se cultivaron durante una noche a 30°C en medio rico suplementado con los antibióticos necesarios, tras lo cual se diluyeron los cultivos en el mismo medio a una D.O.<sub>660 nm</sub> de 0,05 y se dividieron en dos fracciones, una de las cuales se indujo con 1 mM de 3-metilbenzoato, mientras que la otra fracción permaneció como control sin inducir. Tras 1,5 horas de crecimiento en agitación a 30°C, los cultivos se dividieron en dos fracciones, una de las cuales quedó a 30°C, mientras que la otra se incubó a la temperatura restrictiva de 42°C. A los 30 y 60 minutos se tomaron muestras de 20 ml de cada cultivo para análisis de ARN. Cantidades iguales de ARN total de las distintas muestras se extendieron a partir del cebador marcado OSXyIX, complementario al gen *xyIX* (tabla 5).



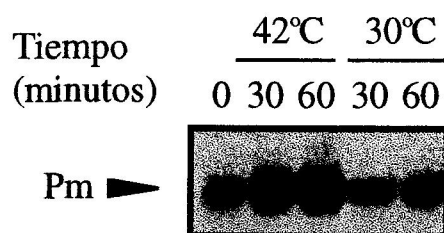
**Figura 8: Ensayo de extensión de cebadores del transcrito obtenido desde Pm en las cepas UQ285 (pNM185) y P90A5c (pNM185) en cultivos inducidos.**

Cultivos en LB de *E. coli* UQ285 (A) o *E. coli* P90A5c (B) portando el plásmido pNM185 se diluyeron hasta 0,05 de D.O.<sub>660 nm</sub> y se indujeron con 1 mM de 3-metilbenzoato. Tras 1,5 horas se dividieron en dos fracciones alícuotas que se incubaron a 30° y 42°C. Tras 0, 30 y 60 minutos se recogieron fracciones alícuotas a las que se les extrajo el ARN total y se determinó el nivel de transcripción generado desde Pm utilizando 20 µg de ARN total y el cebador OSXyIX, complementario al gen *xyIX*, como se describe en *Materiales y métodos*. El resultado de la extensión se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante. El gel resultante se expuso a una película autorradiográfica durante 12 horas.

La figura 8 muestra el resultado obtenido para las muestras inducidas con 3-metilbenzoato. Se observa que en los cultivos inducidos de UQ285, la expresión desde Pm

sigue siendo alta tras 60 minutos a 42°C, presentando niveles semejantes a los obtenidos en la cepa control P90A5c, de donde se dedujo que el factor sigma involucrado en la inducción de Pm en fase exponencial no era  $\sigma^{70}$ . La suave caída en la transcripción desde Pm que se observó en ambos cultivos a los 60 minutos del aumento de temperatura se puede explicar por la inestabilidad de la proteína XylS a temperaturas superiores a 37°C (Ramos *et al.*, 1988) (figura 8).

La figura 9 muestra el resultado obtenido en el cultivo de UQ285 (pNM185) no inducido con 3-metilbenzoato. Hay que resaltar que en estas condiciones la expresión de Pm se detectó con tiempos de exposición mucho más largos que para los inducidos (de 30 días en lugar de 12 horas). Se observó que a 42°C, la expresión basal desde Pm (es decir, independiente de XylS activado por un efector), fue tres veces mayor que la expresión a 30°C. Esto sugería una posible inducción de Pm como consecuencia del aumento de temperatura.



**Figura 9: Ensayo de extensión de cebadores del transcrito obtenido desde Pm en la cepa UQ285 (pNM185) en cultivos no inducidos.**

Cultivos en LB de *E.coli* UQ285 portando el plásmido pNM185 se diluyeron hasta 0,05 de D.O.<sub>660 nm</sub> y 1,5 horas después se dividieron en dos fracciones alicuotas que se incubaron a 30° y 42°C. A tiempos 0, 30 y 60 minutos tras dividir los cultivos se recogieron fracciones alicuotas a las se les extrajo el ARN total y se determinó el nivel de transcripción generado desde Pm utilizando 20 µg de ARN total y el cebador OSXylX, complementario al gen *xyiX*, como se describe en *Materiales y métodos*. El resultado de la extensión se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante. El gel resultante se expuso a una película autorradiográfica durante 30 días.

## 1.2 Pm requiere de la ARN polimerasa con $\sigma^{32}$ para su transcripción durante la fase exponencial.

En respuesta a un choque térmico, las células responden activando una serie de promotores que se caracterizan por requerir para su transcripción el factor sigma alternativo

