

FACULTAD DE CIENCIAS

Biodegradación de compuestos aromáticos
tóxicos: manipulación genética y regulación de
la ruta de degradación de tolueno codificada
por el plásmido TOL de *Pseudomonas putida*.

María Angeles Abril Martí

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1992



Pror. 8 - 12/15

Facultad de Ciencias

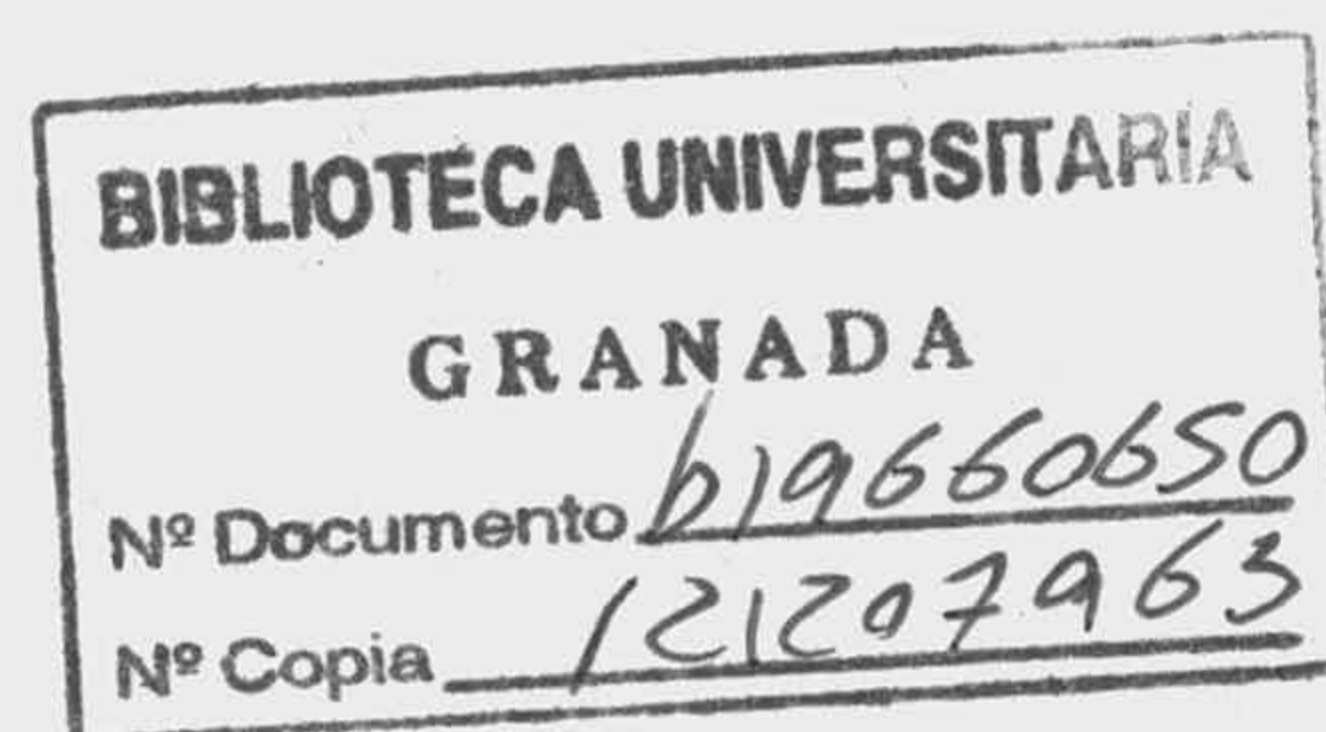
T
14
29

Biodegradación de compuestos aromáticos tóxicos: manipulación genética y regulación de la ruta de degradación de tolueno codificada por el plásmido TOL de *Pseudomonas putida*.

María Angeles Abril Martí

Universidad de Granada

1992



Biodegradación de compuestos aromáticos tóxicos:
manipulación genética y regulación de la ruta de
degradación de tolueno codificada por el plásmido TOL
de *Pseudomonas putida*.

Memoria que presenta la licenciada en Ciencias
Biológicas Dña. María Angeles Abril Martí,
para aspirar al grado de Doctor.



Fdo.: María Angeles Abril Martí

Vº Bº

El director



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

Agradecimientos

Al finalizar esta Tesis Doctoral quiero expresar mi agradecimiento a aquellas personas e instituciones que han contribuido a su realización.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, que me concedió una beca predoctoral, y a la Estación Experimental del Zaidín, que me ha acogido durante estos años.

Al Dr. Juan Luis Ramos Martín, por su dedicación en la dirección de esta Tesis, y a todos mis compañeros del grupo de Biodegradación, en especial a la Dra. Carmina Michán y a Maribel Ramos, por su colaboración y compañerismo.

A los Drs. Enrique Morett y Martin Buck, por su participación en este trabajo y por su dedicación y enseñanza.

A los compañeros de la Estación, en especial a las Unidades de Bioquímica y Microbiología, particularmente a Ángeles Rodríguez y Jesús Mercado, por su apoyo y amistad.

A Manuel Martínez, por la realización esmerada de las gráficas.

A Carmen Lluch y Francisco Ligeró, por su gran ayuda y eficiencia en los trámites burocráticos, que no son pocos.

Y sobre todo, a mi familia y a Ignacio Olivares, que se merecen mucho más que la dedicación de esta Tesis.

Indice

1	Introducción.	1
1.1	Degradación de xenobióticos.	1
1.1.1	Degradación de tolueno por el plásmido TOL pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i>	2
1.1.2	Organización del operón "upper".	4
1.1.3	Regulación de la transcripción de los operones "upper" y <i>meta</i>	8
1.2	Control transcripcional.	15
1.2.1	Factores σ	15
1.2.2	Regulación positiva: función del factor σ^{54} en múltiples procesos fisiológicos.	16
1.3	Objetivos de este trabajo.	29
2	Materiales y Métodos	30
2.1	Estirpes bacterianas.	30
2.2	Medios de cultivo.	30
2.3	Antibióticos.	33
2.4	Conservación de cepas bacterianas.	34
2.5	Plásmidos.	34
2.6	Preparación de células competentes de <i>E.coli</i>	34
2.7	Transformación de células competentes.	39
2.8	Transferencia de plásmidos por conjugación.	39
2.9	Preparación de plásmidos a pequeña escala.	40
2.10	Preparación rápida de plásmidos a gran escala.	42

2.11	Aislamiento de plásmidos a gran escala.	42
2.12	Purificación de plásmidos en gradiente isopícnico de cloruro de cesio.	43
2.13	Determinación de la concentración de ADN.	44
2.14	Restricción de ADN.	44
2.15	Separación e identificación de fragmentos de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa.	45
2.16	Separación e identificación de fragmentos de ADN mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.	46
2.17	Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.	48
2.17.1	Extracción de fragmentos de ADN con membranas de DEAE celulosa.	48
2.17.2	Extracción de fragmentos de ADN con "GeneClean".	49
2.18	Ligación de ADN.	49
2.19	Deleciones con <i>Bal31</i>	50
2.20	Mutagénesis con sulfonato de etilmetano.	51
2.21	Mutagénesis dirigida con oligonucleótidos.	52
2.21.1	Preparación de cadenas sencillas uridiladas.	52
2.21.2	Preparación de oligonucleótidos.	53
2.21.3	Hibridación y extensión.	53
2.22	Secuenciación de ADN en plásmidos.	56
2.22.1	Preparación de cadenas sencillas.	56
2.22.2	Hibridación y extensión.	57
2.22.3	Separación de cadenas extendidas por electroforesis.	58
2.23	Ensayo de improntas <i>in vivo</i>	59
2.23.1	Metilación de ADN.	59
2.23.2	Marcaje de oligonucleótidos con γ - ³² P-ATP.	63
2.23.3	Hibridación y extensión.	63
2.24	Ensayo de actividad β -galactosidasa.	64
2.25	Medida de actividad tolueno monooxigenasa <i>in vivo</i>	66
2.25.1	Método polarográfico.	66
2.25.2	Producción de alcoholes bencílicos a partir de toluenos.	67

2.26	Preparación de extractos libres de células.	68
2.27	Determinación de proteínas en extractos libres de células.	68
2.28	Medida de las actividades alcohol bencílico deshidrogenasa y benzaldehído deshidrogenasa codificadas por el plásmido TOL.	69
2.29	Medida de actividad catecol 2,3-dioxigenasa codificada por el plásmido TOL.	70
3	Resultados	71
3.1	Expansión de la ruta "upper" codificada por el plásmido TOL de <i>Pseudomonas putida</i> para la degradación de derivados recalcitrantes de tolueno	71
3.1.1	Análisis del espectro de efectores de XylR.	72
3.1.2	Análisis de la transcripción de <i>xyIR</i> utilizando fusiones transcripcionales de Pr al gen <i>lacZ</i> : autorregulación de la síntesis de XylR.	81
3.1.3	Análisis del perfil de sustratos de los enzimas de la ruta "upper".	83
3.1.4	Manipulación de la ruta "upper" del plásmido TOL pWW0 para conseguir la degradación de derivados recalcitrantes de tolueno.	89
3.2	Regulación de la transcripción de la ruta "upper": análisis molecular de la estructura y función del promotor Pu.	99
3.2.1	Análisis de la estructura del promotor Pu mediante deleciones de su extremo 5'.	99
3.2.2	Localización de secuencias activadoras remotas mediante ensayos de improntas <i>in vivo</i>	107
3.2.3	Análisis de las secuencias delimitadas mediante ensayos de improntas <i>in vivo</i>	111
3.2.4	Análisis de la interacción de XylR con las secuencias activadoras remotas.	112
3.2.5	Localización de la secuencia de unión del factor de integración del hospedador (IHF).	118

3.2.6	Análisis de la función de IHF en la transcripción de Pu. . . .	122
4	Discusión.	126
4.1	Expansión del perfil de sustratos de la ruta "upper" codificada por el plásmido TOL pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i>	126
4.2	Caracterización del promotor Pu: estructura y factores que intervienen en la regulación de su transcripción.	139
4.3	Perpectivas de la manipulación genética de la ruta "upper" del plásmido TOL pWW0.	154
5	Conclusiones.	155
	Bibliografía	157

Lista de Tablas

1	Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	31
2	Plásmidos utilizados en este trabajo	35
3	Activación de XylR por compuestos con un anillo aromático	77
4	Activación de XylR por alcoholes bencílicos y benzaldehidos	79
5	Autorregulación de XylR dependiente de sus efectores.	85
6	Especificidad de los enzimas de la ruta "upper"	87
7	Perfil de sustratos de la TO codificada por el plásmido TOL pWW0- EB62	96
8	Expresión de promotores mutantes de Pu en la región de las secuen- cias activadoras remotas	116
9	Expresión de Pu y sus mutantes en la región de -64 en cepas de <i>E.coli</i> productoras y defectivas en IHF	119
10	Expresión de promotores mutantes de Pu en la región situada entre el sitio IHF y la secuencia UAS2	125
11	Producción industrial de hidrocarburos aromáticos	127

Lista de Figuras

1	Esquema del plásmido TOL pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i>	3
2	Organización de los genes estructurales y reguladores de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0.	5
3	Oxidación de tolueno/xilenos a través de la ruta "upper" codificada por el plásmido TOL pWW0 y organización de los genes estructurales del operón "upper".	6
4	Oxidación de benzoato/tolatos a través de la ruta <i>meta</i> codificada por el plásmido TOL pWW0 y organización de los genes estructurales del operón <i>meta</i>	7
5	Representación de los circuitos de regulación genética de las rutas de degradación de tolueno y xilenos codificadas por el plásmido TOL pWW0.	10
6	Alineamiento de las secuencias inversamente repetidas de Pu y Ps. .	13
7	Esquema de los dominios de homología conservados en los factores σ^{54} . .	20
8	Representación del modelo de interacción de σ^{54} con el consensus -12/-24.	22
9	Representación del modelo de activación remota de los promotores -12/-24.	25
10	Representación del vector de clonaje pTZ19.	36
11	Representación del plásmido pMC1403	37
12	Esquema de la construcción del plásmido pERD450	38
13	Electroforesis de la extensión de los oligonucleótidos 10, 11 y 12 . . .	55
14	Representación del plásmido pRD579	60

15	Representación del plásmido pTS174	61
16	Inducción coordinada de actividad BADH (ruta "upper") y C 2,3-O (ruta <i>meta</i>) por <i>m</i> -xileno	73
17	Inducción de los promotores Pu y Pm en fusiones transcripcionales al gen <i>lacZ</i>	75
18	Expresión basal de Pu a lo largo de las fases de crecimiento	82
19	Esquema de la construcción del plásmido pERD99	84
20	Representación doble recíproca (v_o^{-1} frente a $[S]^{-1}$) de Lineweaver- Burk para el cálculo de la $K'm$ de la BADH para el alcohol <i>p</i> - etilbencílico	90
21	Cinética de la actividad BZDH codificada por el plásmido TOL a distintas concentraciones de benzaldehído	91
22	Esquema de la construcción de una cepa de <i>P.putida</i> capaz de degradar <i>p</i> -etiltolueno	93
23	Esquema de la construcción de una ruta para la degradación de <i>m</i> - clorotolueno en cepas derivadas de <i>Pseudomonas</i> B13	98
24	Secuencia del promotor Pu y homología de la secuencia consensus en -12/-24 con Ps	100
25	Electroforesis de las deleciones del extremo 5' de Pu con exonucleasa <i>Bal31</i>	102
26	Electroforesis de la restricción con <i>BstEII</i> de las fusiones transcrip- cionales de deleciones de Pu generadas con <i>Bal31</i> y clonadas en pMC1403	103
27	Expresión de promotores con deleciones de Pu en fusiones transcrip- cionales al gen <i>lacZ</i> de pMC1403	106
28	Autorradiografía de la cadena superior de Pu cortada con piperidina en las Gs metiladas <i>in vivo</i>	108
29	Autorradiografía de la cadena inferior de Pu cortada con piperidina en las Gs metiladas <i>in vivo</i>	109
30	Densitometría de las autorradiografías de los ensayos de improntas <i>in vivo</i> de Pu	110

31	Estructura del promotor de la ruta "upper" codificada por el plásmido TOL pWW0 de <i>P.putida</i>	113
32	Alineamiento de la secuencia consensus de IHF con las secuencias de Pu y Ps	114
33	Construcción de una delección interna de Pu entre -64 y -111	121
34	Resumen de las sustituciones permisivas en el anillo aromático de los efectores de XylR	132
35	Distribución tridimensional de los dobleces en la secuencia de los promotores Pu y mutantes de Pu con inserciones de 32pb	147
36	Organización estructural de los promotores Ps/Pr	150
37	Representación del modelo de interacción de Pu con XylR e IHF	152

Capítulo 1

Introducción.

1.1 Degradación de xenobióticos.

Muchos compuestos aromáticos con uno o más anillos bencénicos son degradados por microorganismos del suelo y del agua (Gibson, 1984); sin embargo, la intensidad de la actividad industrial no sólo produce enormes cantidades de ellos, sino que además cada vez se producen nuevos compuestos orgánicos de síntesis con sustituyentes o estructuras que no aparecen en los compuestos naturales. Estos compuestos se denominan xenobióticos, y en general, son resistentes a cualquier tipo de ataque por microorganismos, por lo que se acumulan en el medio ambiente, constituyendo una fuente importante de contaminación. Dado que desde el punto de vista evolutivo el periodo de tiempo transcurrido desde la aparición de estos xenobióticos es demasiado corto, las rutas catabólicas de los microorganismos no han podido evolucionar para permitir la utilización de los nuevos compuestos como fuente de materia y energía. Sin embargo, la ingeniería genética ofrece una serie de herramientas que permiten acelerar en el laboratorio la evolución de rutas catabólicas mediante la manipulación de genes, y así permitir la eliminación de xenobióticos. Por ello, el estudio de la bioquímica de las rutas de degradación, así como el estudio de la organización física de la información genética que la codifica y la regulación de su expresión, son imprescindibles para diseñar las estrategias que permitan acelerar la evolución de las rutas catabólicas en el laboratorio y permitir el metabolismo de

compuestos recalcitrantes (Ramos y Timmis, 1987).

Las bacterias de la familia de las pseudomonadáceas presentan un alto interés por su ubicuidad, versatilidad fisiológica y capacidad de utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono (Lessie y Graffney, 1986; Palleroni, 1986). La información genética que codifica estas rutas catabólicas se encuentra en muchas ocasiones codificada por plásmidos, lo cual constituye una ventaja no sólo para su estudio y manipulación, sino también para la propagación de la información entre poblaciones bacterianas.

1.1.1 Degradación de tolueno por el plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*.

Pseudomonas putida mt-2 (pWW0) es una bacteria del suelo capaz de crecer a expensas de tolueno, *m*- y *p*-xileno, *m*-etiltolueno y 1,2,4-trimetilbenceno. Worsey y Williams (1975) demostraron que los enzimas de la ruta de degradación de estos hidrocarburos están codificados por el plásmido TOL pWW0 (Fig. 1). Este plásmido de aproximadamente 115kb es autotransferible y pertenece al grupo de incompatibilidad IncP9, siendo su número de copias por cromosoma entre 2 y 4 (Benson y Shapiro, 1978; Bradley y Williams, 1982; Nakazawa y Yokota, 1973; Williams y Murray, 1974; Worsey y Williams, 1975).

Mediante mutagénesis con nitrosoguanidina y transposones y clonación de genes se demostró que la información genética necesaria para la síntesis regulada de la ruta de degradación de tolueno está distribuida en cuatro unidades transcripcionales (Fig. 2) (Franklin *et al.*, 1981; Harayama *et al.*, 1984, 1989, 1990; Inouye *et al.*, 1983), agrupadas en una región de 23kb de pWW0 que forma parte del transposón de 56kb Tn4651, contenido a su vez en el transposón de 70kb Tn4653 (Tsuda *et al.*, 1989). Los genes estructurales que codifican los enzimas para la degradación de toluenos están agrupados en dos operones, separados por 14kb, y que se transcriben en el mismo sentido. El operón "upper" codifica los enzimas para la oxidación de toluenos a benzoatos (Figs. 2 y 3), mientras que el operón *meta* codifica la ruta de degradación de benzoatos hasta intermediarios del ciclo de Krebs (Figs. 2 y 4). Las

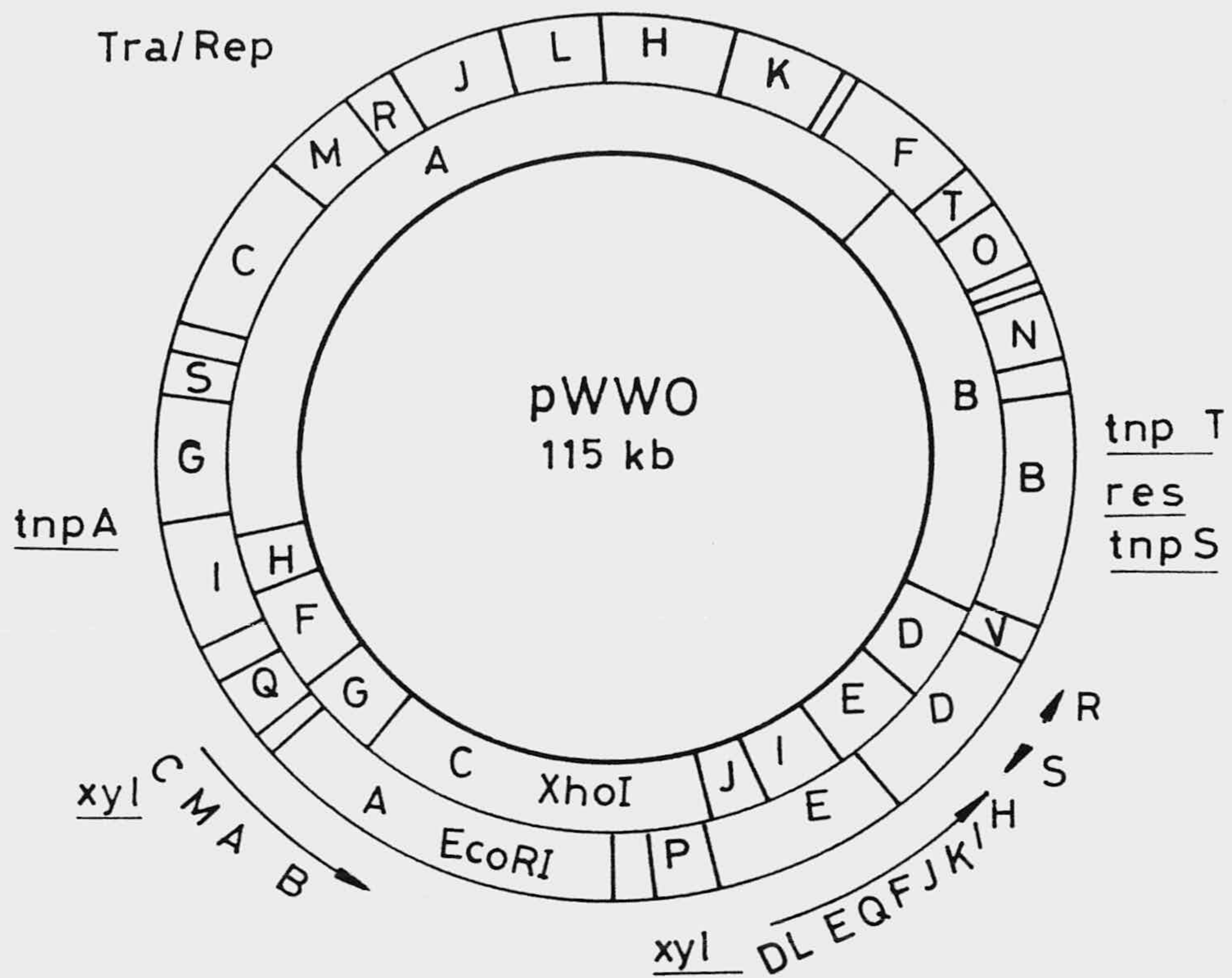


Figura 1: Esquema del plásmido TOL pWWO de *Pseudomonas putida*. Se representan los mapas de restricción del plásmido con las restrictasas *EcoRI* y *XhoI*; los fragmentos se nombran por orden alfabético de acuerdo con su tamaño en orden decreciente. Se indica la localización de los genes que codifican las transposasas y resolvasas de los transposones Tn4651 y Tn 4653 (*tnpA*, *tnpT*, *tnpS* y *res*) y la región de transferencia (Tra) y replicación (Rep). Asimismo se señala la región que contiene a los operones "upper", *meta*, y los genes reguladores *xylR* y *xylS*, indicando las flechas el sentido de la transcripción de estas unidades transcripcionales.

dos unidades transcripcionales *xylR* y *xylS* codifican las proteínas reguladoras que controlan la transcripción de los operones "upper" y *meta* respectivamente (Franklin *et al.*, 1980; Inouye *et al.*, 1981). Los dos genes reguladores son adyacentes al operón *meta* (Franklin *et al.*, 1983; Inouye *et al.*, 1983), y sus promotores, Ps y Pr, se transcriben divergentemente (Fig. 2) (Inouye *et al.*, 1986; Mermoud *et al.*, 1986; Ramos *et al.*, 1987a; Spooner *et al.*, 1986).

El operón *meta* contiene trece genes estructurales que codifican los enzimas para la degradación de benzoatos (Fig. 4). Mediante oxidación y descarboxilación de los benzoatos se obtienen catecoles como intermediarios, cuya fisión *meta* produce semialdehidos del ácido mucónico. Estos últimos pueden seguir dos vías alternativas, de hidrólisis o descarboxilación, que convergen en el 2-oxo-pent-4-enolato, y finalmente, se obtienen intermediarios anfibólicos del ciclo de Krebs (Harayama y Reik, 1990).

1.1.2 Organización del operón "upper".

La degradación de tolueno y xilenos a través de las rutas codificadas por el plásmido TOL pWW0 comienza por la oxidación progresiva del grupo metilo del anillo aromático hasta benzoato y toluatos (Fig. 3).

Al menos tres enzimas forman parte de la ruta "upper": la tolueno monooxigenasa (TO), que oxida el hidrocarburo aromático a su alcohol bencílico correspondiente; la alcohol bencílico deshidrogenasa (BADH), que oxida el alcohol aromático a su aldehído correspondiente; y por último, la benzaldehído deshidrogenasa (BZDH), que oxida el benzaldehído a su correspondiente ácido carboxílico. El operón que codifica la ruta catabólica comprende 8kb del plásmido TOL pWW0 (Fig. 1) (Harayama *et al.*, 1986; Kell *et al.*, 1987; Lebens y Williams, 1985). Mediante mutagénesis con transposones y clonación de fragmentos del operón en vectores de expresión y análisis en maxicélulas de los productos de la transcripción de los fragmentos clonados, se han asociado actividades enzimáticas y polipéptidos a los genes de TOL (Harayama *et al.*, 1989). El primer gen de la ruta, *xylC*, codifica un polipéptido de 57kD identificado como BZDH (Fig. 2). Los genes adyacentes a éste,

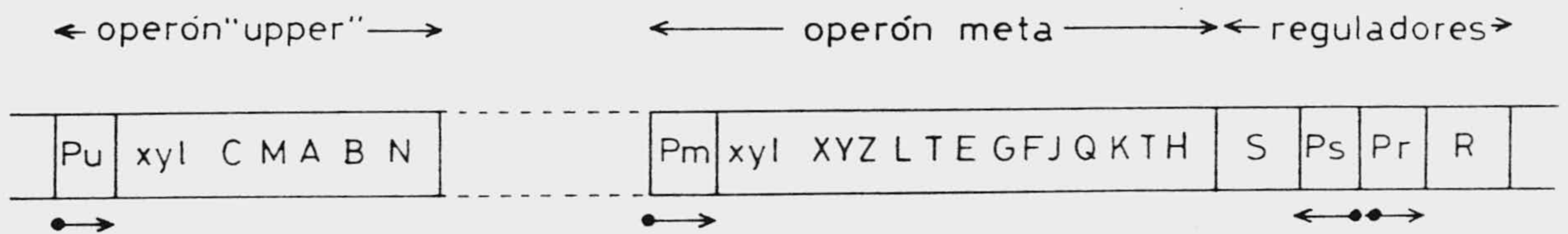


Figura 2: Organización de los genes estructurales y reguladores de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0. Los genes que codifican los enzimas para la oxidación de tolueno y xilenos a benzoato y toluatos están agrupados en el operón "upper", y los que codifican los enzimas para la oxidación de benzoato y toluatos a intermediarios del ciclo de Krebs, en el operón *meta*. Los genes reguladores *xyIR* y *xyIS* son unidades transcripcionales independientes. Los dos operones están separados por una distancia de 14kb (línea discontinua). Las flechas indican el sentido de la transcripción desde los promotores Pu, Pm, Ps y Pr. El orden de los genes es de acuerdo con Harayama *et al.* (1984, 1989) y Harayama y Reik (1990).

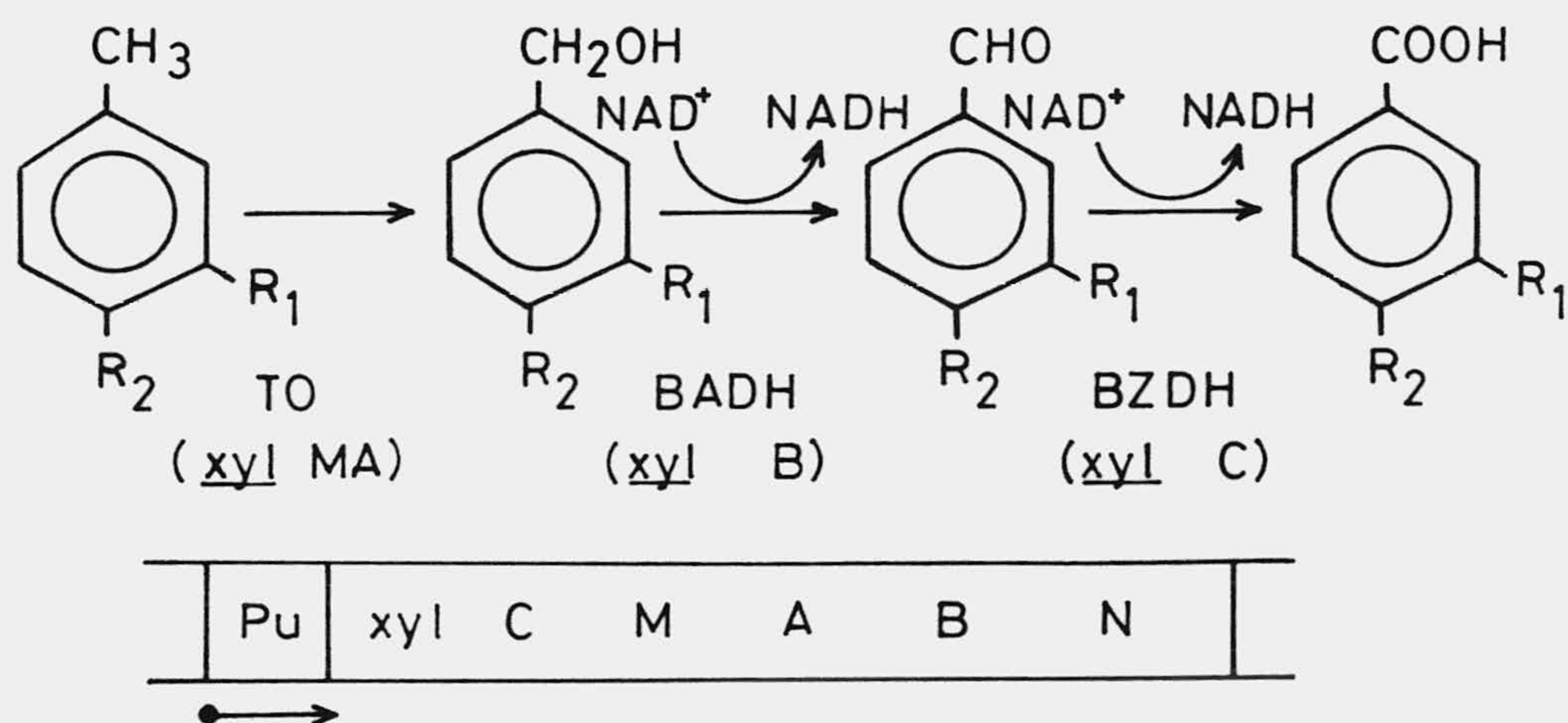


Figura 3: Oxidación de tolueno/xilenos a través de la ruta "upper" codificada por el plásmido TOL pWW0 y organización de los genes estructurales del operón "upper". Las abreviaturas utilizadas para los enzimas son: TO, tolueno monooxigenasa; BADH, alcohol bencílico deshidrogenasa; BZDH, benzaldehído deshidrogenasa. Junto a cada enzima se indican los genes del operón que lo codifican. Al gen *xylN* no se le ha asignado ninguna función catalítica.

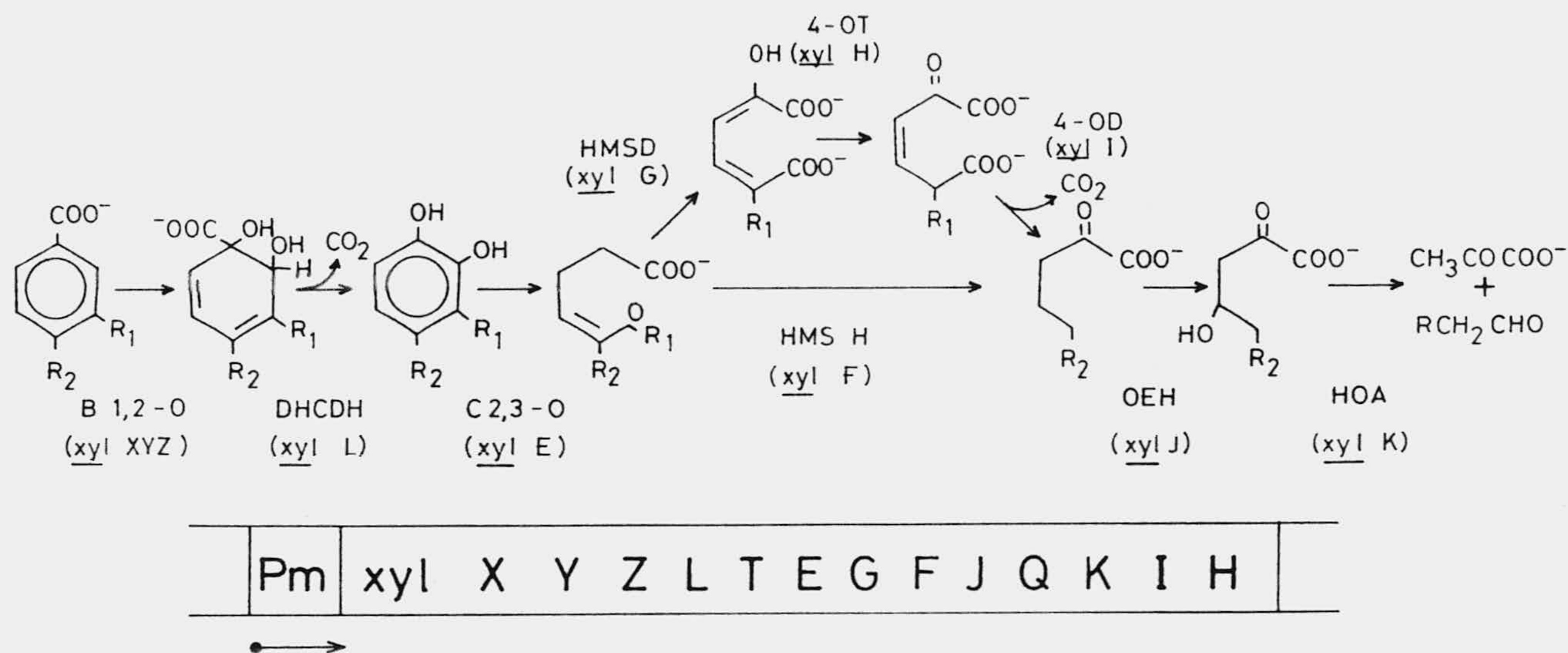


Figura 4: Oxidación de benzoato/toluoatos a través de la ruta *meta* codificada por el plásmido TOL pWW0 y organización de los genes estructurales del operón *meta*. Las abreviaturas utilizadas para los enzimas son: B 1,2-O, benzoato 1,2-dioxigenasa; DHCDH, 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadieno-1-carboxilato deshidrogenasa; C 2,3-O, catecol 2,3-dioxigenasa; HMSD, 2-hidroxi-mucónico semialdehído deshidrogenasa; 4-OT, 4-oxalocrotonato tautómera; 4-OD, 4-oxalocrotonato descarboxilasa; HMSH, 2-hidroxi-mucónico semialdehído hidrolasa; OEH, 2-oxopent-4-enolato hidratasa; HOA, 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa. Junto a cada enzima se indican los genes que lo codifican.

xylM y *xylA*, codifican dos polipéptidos de 35 y 40kD que forman un heterodímero asociado a la actividad TO, como demuestran los experimentos de complementación entre *xylM* y *xylA* (Harayama *et al.*, 1989). La BADH es un polipéptido de 40kD codificado por *xylB*, adyacente a *xylA* (Fig. 2) (Harayama *et al.*, 1989; Shaw y Harayama, 1990). Sin embargo, el ADN correspondiente a estos cuatro genes sólo constituye el 50% del material genético de la región, y dentro del operón existen dos segmentos de ADN cuya función está por definir. Entre el promotor del operón, Pu, y el primer gen estructural, *xylC*, existe una región de 1,7kb a la que no se ha podido asignar ningún polipéptido en los experimentos con maxicélulas (Harayama *et al.*, 1989). Sin embargo, la región contiene una fase de lectura abierta que podría codificar un polipéptido altamente hidrofóbico (P. Williams, comunicación personal). En 3' con respecto a *xylB* se ha localizado una fase de lectura abierta, *xylN*, que en maxicélulas codifica un polipéptido de 47kD al que no se ha asignado función catalítica.

1.1.3 Regulación de la transcripción de los operones "upper" y *meta*.

La función de los genes *xylR* y *xylS* en la regulación de la síntesis de los enzimas catabólicos de TOL se definió en primer lugar mediante mutagénesis con el transposón Tn5 (Franklin *et al.*, 1983). En la cepa silvestre y en mutantes de *xylR* y de *xylS* se determinaron las actividades alcohol bencílico deshidrogenasa (BADH), un enzima de la ruta "upper", y catecol 2,3-dioxigenasa (C 2,3-O), un enzima de la ruta *meta*. En la cepa silvestre se inducían los enzimas de la ruta "upper" en respuesta a sustratos de la misma, mientras que los enzimas de la ruta *meta* se inducían tanto en presencia de sustratos de la ruta "upper" como en presencia de sustratos de la ruta *meta*. Se observó que en mutantes de *xylS*, pero no en mutantes de *xylR*, se inducía la actividad BADH en presencia de tolueno y xilenos. Por el contrario, en presencia de benzoatos, se inducía la actividad C 2,3-O en mutantes de *xylR*, pero no en mutantes de *xylS*. La síntesis de C 2,3-O en presencia de tolueno y xilenos

estaba bloqueada tanto en mutantes de *xylR* como en mutantes de *xylS*. Estos resultados sugerían que XylR estaba implicado en la activación del operón "upper" en presencia de hidrocarburos, y que XylS estaba implicado en la activación del operón *meta* en presencia de benzoatos; asimismo, XylR y XylS participaban de manera concertada en la activación de la ruta *meta* por hidrocarburos (Franklin *et al.*, 1983; Inouye *et al.*, 1983).

La función de ambos genes como elementos reguladores en *trans* se determinó utilizando fusiones transcripcionales del promotor del operón "upper", Pu, y del promotor del operón *meta*, Pm, al gen *xylE* o al gen *lacZ*, y analizando los niveles de actividad C 2,3-O -el producto del gen *xylE*- y β -galactosidasa, respectivamente, en presencia de los genes *xylR* o *xylS* clonados en plásmidos compatibles (Abril *et al.*, 1989; Dixon, 1986; Inouye *et al.*, 1981; 1983; Mermod *et al.*, 1986; Ramos *et al.*, 1986, 1987a, 1990). Los polipéptidos sintetizados por los genes *xylR* y *xylS* se identificaron como dos proteínas, XylR y XylS, de 68 y 36,5kD respectivamente, mediante el análisis de los productos de la transcripción de ambos genes clonados en vectores de expresión en maxicélulas y en minicélulas (Inouye *et al.*, 1986; Mermod *et al.*, 1987; Spooner *et al.*, 1986).

El mecanismo de activación de XylS sobre Pm se analizó determinando los niveles de ARN mensajero del gen *xylS* en células de *P.putida* (pWW0) cultivadas en glucosa y en benzoato (Ramos *et al.*, 1987a). Los niveles de expresión del operón *meta*, estimados como actividad C 2,3-O, fueron bajos en los cultivos en glucosa, y altos en benzoato; sin embargo, los niveles de ARN mensajero de *xylS* eran bajos (0,05% del total) y similares en ambos casos, lo cual sugería que la estimulación de la transcripción desde Pm es dependiente de benzoato e implica la activación de XylS por dicho ácido carboxílico (Fig. 5).

Para estudiar la interacción de XylS con sus efectores Ramos *et al.* (1986) realizaron ensayos de activación de la transcripción desde Pm en *E.coli*, utilizando fusiones transcripcionales de este promotor al gen *lacZ* desprovisto de su promotor natural, y en *P.putida*, midiendo actividad C 2,3-O expresada desde el plásmido TOL, en presencia de al menos 50 análogos del ácido benzoico. El análisis del perfil de efectores de XylS permitió deducir que la posición 3 del anillo aromático del

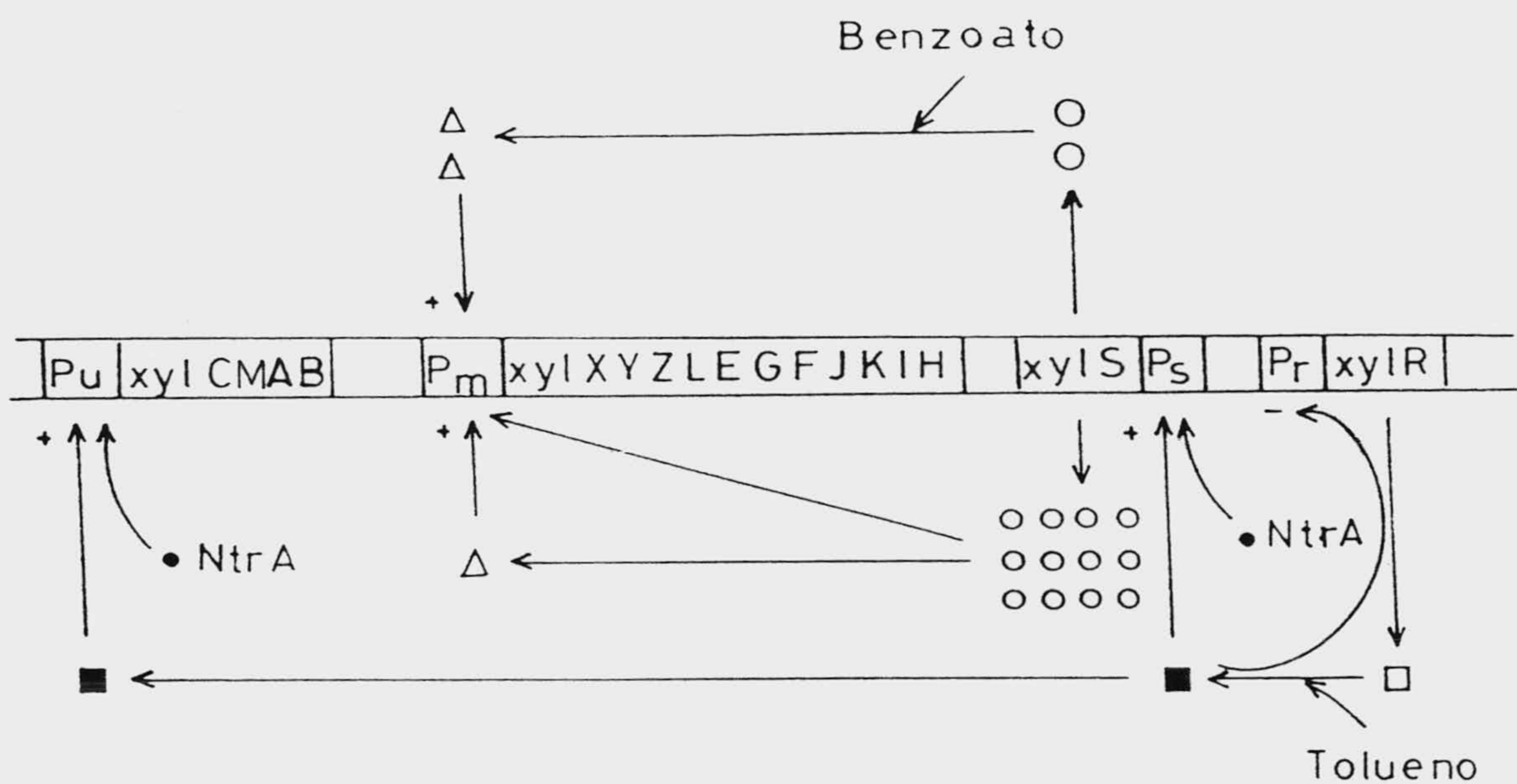


Figura 5: Representación de los circuitos de regulación genética de las rutas de degradación de tolueno y xilenos codificadas por el plásmido TOL pWW0. La activación (+) o represión (-) de cada factor sobre los promotores correspondientes se indica mediante flechas. Los círculos vacíos representan la forma inactiva de XylS y los triángulos la forma activa; los cuadrados vacíos representan la forma inactiva de XylR y los rellenos la forma activa. Los círculos rellenos representan el factor σ^{54} o NtrA.

benzoato era la más permisiva, ya que admitía sustituciones por grupos $-\text{CH}_3$ y $-\text{C}_2\text{H}_5$, y átomos de F, Cl, Br, y I, mientras que en las posiciones 2 y 4 sólo eran permisivas sustituciones por grupos $-\text{CH}_3$ y átomos de F y Cl. Las posiciones 5 y 6 del anillo no admitían sustituciones. Esta información se utilizó para diseñar una estrategia para aislar reguladores mutantes capaces de reconocer benzoatos que no activaban al regulador silvestre (Ramos *et al.*, 1986, 1990). La secuenciación y análisis de estos mutantes permitió deducir algunas características del sitio de unión de XylS al efector, y el estudio exhaustivo mediante mutagénesis a lo largo de la secuencia de XylS (Michán, 1991; Ramos *et al.*, 1990) permitió definir tres regiones no contiguas en la secuencia del regulador que componen el sitio de unión al efector, situadas entre los aminoácidos 37 y 45, alrededor de la posición 155, y entre los residuos 229 y 288.

La inducción de las rutas "upper" y *meta* por XylR en presencia de tolueno y alcohol *m*-metilbencílico se demostró mediante la construcción de diploides parciales para los genes de TOL (Franklin y Williams, 1980; Nakazawa *et al.*, 1980). Los análisis de expresión del promotor de la ruta "upper", Pu, en fusiones transcripcionales al gen *xylE* demostraron que XylR activado por *m*-xileno o alcohol *m*-metilbencílico es un activador transcripcional del promotor Pu (Inouye *et al.*, 1983), pero no es capaz de estimular la transcripción desde Pm (Franklin *et al.*, 1981, 1983; Inouye *et al.*, 1983; Ramos *et al.*, 1987a). Experimentos análogos con el promotor del gen *xylS*, Ps, demostraron que XylR en presencia de sus efectores también es un activador a nivel transcripcional de Ps (Inouye *et al.*, 1987a; Ramos *et al.*, 1987a). Los análisis cuantitativos de ARN mensajero de *xylS* en células portadoras de *xylR* en *trans* en presencia y ausencia de *m*-xileno o alcohol *m*-metilbencílico demostraron que XylR incrementa al menos 50 veces la síntesis de XylS (Ramos *et al.*, 1987a).

En condiciones de hiperproducción de XylS distintos investigadores (Inouye *et al.*, 1987b; Mermoud *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1987a) han demostrado que este regulador en ausencia de efectores es capaz de estimular la transcripción desde Pm. En conjunto, estos resultados apoyan un modelo de activación en cascada de Pm en presencia de tolueno. Este modelo explica la inducción coordinada de enzimas de la ruta "upper" y *meta* en células de *Pseudomonas* cultivadas en tolueno (Abril

et al., 1989; Ramos *et al.*, 1987a).

La estructura de los promotores de TOL, Pr, Pu, Ps y Pm, ha sido analizada con cierto detalle mediante secuenciación y mapeo con nucleasa S1 y transcriptasa inversa. El promotor Pr (Inouye *et al.*, 1985) tiene dos sitios de iniciación de la transcripción separados entre sí por 27pb, y cada sitio está precedido por una secuencia de reconocimiento del factor σ^{70} (consensus en -10/-35). El análisis cuantitativo de la síntesis de ARN mensajero desde Pr en células de *E.coli* portadoras o no del gen *xyIR* indica que XylR reprime su propia síntesis (Abril *et al.*, 1989; Holtel *et al.*, 1992; Inouye *et al.*, 1987a).

Los promotores Pu (Inouye *et al.*, 1984) y Ps (Inouye *et al.*, 1987a; Ramos *et al.*, 1987a) presentan la secuencia consensus en -12/-24 para reconocimiento del factor NtrA o σ^{54} . Dixon (1986) y Ramos *et al.* (1987a) demostraron que en mutantes *ntrA*⁻ de *E.coli* no tenía lugar la activación de Pu y Ps por XylR en presencia de tolueno. Los ensayos de expresión de Pu y Ps en mutantes de *P.putida ntrA*⁻ demuestran que tanto Pu como Ps dependen de σ^{54} para su transcripción (Fig. 5) (Inouye *et al.*, 1987a, 1989; Köhler *et al.*, 1989). Pu y Ps presentan además dos regiones homólogas centradas en -131 y -169 en Pu y en -143 y -181 en Ps que contienen dos repeticiones invertidas de 4pb (5'-ATTTN₄AAAT-3') (Fig. 6) (Holtel *et al.*, 1990). Se ha demostrado la presencia de regiones activadoras distales con doble simetría rotacional en otros promotores -12/-24 (Ames y Nikaido, 1985; Buck *et al.*, 1986; Santero *et al.*, 1989) que constituyen el sitio de unión de las proteínas activadoras (Kustu *et al.*, 1989). Pu y Ps contienen además otra región conservada, alrededor de -50 (Holtel *et al.*, 1990), que presenta homología con el sitio de unión del factor de integración del hospedador (IHF) de otros promotores -12/-24 (Hoover *et al.*, 1990).

El promotor de la ruta *meta*, Pm (Inouye *et al.*, 1984; Mermod *et al.*, 1984), no presenta homología con el consensus -10/-35 de los promotores dependientes de σ^{70} , y aunque tiene cierta homología con la región de -24 de Pu y Ps, funcionalmente es distinto de ellos, ya que es independiente de σ^{54} y no es activado por XylR (Ramos *et al.*, 1987a). El mecanismo de interacción del regulador XylS con Pm no se conoce, pero el análisis del promotor mediante deleciones en su extremo 5' indica

Pu	-179	CGCTGCCTTGATCAAATCGACAG	-157
	-141	TGATGATTTGCTCAAATACAGCC	-119
Ps	-191	CTGCCACTTTAGCATTGCTTAG	-169
	-153	TAACCAATTGATTAAGTAAATC	-131
Consensus		<u>ATTTgatCAAAT</u>	

Figura 6: Alineamiento de las secuencias inversamente repetidas de Pu y Ps. La secuencia de Pu es de Inouye *et al.* (1984), y la de Ps es de Ramos *et al.* (1987a). Las bases están numeradas con respecto al punto principal de iniciación de la transcripción. Se muestra la secuencia consensus derivada del alineamiento con las secuencias invertidas subrayadas (Holtel *et al.*, 1990).

que la región comprendida entre -30 y -70 es necesaria para la expresión completa del promotor mediada por XylS (Ramos *et al.*, 1987a; Spooner *et al.*, 1987).

Los circuitos de regulación de la transcripción de los genes *xyl* (Fig. 5) se pueden resumir de la siguiente manera: la proteína XylR induce la transcripción del operón "upper" en presencia de tolueno y xilenos (Franklin *et al.*, 1980); esta activación es dependiente del factor σ^{54} (Dixon, 1986; Inouye *et al.*, 1987a; Köhler *et al.*, 1989). El operón *meta* se induce por la proteína XylS en presencia de benzoatos (Franklin *et al.*, 1983; Inouye *et al.*, 1981; Ramos *et al.*, 1986). Sin embargo, la transcripción del operón *meta* puede inducirse también por sustratos de la ruta "upper", lo cual implica un sistema de regulación en cascada mediado por las dos proteínas reguladoras: XylR junto con σ^{54} estimula la transcripción del promotor del gen *xylS* en presencia de tolueno (Inouye *et al.*, 1987a; Ramos *et al.*, 1987a), y la consiguiente hiperproducción de XylS es suficiente para activar la transcripción del operón *meta* en ausencia de benzoatos (Ramos *et al.*, 1987a) (Fig. 5). La activación de la transcripción del promotor de la ruta *meta*, P_m, por XylS en ausencia de efectores sugiere la existencia del regulador en dos formas, una activa y capaz de estimular la transcripción desde P_m, y otra inactiva e incapaz de activar la transcripción del promotor. A baja concentración de XylS el equilibrio se desplazaría a la forma activa en presencia de efectores, pero la hiperproducción de XylS inducida por XylR y tolueno -o inducida artificialmente por promotores sintéticos o vectores de alto número de copia (Inouye *et al.*, 1987b; Mermod *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1987a)-conduciría a un aumento de la concentración total de XylS, de modo que la concentración de la forma activa -aunque se mantenga el equilibrio con la forma inactiva- es suficientemente alta para inducir la transcripción del operón *meta* (Ramos *et al.*, 1987a).

1.2 Control transcripcional.

1.2.1 Factores σ .

La expresión selectiva de la información genética en respuesta a señales, externas o internas, proporciona a los organismos un enorme potencial adaptativo, que abarca desde la capacidad de cambiar su maquinaria metabólica en respuesta a la disponibilidad de nutrientes hasta complicados cambios fisiológicos implicados en el desarrollo y diferenciación celular (Jones, 1990). Parece claro que los sensores primarios que responden a los estímulos son proteínas reguladoras, o, en sistemas de dos componentes, proteínas que transmiten señales a las proteínas reguladoras que interaccionan con secuencias específicas del ADN (Adhya y Garges, 1990). La disposición de estas secuencias determina el patrón de la transcripción génica (Jones, 1990).

Los intensos estudios de regulación transcripcional llevados a cabo en procariotas han permitido en los últimos años establecer una serie de elementos reguladores y modelos de transcripción. Frente a la conservación del núcleo (α_2 , β , β') de la ARN-polimerasa bacteriana, la diversidad de factores σ es un primer elemento que proporciona a la vez a la ARN-polimerasa una gran flexibilidad y especificidad para reconocer distintos promotores. En enterobacterias se han establecido dos clases mayoritarias de promotores en base al factor σ que reconoce las secuencias de iniciación de la transcripción y a la disposición de las secuencias reguladoras en los promotores (Collado-Vides *et al.*, 1991). La mayor parte de los promotores de enterobacterias, y probablemente de procariotas, son reconocidos por el factor σ^{70} , y un pequeño grupo, aunque representado en muy diversos grupos taxonómicos, por σ^{54} .

El elemento basal de reconocimiento de σ^{70} es el consenso -10/-35 (5'-TATAAT-3'/5'-TTGACA). En este tipo de promotores, aquellos con secuencias similares al consenso se transcriben constitutivamente. En este grupo se encuentran los genes implicados en el funcionamiento básico de las células. Otros promotores dependientes de σ^{70} presentan conservada la región de -10, pero contienen secuencias

atípicas en -35. En estos casos se requiere la participación de un regulador adicional. Las secuencias reguladoras de estos promotores suelen estar próximas al sitio de unión de la ARN-polimerasa, y su posición es crítica para la regulación (Collado-Vides *et al.*, 1991). En los promotores sometidos a regulación positiva, las secuencias activadoras se encuentran alrededor de la posición -40, mientras que en los promotores σ^{70} sometidos a represión, al menos un sitio de la región operadora se suele encontrar adyacente al de la ARN-polimerasa. Por tanto, en este tipo de promotores los elementos reguladores contactan directamente con la ARN-polimerasa unida al promotor (Gralla, 1991).

Muchos genes que se transcriben en situaciones excepcionales dependen para su transcripción de factores σ específicos, presentando secuencias distintas a las del consenso -10/-35 para el reconocimiento por los factores σ alternativos. La disponibilidad del factor σ constituye en sí misma un mecanismo de regulación transcripcional de estos genes (Kustu *et al.*, 1989). Así, el factor σ^{32} de enterobacterias permite la transcripción de genes que sintetizan proteínas de protección frente a choques térmicos y condiciones de estrés (Grossman *et al.*, 1984; Lindquist y Craig, 1988); σ^F de enterobacterias (Arnosti y Chamberlin, 1989) y σ^{28} de *Bacillus subtilis* (Hellman *et al.*, 1988) inician la síntesis de factores que intervienen en quimiotaxis y motilidad; otros factores σ intervienen en el control de ciclos celulares, como la esporulación de *Bacillus subtilis* (Kroos *et al.*, 1989; Losick *et al.*, 1986).

El factor σ^{54} , también llamado NtrA y RpoN, interviene en la transcripción de genes relacionados con procesos fisiológicos muy diversos, aunque es minoritario con respecto a σ^{70} . Su estructura y mecanismo de acción se analizan en detalle a continuación.

1.2.2 Regulación positiva: función del factor σ^{54} en múltiples procesos fisiológicos.

El factor σ^{54} se definió en principio como una proteína activadora de la expresión del gen *glnA* de enterobacterias (García *et al.*, 1977), pero más tarde se relacionó con otros genes implicados en el metabolismo y asimilación de nitrógeno, como

los genes relacionados con el transporte de algunos aminoácidos (Ames y Nikaido, 1985; Schmitz *et al.*, 1988), y los genes *nif* relacionados con la fijación biológica de nitrógeno en distintos fijadores libres y simbióticos, como *Klebsiella pneumoniae* (Dixon, 1984; Gussin *et al.*, 1986; Leonardo y Goldberg, 1980; Merrick, 1983), *Rhodobacter capsulatus* (Jones y Haselkorn, 1989), *Azotobacter vinelandii* (Santero *et al.*, 1986; Toukdarian y Kennedy, 1986), *Azospirillum* (Pederosa y Yates, 1984), diversas especies de *Rhizobium* (Gussin *et al.*, 1986; Ronson *et al.*, 1987a) y *Bradyrhizobium* (Fischer *et al.*, 1986). El alineamiento de los promotores *nif* de *K.pneumoniae* (Beynon *et al.*, 1983) sugería que el motivo reconocido por σ^{54} era el par GC situado entre -11 y -14 respecto al sitio de iniciación de la transcripción y el par GG situado a 10pb en 5' respecto al anterior.

Cuando la estructura basal -12/-24 de reconocimiento de σ^{54} se encontró en el promotor del operón "upper" de *Pseudomonas putida* (Inouye *et al.*, 1984), Johnston y Downie (1984) propusieron que estos promotores podían estar relacionados con un grupo más amplio de promotores de bacterias Gram negativas, cuyo sistema de regulación sería distinto del hasta entonces conocido mediado por σ^{70} . Esta propuesta se vió corroborada posteriormente, cuando se describió el requerimiento de σ^{54} para la expresión de Pu y Ps (Dixon, 1986; Inouye *et al.*, 1987a; Köhler *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1987a), y la activación cruzada de Pu por el activador NifA de *Klebsiella pneumoniae* (Dixon, 1986). Efectivamente, desde la propuesta de Johnston y Downie (1984) se han descrito muchos promotores dependientes de σ^{54} no relacionados con la transcripción de genes para el metabolismo de nitrógeno, como el promotor del gen *dctA* cuyo producto génico se requiere para el transporte de ácidos dicarboxílicos en *Rhizobium* (Ronson *et al.*, 1987a); los promotores de los genes *fdhF* y *hyd-3* relacionados con el metabolismo anaeróbico de *Escherichia coli* (Birkmann *et al.*, 1987); genes *xyl* relacionados con la degradación de tolueno y benzoatos en *Pseudomonas putida* (Inouye *et al.*, 1987a); genes para la degradación de mandalato en *Pseudomonas* (Fewson, 1988); *hox* para la síntesis de hidrogenasas en *Alcaligenes eutrophus* y *Pseudomonas facilis* (Hogrefe *et al.*, 1984; Römermann *et al.*, 1988, 1989); *flbG* y *flaN* para la síntesis de proteínas flagelares en *Caulobacter* (Minnich y Newton, 1987; Mullin *et al.*, 1987) y *Pseudomonas aeruginosa* (Johnson

et al., 1986); *pilE1* para la síntesis de pilinas en *Neisseria gonorrhoeae* (Meyer *et al.*, 1984); y el gen que codifica la carboxipeptidasa G2 en *Pseudomonas* (Minton y Clarke, 1985).

A pesar de su diversidad fisiológica, todos estos genes presentan unas características muy homogéneas en cuanto a la regulación de su transcripción se refiere, y que claramente los diferencia de los promotores dependientes de σ^{70} : el elemento basal para el reconocimiento y unión del factor σ^{54} se caracteriza por una secuencia consenso 5'-TTGCA-3' situado entre -11 y -14 respecto al sitio de iniciación de la transcripción y un par GG 10pb por encima del par GC anterior (Ausubel, 1984); todos los promotores de este grupo estudiados están sometidos a regulación positiva, y no a represión (Collado-Vides *et al.*, 1991); las proteínas activadoras de cada uno de los promotores σ^{54} contienen varios dominios homólogos muy conservados (Ronson *et al.*, 1987b); y, por último, en contraste con los promotores dependientes de σ^{70} , las secuencias activadoras de este grupo son distales con respecto al punto de iniciación de la transcripción, situándose entre -100 y -200, pudiendo alterarse su posición sin que pierdan la capacidad de activación (ver Kustu *et al.*, 1989 y Thöny y Hennecke, 1989, para una revisión).

1.2.2.1 Estructura del factor σ^{54} .

El alineamiento de la secuencia de los genes *rpoN* de *Escherichia coli* (Sasse-Dwight y Gralla, 1990), *Klebsiella pneumoniae* (Merrick y Gibbins, 1985), *Rhizobium meliloti* (Ronson *et al.*, 1987a), *Azotobacter vinelandii* (Merrick *et al.*, 1987), *Rhodobacter capsulatus* (Jones y Haselkorn, 1989) y *Pseudomonas putida* (Köhler *et al.*, 1989) puso de manifiesto la presencia de varios dominios de homología muy conservados entre los factores σ^{54} (Fig. 7), y la baja homología con el resto de los factores σ de procariotas. Las zonas más conservadas permitieron definir tres regiones a lo largo de la secuencia de la proteína (Merrick *et al.*, 1987). La región I (N-terminal) contiene cuatro heptadas hidrofóbicas compuestas en un 25% por glutamina; la región II (central) contiene tres dominios ricos en residuos ácidos; y la región III (C-terminal) contiene cuatro heptadas hidrofóbicas ricas en residuos ácidos y una zona en hélice-giro-hélice característica de proteínas de unión al ADN. Las heptadas

hidrofóbicas de las regiones I y III son características de las cremalleras de leucina (Landshulz *et al.*, 1988; Vinson *et al.*, 1989). Sorprendentemente en los factores σ^{54} no aparece el dominio más conservado en el resto de los factores σ , que es la región de unión a la ARN-polimerasa (Thöny y Hennecke, 1989), de modo que no se conoce el mecanismo de interacción para formar el complejo σ^{54} -ARN-polimerasa.

La función de los dominios conservados en los factores σ^{54} se ha analizado mediante ensayos de improntas *in vivo* con dimetil sulfato y KMnO_4 en el promotor *glnAp2* de *E.coli*. En estos estudios Sasse-Dwight y Gralla (1990) utilizaron mutantes del factor σ^{54} con deleciones en los distintos dominios en la cepa SDKTI, un mutante *rpoN*⁻ de *E.coli*. Las deleciones en cualquiera de las dos heptadas hidrofóbicas que flanquean a la región II producían complejos de transcripción defectuosos, ya que sólo se establecían contactos entre el promotor y el holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa en la región de -24, pero se perdía el contacto en la de -12, y no se producía desnaturalización del promotor para iniciar la transcripción. Las deleciones en el motivo hélice-giro-hélice de la región III implicaban la pérdida total de contacto con el promotor, ya que no se observaba protección en -12 ni en -24, y tampoco se producía desnaturalización del promotor. Por último, las deleciones en los dominios de acidez 1 y 2 de la región II (Fig. 7) no afectaban al contacto del holoenzima con el promotor, pero el complejo promotor- σ^{54} -ARN-polimerasa era defectuoso, ya que sólo se producía una desnaturalización parcial del promotor. Basándose en estos resultados, Sasse-Dwight y Gralla propusieron que las heptadas hidrofóbicas formarían una cremallera de leucina intramolecular responsable del contacto en -12, adyacente a la zona de desnaturalización del promotor (Fig. 8). Cada heptada tendría la estructura de una hélice anfipática (Giniger y Ptashne, 1987; Hope *et al.*, 1988), con una superficie polar rica en glutaminas en la región I y una superficie polar rica en residuos ácidos en la región III, de modo que la cremallera de leucina formaría una estructura con dos superficies activadoras asociadas al complejo promotor-ARN-polimerasa que debe ser activado. La región en hélice-giro-hélice reconocería al promotor, estableciendo contacto en la zona de -24 (Fig. 8). Los dominios ácidos de la región II quedarían situados por la cremallera de leucina próximos a la zona a desnaturalizar, aunque la desnaturalización

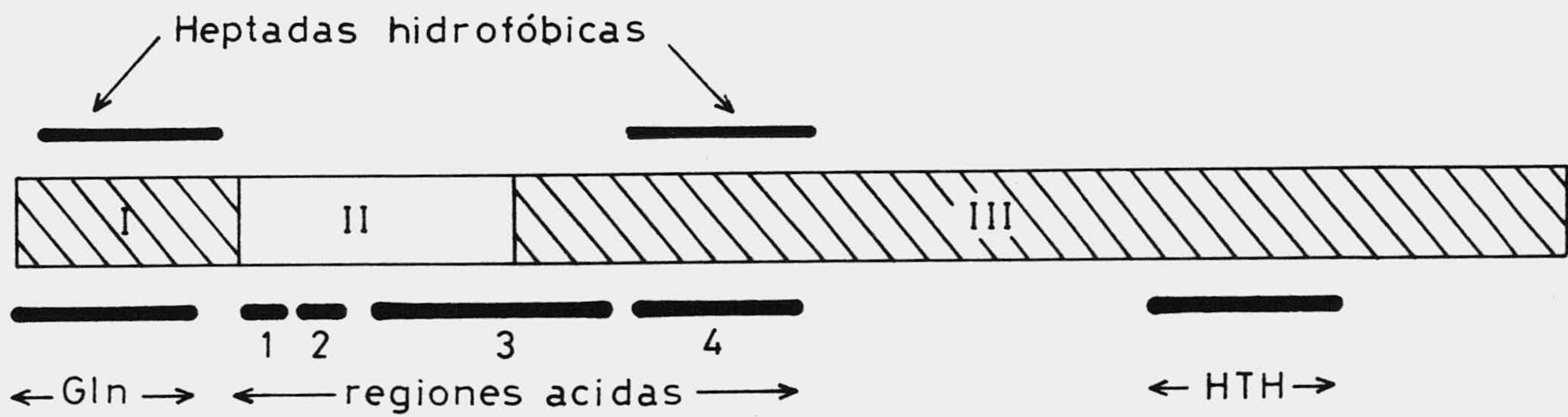


Figura 7: Esquema de los dominios de homología conservados en los factores σ^{54} . Se indican las tres regiones conservadas (I, II y III) en las secuencias de los factores σ^{54} de distinta bacterias Gram-negativas (Merrick *et al.*, 1987). Mediante barras se señalan las heptadas hidrofóbicas, la región rica en glutaminas (Gln), los dominios ácidos (1, 2, 3 y 4), y el dominio en hélice-giro-hélice (HTH).

sólo ocurre cuando interviene el activador NtrC (Ninfa *et al.*, 1987; Sasse-Dwight y Gralla, 1988). El papel de los dominios ácidos en la desnaturalización puede ser la transmisión de señal entre NtrC y la ARN-polimerasa, pero podría intervenir directamente induciendo una alta densidad de carga negativa que provocase la separación de las cadenas de ADN (Sasse-Dwight y Gralla, 1990).

1.2.2.2 Activadores de la transcripción y secuencias activadoras remotas.

Los promotores dependientes de σ^{54} se expresan sólo en determinadas condiciones ambientales (Thöny y Hennecke, 1989), y todos están sometidos a regulación positiva (Collado-Vides *et al.*, 1991). Las proteínas activadoras de algunos de ellos no han sido identificadas, aunque sí se ha comprobado su requerimiento de secuencias activadoras remotas que pueden ser los sitios de unión de los activadores (Kustu *et al.*, 1989). Hay ciertas evidencias de que el requerimiento de una proteína activadora es general para todos los promotores -12/-24: σ^{54} se une al promotor *glnAp2* y al promotor de *nifLA* en ausencia del activador NtrC, pero la iniciación de la transcripción sólo ocurre en presencia del activador (Minchin *et al.*, 1989; Ninfa *et al.*, 1987; Popham *et al.*, 1989; Sasse-Dwight y Gralla, 1988); por otro lado, se ha observado activación heteróloga por NifA en promotores dependientes de NtrC (Drummond *et al.*, 1983; Merrick, 1983; Ow y Ausubel, 1983), y de NifA y NtrC en el promotor Pu dependiente de XylR (Dixon, 1986).

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los activadores conocidos, NtrC de *K.pneumoniae* (Drummond *et al.*, 1986; Jones y Haselkorn, 1989), DctD de *R.meliloti* (Ronson *et al.*, 1987c), NifA de *K.pneumoniae*, *A.vinelandii* y varias especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Bennett *et al.*, 1988; Drummond *et al.*, 1986; Fischer *et al.*, 1988; Grönger *et al.*, 1987; Nees *et al.*, 1988), y XylR (Inouye *et al.*, 1988), permite definir varios dominios con distinto grado de homología. El dominio N-terminal es homólogo en NtrC y DctD, y a su vez presenta homología con otras proteínas reguladoras de procariontes implicadas en sistemas de regulación de dos componentes: un sensor (NtrB o DctB) que reconoce un estímulo ambiental, y un regulador (NtrC o DctD) que interacciona con el sensor y activa la transcripción (Nixon *et al.*, 1986). Los dominios N-terminales de NifA y XylR no presentan

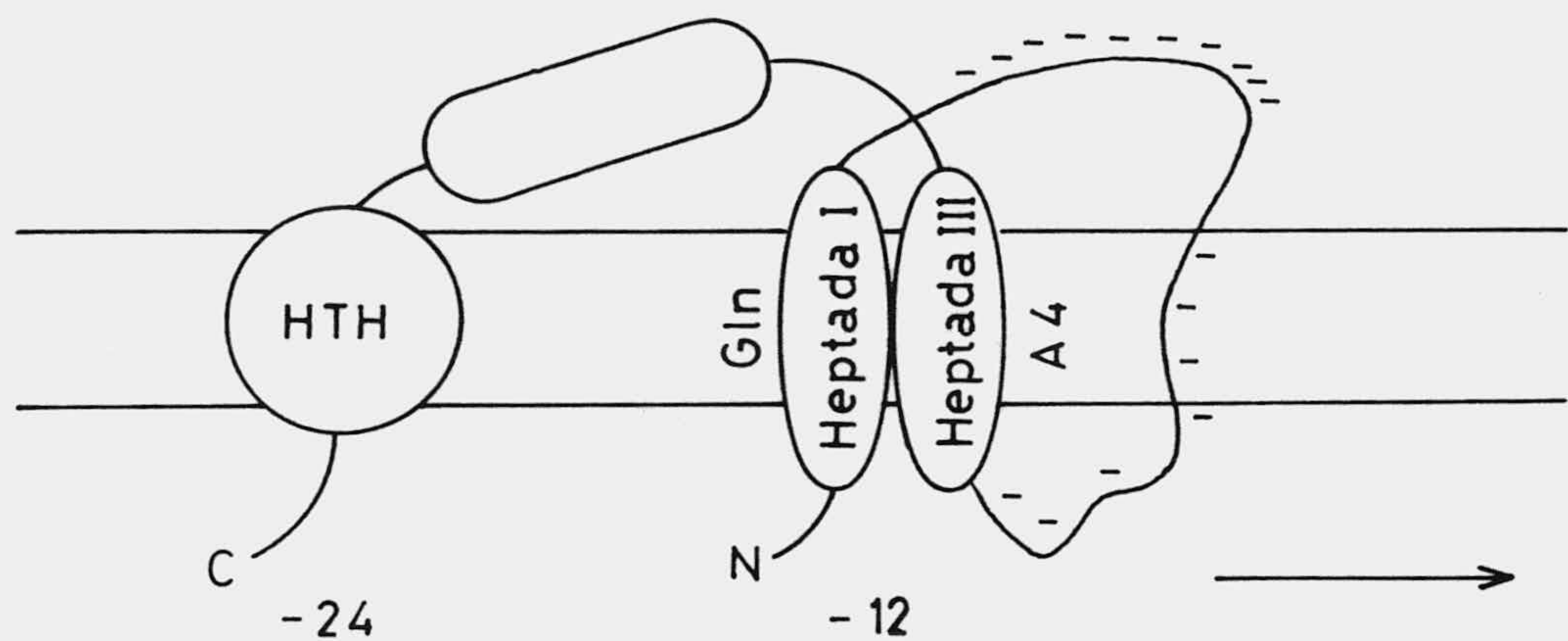


Figura 8: **Representación del modelo de interacción de σ^{54} con el consenso -12/-24.** El dominio en hélice-giro-hélice (HTH) interactúa con la región de -24. Las heptadas hidrofóbicas de los dominios I y III de σ^{54} forman una cremallera de leucina intramolecular que interactúa con la región de -12, y forma una estructura con dos superficies activadoras potenciales, una rica en glutaminas (Gln) y un dominio ácido (A4). Los dominios ácidos de las regiones II y III, indicados por signos negativos (-), quedan próximos a la zona de desnaturalización del promotor. La flecha indica el sentido de la transcripción. El modelo es de acuerdo con la propuesta de Sasse-Dwight y Gralla (1990).

homología con los anteriores, lo cual sugiere que son estas regiones específicas de los reguladores las que reconocen señales externas, bien directamente, como XylR, que aparentemente sólo requiere la presencia de efectores para activar la expresión de Ps y Pu (Abril *et al.*, 1989; Franklin y Williams, 1980; Inouye *et al.*, 1987a), o bien a través de proteínas sensoras en sistemas de dos componentes, como NtrC y DctD, que son activados por fosforilación mediada por los sensores NtrB y DctB (Ninfa y Magasanik, 1986; Ronson *et al.*, 1987c), o NifA de *Klebsiella* que es inactivado por NifL en respuesta a alta tensión de oxígeno (Hill *et al.*, 1981; Merrick *et al.*, 1982).

El dominio central, que comprende aproximadamente 240 aminoácidos, está muy conservado en este grupo de activadores, y se le atribuyen dos funciones (Thöny y Hennecke, 1989): por un lado, generar energía para catalizar la apertura del complejo abierto, y por otro, interaccionar con el complejo σ^{54} -ARN-polimerasa. Esta atribución de funciones se basa en que esta región contiene un sitio de unión e hidrólisis de ATP (Fry *et al.*, 1986; Ronson *et al.*, 1987c), necesario para la desnaturalización del promotor (Popham *et al.*, 1989), y por otro lado, en los efectos de mutaciones en este dominio en NtrC y NifA: las mutaciones en NtrC de residuos conservados en todos los activadores producen reguladores defectuosos, incapaces de catalizar la desnaturalización del promotor (Wei y Kustu, 1981); y las formas truncadas de NifA que sólo mantienen este dominio central, aún son capaces de activar la transcripción de *nifH* en *R.meliloti* (Huala y Ausubel, 1989), lo cual sugiere que esta región puede interaccionar directamente con el holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa.

El dominio C-terminal también presenta un alto grado de homología en el grupo de los activadores secuenciados. Contiene una estructura en hélice-giro-hélice característica de proteínas de unión al ADN, y es probable que este dominio interaccione con secuencias específicas del promotor. De hecho, la mayoría de los promotores dependientes de σ^{54} contienen secuencias activadoras distales, situadas a más de 100pb en 5' con respecto al punto de iniciación de la transcripción, que si bien no son imprescindibles para la transcripción, producen una fuerte estimulación de la misma. Las secuencias pueden trasladarse a más de 1kb de su posición sin perder totalmente la capacidad de activación (Birkman y Böck, 1989; Inouye *et al.*, 1990;

Reitzer y Magasanik, 1986). La delección de estas secuencias en el promotor *glnAp2* (Reitzer y Magasanik, 1986), y en el promotor de *nifH* de *K.pneumoniae* (Buck *et al.*, 1986), y de *nifH* y *nifD* de *B.japonicum* (Alvarez-Morales *et al.*, 1986) producía una fuerte disminución de la expresión de los mismos, que podía compensarse si se aumentaba la concentración de proteína activadora, lo cual sugiere que el activador puede interaccionar directamente con el holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa cuando su concentración es suficientemente elevada (Austin *et al.*, 1987; Reitzer y Magasanik, 1986; Wong *et al.*, 1987).

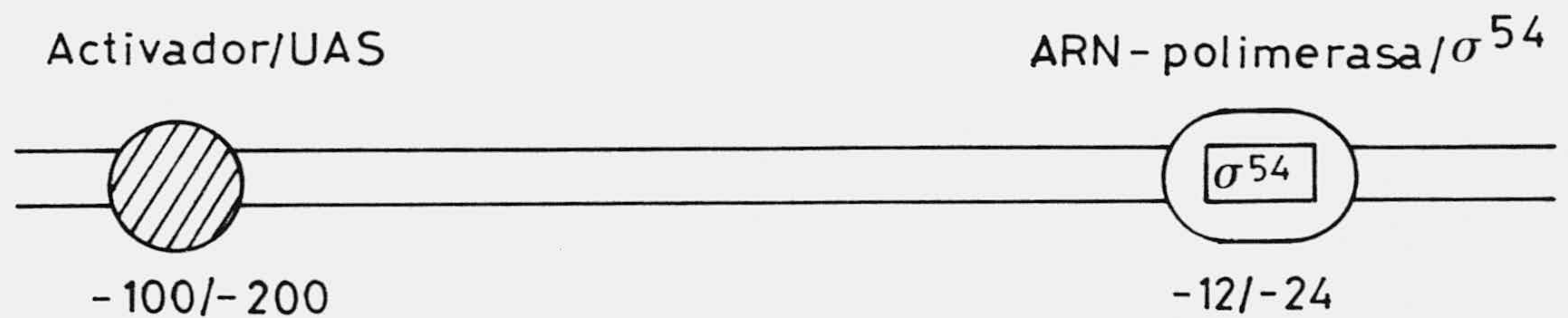
Mediante ensayos de protección *in vivo* e *in vitro* se ha comprobado que NtrC y NifA se unen a estas regiones, cuyas secuencias se han definido en base a los mismos ensayos (Ames y Nikaido, 1985; Morett y Buck, 1988; Reitzer y Magasanik, 1986). Por otro lado, mediante mutagénesis y delecciones del dominio en hélice-giro-hélice de NtrC y NifA se ha demostrado que la unión a las secuencias activadoras remotas se efectúa a través del dominio C-terminal de estos activadores (Contreras y Drummond, 1988; Morett *et al.*, 1988).

Para explicar este sistema de activación remota Buck *et al.* (1987) propusieron un modelo en el que el activador unido a la secuencia activadora remota interaccionaba con el complejo promotor- σ^{54} -ARN-polimerasa, catalizando la desnaturalización local del promotor (Fig. 9); esta interacción implicaba la formación de un doblez o giro del ADN para permitir la aproximación física entre el activador y el complejo σ^{54} -ARN-polimerasa. Este doblez de la molécula de ADN se ha demostrado mediante microscopía electrónica (Su *et al.*, 1990). Las excepciones al modelo hacen suponer que el activador puede interaccionar directamente con σ^{54} , pero su unión a la secuencia activadora y la aproximación al complejo promotor- σ^{54} -ARN-polimerasa por doblez del ADN aumenta la concentración local de activador en el promotor, favoreciendo la iniciación de la transcripción (Drummond *et al.*, 1986; Gralla, 1991; Ninfa *et al.*, 1987; Santero *et al.*, 1989; Su *et al.*, 1990).

1.2.2.3 El factor de integración del hospedador (IHF).

Como se ha indicado anteriormente, el modelo de activación remota de los promotores -12/-24 predice la formación de bucles de ADN para permitir el contacto entre

A)



B)

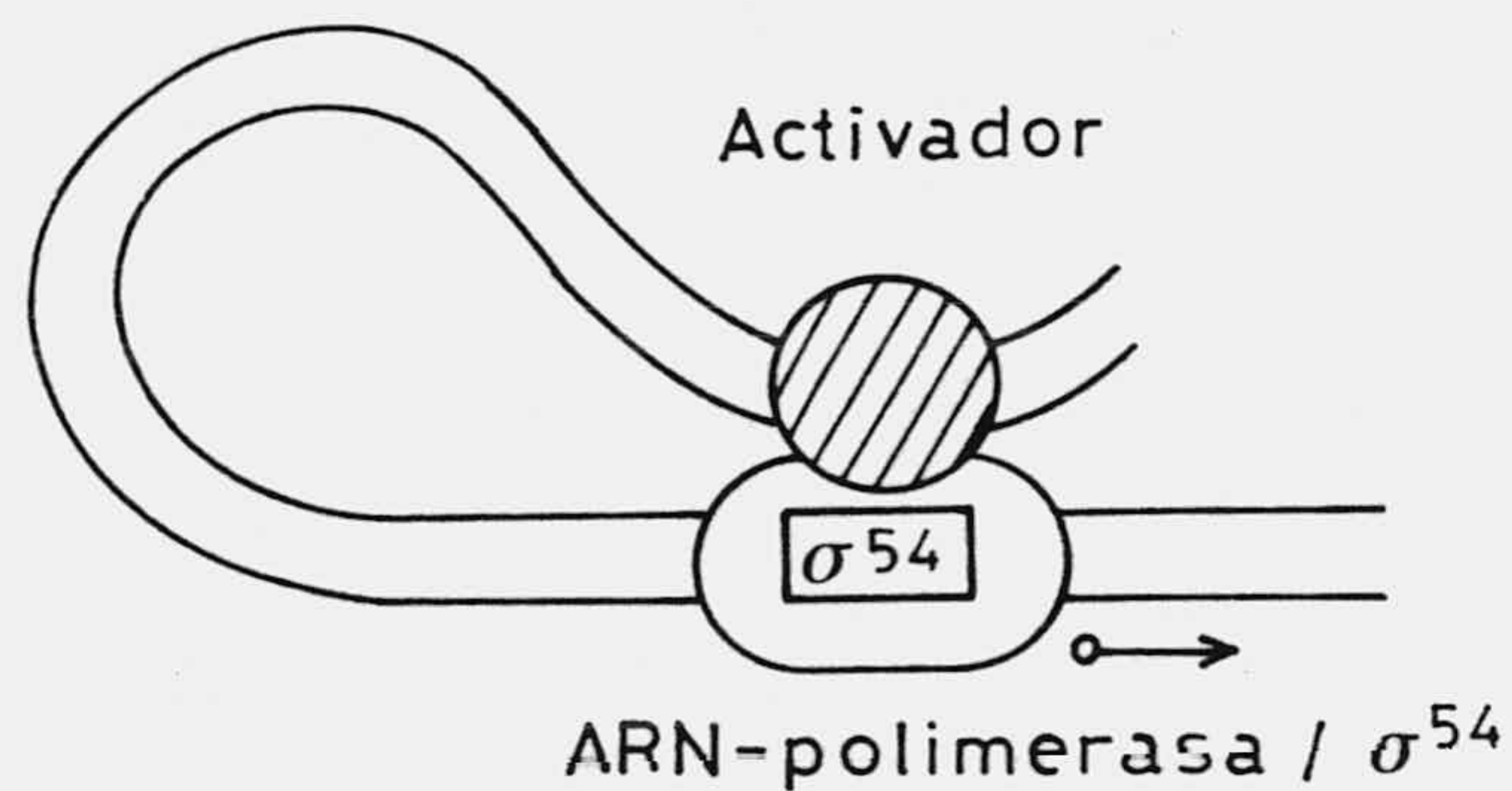


Figura 9: Representación del modelo de activación remota de los promotores -12/-24. A) El holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa reconoce las secuencias consensus en -12/-24 y se une al promotor. El activador reconoce las secuencias activadoras remotas (UASs) en la región de -100/-200. B) El activador unido a las UASs interacciona con el complejo promotor- σ^{54} -ARN-polimerasa cuando se produce el doblaje del ADN, catalizando la desnaturalización local del promotor para iniciar la transcripción.

el activador y el complejo promotor- σ^{54} -ARN-polimerasa (Fig. 9). Recientemente se ha demostrado la intervención de una proteína que induce dobleces en el ADN -el factor de integración del hospedador (IHF)- en la regulación de la transcripción de algunos promotores -12/-24, (Abril *et al.*, 1991; Cannon *et al.*, 1990; Gober y Shapiro, 1990; Hoover *et al.*, 1990; de Lorenzo *et al.*, 1991; Santero *et al.*, 1989), aunque no se requiere en otros, como *glnAp2* (Claverie-Martín y Magasanik, 1991). En todos los casos descritos IHF no induce la transcripción por sí mismo, sino que estimula la activación mediada por las proteínas reguladoras unidas a las secuencias activadoras remotas.

IHF es una proteína heterodimérica de 20kD con una estructura en forma de "T", cuyos brazos son dos láminas β antiparalelas (Drlica y Rouvière-Yaniv, 1987). La subunidad α está codificada por el gen *himA* (Mechulam *et al.*, 1985; Miller, 1981), y la subunidad β por el gen *hip* o *himD* (Flamm y Weisberg, 1985).

IHF interviene en multitud de procesos celulares diversos, como recombinación integrativa del fago λ (Kikuchi y Nash, 1978) y $\phi 80$ (Leong *et al.*, 1985), transposición del transposón Tn10 (Morisato y Kleckner, 1987) y de la secuencia de inserción IS1 (Gamas 1985), empaquetamiento de fagos (Greenstein *et al.*, 1988), replicación de algunos plásmidos (Stenzel *et al.*, 1987) y control transcripcional de algunos genes (ver Friedman, 1988, para una revisión).

Mediante ensayos de retardo en gel (Wu y Crothers, 1984) se ha estimado que IHF induce dobleces en el ADN con un ángulo de 140° (Kosturko *et al.*, 1989; Thomson y Landy, 1988). Los sitios de unión de IHF al ADN, determinados mediante ensayos de protección por ADN-asa *in vitro*, son secuencias de aproximadamente 40pb (Yang y Nash, 1989); la protección de segmentos tan largos, dado el tamaño de IHF, sólo se explica mediante el plegamiento de la cadena de ADN alrededor de los brazos laterales de la proteína, que interaccionan con la hendidura menor de la hélice de ADN (Yang y Nash, 1989).

Goodman y Nash (1989) han demostrado que la inducción de dobleces en el ADN es la función primaria de IHF, y no una consecuencia de otro tipo de interacción, ya que la sustitución del sitio H2 de unión de IHF a *attP* por una secuencia de conformación en ángulo, o por el sitio de unión de la proteína CRP, receptor de AMPc,

que también induce dobleces en el ADN, no afectaba al proceso de recombinación integrativa del fago λ .

En los promotores -12/-24 en cuya transcripción se ha demostrado la intervención de IHF, los sitios de unión aparecen siempre entre las secuencias activadoras remotas y el sitio de unión del holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa (Collado-Vides *et al.*, 1991). La distancia a las secuencias activadoras es siempre aproximadamente 80pb, y parece ser crítica, ya que la alteración de esta distancia implicaba que IHF se comportase como un represor de la transcripción (Claverie-Martín y Magasanik, 1991; Huang *et al.*, 1990; Kennedy *et al.*, 1988).

Collado-Vides *et al.* (1991) han propuesto que los promotores dependientes de σ^{54} en cuya transcripción interviene IHF han adoptado el sistema de dobleces inducidos por IHF para compensar la eventual inestabilidad de los complejos de nucleoproteína que intervienen en la transcripción, ya que en promotores fuertes como *glnAp2* no hay sitio de unión de IHF. En cambio sí los hay en los promotores *nifH* y *nifLA* de *K.pneumoniae*, en los que la unión del holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa al promotor es inestable (Buck y Cannon, 1989; Minchin *et al.*, 1989; Morett y Buck, 1989), y en el promotor *glnHp2*, en el que el activador se une débilmente a las secuencias activadoras remotas (Claverie-Martín y Magasanik, 1991). En estos casos la probabilidad de que al doblarse el ADN el activador contacte con el holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa es baja; la inducción de dobleces por IHF aumenta esta probabilidad, facilitando el contacto.

1.2.2.4 Regulación de la síntesis de los factores que intervienen en la transcripción de los promotores -12/-24.

La disponibilidad de las proteínas activadoras, de IHF y de σ^{54} puede ser un factor limitante de la transcripción, y por tanto, es también un mecanismo de control indirecto de la expresión de genes con promotores -12/-24.

Los estudios de transcripción de los genes *rpoN* de *E.coli*, *K.pneumoniae* y *R.meliloti* indican que su expresión es constitutiva, de modo que la regulación de los promotores dependientes de σ^{54} depende de otros factores, extrínsecos a los niveles de σ^{54} en la célula (Castaño y Bastarrachea, 1984; De Bruijn y Ausubel, 1983;

Merrick y Stewart, 1985).

En cambio, la expresión de los genes que codifican las proteínas activadoras está sometida a regulación, de modo que los mecanismos que controlan la síntesis de los activadores también forman parte del sistema de regulación de los promotores dependientes de σ^{54} . Así, el operón *nifLA* de *K.pneumoniae* se transcribe desde un promotor -12/-24 cuyo activador es NtrC, de modo que en condiciones de limitación de nitrógeno NtrC estimula la producción de NifA (Szeto *et al.*, 1987). En el operón *glnAntrBC* de enterobacterias *ntrB* y *ntrC* se transcriben desde un promotor -10/-35 (*glnAp3*); en condiciones de limitación de nitrógeno la forma activa de NtrC, fosforilada por NtrB, se une al promotor *glnAp3*, inhibiendo su propia síntesis (Magasanik, 1988). *XylR* se transcribe desde dos promotores, Pr₁ y Pr₂, del tipo -10/-35 (Inouye *et al.*, 1985), que solapan con el promotor divergente Ps, del tipo -12/-24 (Inouye *et al.*, 1987a). Los análisis cuantitativos de transcripción de *xylR* parecen indicar que *XylR* reprime su propia síntesis (Inouye *et al.*, 1987a). Estos hechos sugieren una doble función de las proteínas reguladoras, como activadores de promotores -12/-24 y como represores de promotores -10/-35 (McNeil *et al.*, 1982; Thöny y Hennecke, 1989).

Por último, dado que IHF es un elemento regulador muy inespecífico que interviene en muchos procesos celulares, es probable que la transcripción de los genes *himA* y *hip* o *himD* sólo esté regulada para mantener un equilibrio entre las concentraciones de las subunidades α y β , como ocurre con la proteína homóloga HU (Rouvière-Yaniv *et al.*, 1990). Sin embargo, la disponibilidad de IHF se ha descrito como un factor de control secundario en la transcripción del gen *flbG* de *Caulobacter*. El promotor de *flbG* contiene un sitio de unión de IHF, y sus niveles de expresión son muy bajos; las concentraciones de IHF y del activador RF-1 son máximas antes de la división celular, momento en que se transcribe *flbG*, de modo que la combinación de ambos factores controla temporalmente la expresión del gen (Gober y Shapiro, 1990).

1.3 Objetivos de este trabajo.

Con objeto de estimar el potencial metabólico de la ruta "upper" codificada por el plásmido TOL pWW0 de *P.putida* se propuso el estudio del perfil de efectores del regulador XylR y del perfil de sustratos de los enzimas de la ruta.

Para expandir y explotar dicho potencial, se propuso la manipulación de la ruta "upper" para permitir el metabolismo de hidrocarburos aromáticos recalcitrantes.

Por otro lado, con objeto de utilizar el sistema de expresión Pu/XylR en procesos de interés biotecnológico, se propuso determinar el mecanismo íntimo de la regulación de la transcripción del operón "upper".

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 Estirpes bacterianas.

Los genotipos y características más relevantes de las estirpes bacterianas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 1.

2.2 Medios de cultivo.

La composición de los medios de cultivo utilizados en el curso de este trabajo se detalla a continuación.

-Como medio habitual de crecimiento, tanto para las cepas de *E.coli* como para las de *P.putida*, se utilizó el medio de Luria-Bertani (LB) (Maniatis *et al.*, 1982), cuya composición es la siguiente:

NaCl	10g
Bactotriptonna	10g
Extracto de levadura	5g
H ₂ O hasta	1l

Cepas bacterianas	Características	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
5K <i>recA</i>	<i>res, thr, thi, tonA, supE, recA.</i>	R.L. Robson.
JM101	<i>lac, pro, thi, supE, F'(traD36, proAB⁺, lacIZΔM15).</i>	Messing, J., 1979.
71/18	<i>lac, pro, thi, supE, F'(proAB⁺, lacIZΔM15).</i>	Messing <i>et al.</i> , 1977.
CJ236	<i>thi, dut, ung, relA/pCJ105, Cm^r.</i>	Joyce <i>et al.</i> , 1984.
S90C	<i>rpsL, lac, pro.</i>	Biek <i>et al.</i> , 1986.
DPB101	<i>rpsL, lac, pro, himD451::mini-tet.</i>	Biek <i>et al.</i> , 1986.
<i>Pseudomonas putida</i>		
2440	<i>hsdMR.</i>	Franklin <i>et al.</i> 1981.
EEZ1	2440 Rif ^r .	Abril <i>et al.</i> , 1989.
EEZ3	2440 Rif ^r , Sm ^r .	Abril <i>et al.</i> , 1989.
PaW340	<i>trp, Nal^r.</i>	S. Harayama.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
B13	<i>m-clorobenzoato⁺.</i>	Dorn <i>et al.</i> , 1974.
EEZ4	B13 Rif ^r .	Abril <i>et al.</i> , 1989.
EEZ5	B13, <i>m-clorotolueno⁺.</i>	Abril <i>et al.</i> , 1989.

Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo. Las abreviaturas usadas para los antibióticos son: Cm, cloranfenicol; Rif, rifampicina; Sm, estreptomina; Nal, ácido nalidíxico.

-Para el cultivo de células en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9 (Maniatis *et al.*, 1982), cuya composición es la siguiente:

(NaH ₂ PO ₄) × 7H ₂ O	6g
K ₂ HPO ₄	3g
NH ₄ Cl	1g
NaCl	0,5g
MgSO ₄	52mg
Solución A9	2,5ml
Glucosa	5g
H ₂ O hasta	1l

La composición de la solución A9 es la siguiente:

HBO ₃	300mg
ZnCl ₂	50mg
(MnCl ₂) × 4H ₂ O	30mg
CoCl ₂	200mg
(CuCl ₂) × 2H ₂ O	10mg
(NiCl ₂) × 6H ₂ O	20mg
(NaMoO ₄) × 2H ₂ O	30mg
H ₂ O hasta	1l

Para la preparación de medios sólidos se añadió Bactoagar hasta alcanzar una concentración final de 15g/l.

-Para el crecimiento de fagos en medio líquido se utilizó el medio 2xYT (Kunkel *et al.*, 1987), que tiene la siguiente composición:

NaCl	5g
Bactotriptonna	16g
Extracto de levadura	10g

H₂O hasta 1l

-Como medio sólido de cultivo de células para el aislamiento de placas de lisis se utilizó el medio H (Kunkel *et al.*, 1987), que tiene la siguiente composición:

NaCl 8g
 Bactotriptonna 10g
 Bactoagar 12g
 H₂O hasta 1l

-Para la siembra de fagos sobre el medio H se usó agar de cobertera (Kunkel *et al.*, 1987), cuya composición es la siguiente:

NaCl 8g
 Bactotriptonna 10g
 Bactoagar 6g
 H₂O hasta 1l

Todos los medios se esterilizaron por calor húmedo, autoclavándolos durante 20 minutos a una temperatura de 115°C y 1 atmósfera de presión.

2.3 Antibióticos.

Se utilizaron los siguientes antibióticos a las concentraciones finales indicadas en $\mu\text{g/ml}$:

Ampicilina (Ap) 100
 Kanamicina (Km) 25
 Estreptomicina (Sm) 50
 Acido nalidíxico (Nal) 10
 Tetraciclina (Tc) 10

Cloranfenicol (Cm)	30
Rifampicina (Rif)	10

Se prepararon soluciones madre 1000 veces concentradas en agua destilada o en etanol absoluto; las primeras se esterilizaron por filtración a través de filtros estériles de nitrocelulosa de $0,45\mu\text{m}$ de diámetro de poro.

2.4 Conservación de cepas bacterianas.

A corto plazo las cepas bacterianas se conservaron a 4°C en cultivos en estría en placas de LB sólido. Durante periodos de seis meses se conservaron en cultivos en picadura que se almacenaron a temperatura ambiente. La conservación a largo plazo se realizó por congelación de cultivos en LB líquido con glicerol 40% (v/v) a -20°C y -70°C .

2.5 Plásmidos.

Los plásmidos utilizados para la realización de este trabajo se relacionan en la Tabla 2.

Los mapas de restricción de los vectores de clonación más frecuentemente utilizados en el curso de este trabajo se presentan en las Figuras 10 a 12.

Los plásmidos de nueva construcción se describen en los apartados correspondientes de la sección de Resultados.

2.6 Preparación de células competentes de *E.coli*.

Las células competentes de *E.coli* se prepararon siguiendo el método descrito por Cohen *et al.* (1972). Las cepas correspondientes de *E.coli* se inocularon en 3ml de LB suplementado con los antibióticos adecuados y se incubaron a 37°C durante 12-16 horas. Estos preinóculos se diluyeron 100 veces en LB líquido y se incubaron

Plásmidos	Características	Referencia
Vectores		
pBR322	Ap ^r , Tc ^r .	Bolívar <i>et al.</i> , 1977.
pTZ19	Ap ^r , <i>ori</i> F1.	Zoller <i>et al.</i> , 1983.
pGC2	Ap ^r , <i>ori</i> M13.	Kunkel <i>et al.</i> , 1987.
pMC1403	Ap ^r , vector de ensayo de promotores.	Casadaban <i>et al.</i> , 1980.
pMD1405	Ap ^r , vector de ensayo de promotores.	M. Drummond. Ramos <i>et al.</i> , 1986.
Soportes génicos		
pHP45ΩKm	Km ^r .	Prentki <i>et al.</i> , 1984.
pKT570	Sm ^r , IncP, <i>xy</i> lR, <i>xy</i> lS.	Franklin <i>et al.</i> , 1981.
pRL38	Ap ^r , <i>orip</i> BR, <i>xy</i> lR, <i>xy</i> lS.	S. Harayama Holtel <i>et al.</i> , 1990
pTS174	Cm ^r , <i>ori</i> P15, <i>xy</i> lR.	Inouye <i>et al.</i> , 1983.
pNM185	Km ^r , IncP, <i>xy</i> lS.	Mermod <i>et al.</i> , 1986.
pERD4	Km ^r , IncP, <i>xy</i> lS4.	Ramos <i>et al.</i> , 1987b.
pWA21	Ap ^r , Sm ^r , IncP, P _{LAC} :: <i>xy</i> lMA.	Wubbolts, 1987.
Fusiones transcripcionales		
pRD579	Ap ^r , <i>orip</i> BR, Pu:: <i>lac</i> Z.	Dixon, 1986.
pERD100	Tc ^r , IncQ, Pu:: <i>lac</i> Z.	Ramos <i>et al.</i> , 1990.
Plásmidos TOL		
pWW0	Plásmido TOL.	Worsey <i>et al.</i> , 1978.
pWW0-EB6	TOL <i>p</i> -etilbenzoato ⁺ .	Ramos <i>et al.</i> , 1987b.

Tabla 2: Plásmidos utilizados en este trabajo. Las abreviaturas son: Ap, ampicilina; Km, kanamicina; Sm, estreptomycin; Cm, cloranfenicol; Tc, tetraciclina; Pu, promotor de la ruta "upper"; Pm, promotor de la ruta *meta*; P_{LAC}, promotor de *lac*.

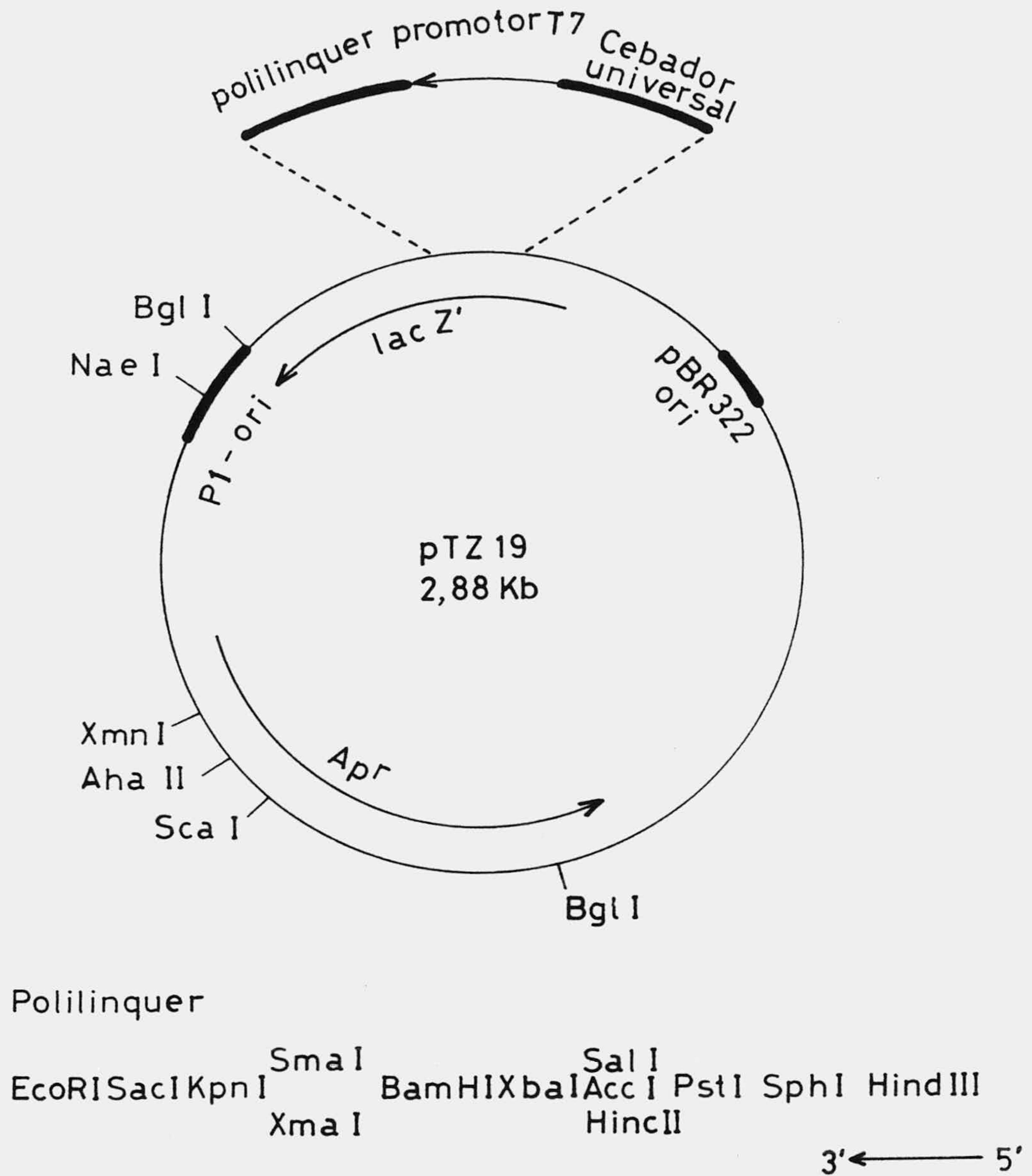


Figura 10: Representación del vector de clonaje pTZ19. Es un derivado de pUC19 (Vieira y Messing, 1982), cuyo origen de replicación es el de pBR322. Contiene además el origen de replicación del fago F1, que permite su utilización como vector para la preparación de cadena sencilla en presencia del fago auxiliar M13K07 en el procedimiento de mutagénesis dirigida con oligonucleótidos. La secuencia de hibridación adyacente al polilinker permite la secuenciación de insertos a partir de cebadores universales. La situación del polilinker interrumpe la transcripción del fragmento α de la β -galactosidasa, y por tanto permite detectar clonaciones positivas en el polilinker por la coloración blanca de los transformantes en presencia de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) en cepas adecuadas de *E. coli* (Messing, 1983).

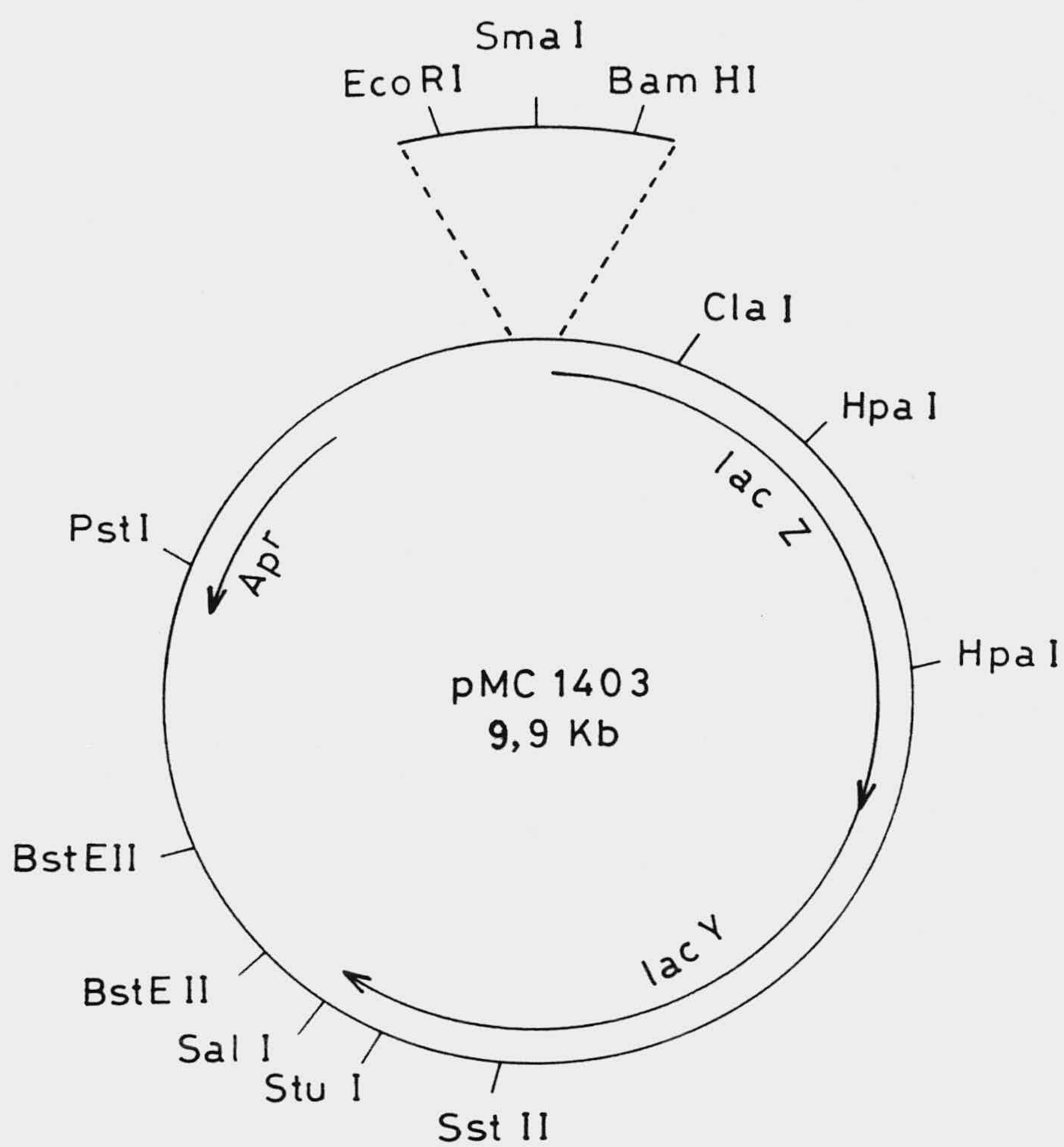


Figura 11: Representación del plásmido pMC1403. Los sitios únicos de restricción *EcoRI*, *SmaI* y *BamHI*, situados frente al octavo codón del gen *lacZ*, permiten su utilización como vector de clonaje y ensayo de promotores en fusiones transcripcionales (Casadaban *et al.*, 1980).

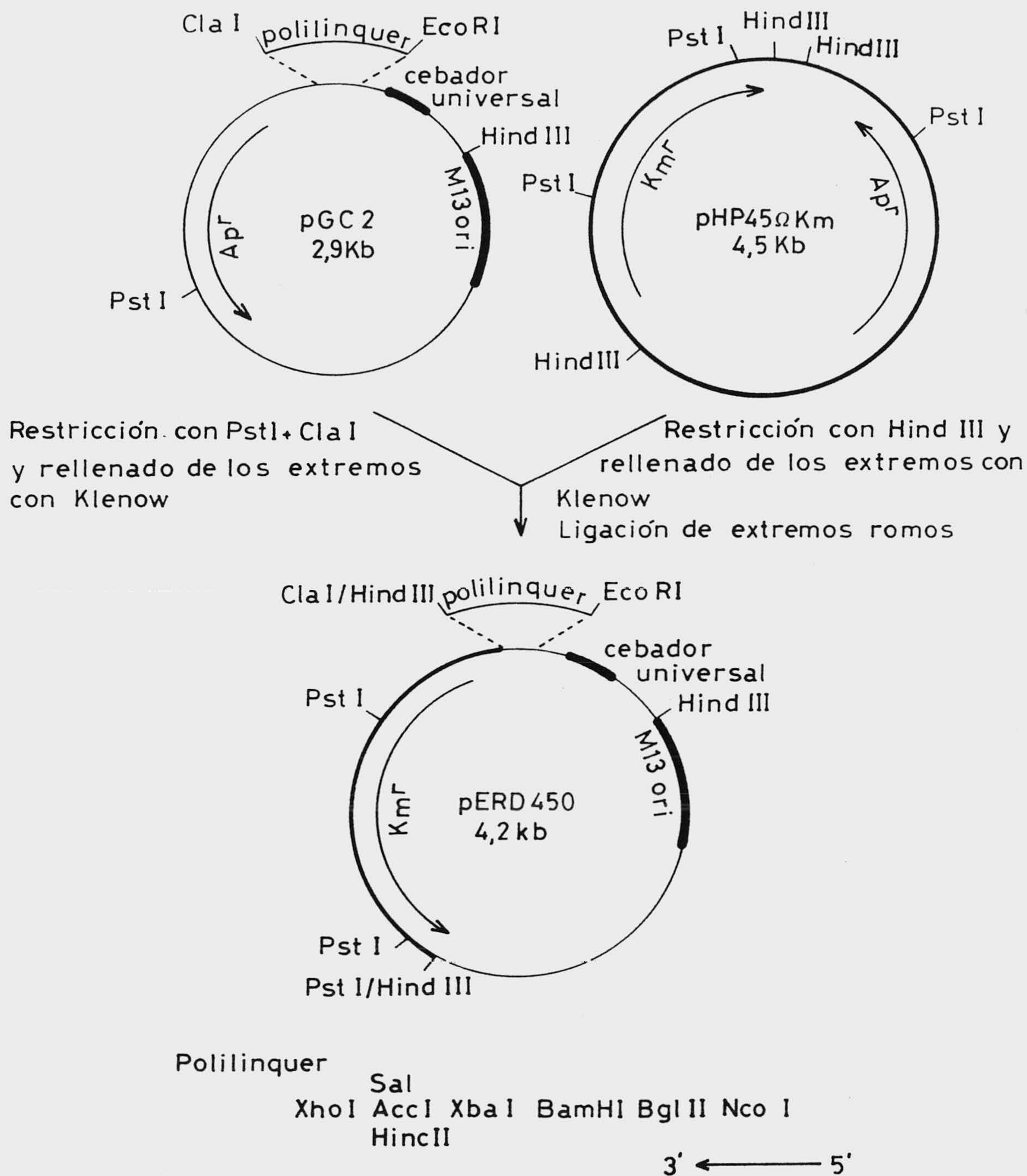


Figura 12: Esquema de la construcción del plásmido pERD450. El fragmento *ClaI-PstI* que contiene el gen de resistencia a Ap del plásmido pGC2 se sustituyó por el fragmento *HindIII* de pHP45ΩKm portador del gen de resistencia a Km. El origen de replicación de M13 permite su utilización como vector para la mutagénesis dirigida con oligonucleótidos en presencia del fago auxiliar M13K07.

a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial temprana (turbidez a 660nm 0,6-0,8). Las células se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos a 4°C. Las células se lavaron con 10ml de CaCl₂ 10mM frío, y se recogieron por centrifugación a 3000g durante 10 minutos. Por último se resuspendieron suavemente en 2ml de CaCl₂ 100mM, o en 2ml de solución de CaCl₂ 100mM suplementada con glicerol (15% (v/v)) en el caso de que las células se fuesen a conservar para su posterior utilización hasta un máximo de dos meses. La suspensiones celulares se repartieron en alícuotas de 200µl. En el primer caso se incubaron en hielo durante 1 hora para su inmediata utilización, mientras que en el segundo caso se conservaron congeladas a -70°C.

Las soluciones de CaCl₂ empleadas en este método se esterilizaron en autoclave y se conservaron a 4°C.

2.7 Transformación de células competentes.

Cada alícuota de células competentes se transformó con 0,1-1µg de ADN plasmídico. El ADN se añadió a cada alícuota en volúmenes de 1-25µl, incubándose en hielo durante 45 minutos. Las células se sometieron a choque térmico transfiriéndolas a 42°C durante 2 minutos. Entonces se añadieron 2ml de LB sin antibióticos, y se incubaron a 37°C en agitación durante 1-3 horas para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos codificados por el plásmido adquirido. Los transformantes se seleccionaron sembrando alícuotas de 50-300µl del cultivo en placas de LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados.

2.8 Transferencia de plásmidos por conjugación.

La conjugación bacteriana se utilizó para transferir el plásmido TOL pWW0 y sus mutantes entre cepas de *Pseudomonas*. Se siguió el modelo de cruces simples, ya que el plásmido TOL pWW0 es autotransferible (Benson y Shapiro, 1978; Bradley y Williams, 1982).

Las cepas donadora y receptora se cultivaron hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial tardía (turbidez a 660nm 0,8-1). Entonces los cultivos se mezclaron y se recogió 1ml de la mezcla (aproximadamente 10^8 células) por centrifugación a 12300g durante 1 minuto. Las células se resuspendieron en 100 μ l de LB, depositándose sobre un filtro estéril de nitrocelulosa de 45 μ m de diámetro de poro, colocado sobre la superficie de una placa de LB que se incubó durante 16 horas a 30°C. Entonces las células se desprendieron del filtro mediante agitación vigorosa en 5ml de medio mínimo sin fuente de carbono. La selección de los transconjugantes se realizó sembrando diluciones adecuadas de la mezcla en medio sólido con los antibióticos o fuentes de carbono correspondientes. Como controles se utilizaron cultivos de la cepa donadora y receptora incubados en las mismas condiciones.

2.9 Preparación de plásmidos a pequeña escala.

Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala se empleó el método de desnaturalización alcalina de Ish-Horowitz y Burk (1981).

Se inocularon volúmenes de 1,5ml de LB con los correspondientes antibióticos con los distintos clones a analizar, y después de cultivarlos durante 12-16 horas a 37°C en agitación, se recogieron las células por centrifugación en tubos de centrífuga estériles a 12300g durante 1 minuto. Las células se resuspendieron en 100 μ l de una solución de lisozima (4mg/ml) en GTE. Después de 5 minutos a temperatura ambiente, se llevó a cabo la lisis celular adicionando 200 μ l de SDS/NaOH, incubándose la mezcla en hielo durante 5 minutos. El lisado se neutralizó mediante la adición de 150 μ l de tampón acetato potásico pH 4,8, los tubos se agitaron invertidos en un agitador mecánico, y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Las proteínas y restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12300g durante 5 minutos. El sobrenadante se mezcló vigorosamente con 200 μ l de fenol-cloroformo, agitando los tubos en un agitador mecánico. Las fases se separaron por centrifugación a 12300g durante 4 minutos. A la fase acuosa, libre de proteínas, se añadieron 800 μ l de etanol absoluto, y el ADN se precipitó durante 30 minutos a -20°C. Los tubos se centrifugaron a 12300g durante 10 minutos, y el sedimento de ADN se desecó al

vacío y se resuspendió en 25 μ l de TE.

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

-GTE:

Glucosa	50mM
Tris-HCl pH 8,0	25mM
EDTA.Na ₂	10mM

La solución se esterilizó en autoclave y se conservó a 4°C.

-SDS/NaOH:

SDS	1%(p/v)
NaOH	0,2N

Esta solución se preparó inmediatamente antes de su utilización.

-Tampón acetato potásico:

Acetato potásico 5M	60ml
Acido acético glacial	11,5ml
H ₂ O hasta	100ml

El pH se llevó a 4,8 con ácido acético. La solución se esterilizó en autoclave y se conservó a 4°C.

-TE:

Tris-HCl pH 8,0	10mM
EDTA.Na ₂	1mM

La solución se esterilizó en autoclave y se conservó a 4°C.

-Fenol-cloroformo:

Fenol	25ml
Cloroformo	24ml
Alcohol isoamílico	1ml

La solución se saturó con Tris-HCl 1M pH 8,0 hasta que la fase acuosa mantuvo este pH; entonces se retiró el Tris-HCl y se añadió TE.

2.10 Preparación rápida de plásmidos a gran escala.

El procedimiento para la preparación rápida de plásmidos a gran escala fué básicamente el mismo que se utilizó para la preparación alcalina a pequeña escala. Se partió de cultivos iniciales de 15ml, y las reacciones de lisis se llevaron a cabo con los mismos reactivos que las preparaciones a pequeña escala, en volúmenes 10 veces mayores. Después de la lisis celular y la neutralización con tampón acetato potásico, las proteínas y restos celulares se eliminaron por centrifugación a 10000g durante 15 minutos. El sobrenadante se recogió y el ADN se precipitó con 8ml de etanol frío durante 30 minutos a -20°C, recogándose por centrifugación a 10000g durante 15 minutos. El sedimento se drenó y se secó al vacío, resuspendiéndose el ADN en 400µl de TE. Los restos de proteína se eliminaron por extracción con fenol-cloroformo y el ADN se precipitó con etanol por el mismo procedimiento que las preparaciones a pequeña escala. Finalmente el ADN plasmídico se resuspendió en un volumen de 100µl de TE.

2.11 Aislamiento de plásmidos a gran escala.

Se utilizó el método de desnaturalización alcalina de Jouanin *et al.* (1981), con algunas modificaciones.

2ml de cultivos de las cepas de *E. coli* con el plásmido correspondiente, preincubados durante 16 horas, se inocularon en volúmenes de 200ml de LB suplementado con los antibióticos apropiados. Después de 16-24 horas de incubación a 37°C con buena aireación, las células se recogieron por centrifugación a 4000g durante 10 minutos y se resuspendieron en 30ml de GTE agitando suavemente para evitar la formación de grumos. La lisis celular se realizó añadiendo 60ml de una solución fresca de SDS/NaOH y mezclando suavemente. Esta mezcla se mantuvo en hielo durante 5 minutos, y el lisado obtenido se neutralizó con 45ml de KAcF. Después de 15 minutos en hielo, las proteínas y gran parte del ADN cromosómico precipitados por la neutralización se retiraron por centrifugación a 5800g durante 15 minutos. Al sobrenadante recogido se añadieron 80ml de isopropanol frío (-20°C) para precipitar el ADN, que se recogió por centrifugación a 12000g durante 15 minutos. El sedimento se drenó y se secó al vacío, resuspendiéndose en 10ml de TE.

Las soluciones de lisis empleadas en este procedimiento son las mismas que las usadas en la preparación rápida de plásmidos a pequeña escala. La composición del KAcF es la siguiente:

Acetato potásico	3M
Acido fórmico	1,8M

La solución se esterilizó en autoclave y se conservó a temperatura ambiente.

2.12 Purificación de plásmidos en gradiente isopícnico de cloruro de cesio.

A la solución de ADN en 10ml de TE se añadieron 11g de CsCl y 0,5ml de una solución de bromuro de etidio (10mg/ml). Los restos de proteína se eliminaron por centrifugación a 1000g durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos de ultracentrífuga mediante una pipeta Pasteur y, una vez equilibrados, se sellaron por

calor. El gradiente isopícnico de CsCl se obtuvo por ultracentrifugación a 145000g (40000rpm en un rotor Beckman 50Ti) durante 48 horas. Las bandas de ADN plasmídico y cromosómico separadas en el gradiente de CsCl se visualizaron usando luz ultravioleta de 360nm. La banda inferior, correspondiente al ADN plasmídico, se extrajo por succión con una jeringa. El bromuro de etidio se eliminó adicionando un volumen de isopropanol 90% (v/v), descartándose la fase superior. La extracción se repitió hasta que la fase acuosa aparecía incolora. El ADN se precipitó añadiendo dos volúmenes de agua y seis de etanol absoluto a temperatura ambiente. El ADN se recogió por centrifugación a 1000g durante 15 minutos y se resuspendió en 400 μ l de TE. Los restos de proteínas se eliminaron por extracción con fenol-cloroformo, como se describe en las preparaciones de plásmidos a pequeña escala. Al volumen de ADN en TE recogido se le añadieron dos volúmenes de etanol absoluto, y después de 16 horas de incubación a -20°C, se recogió el ADN por centrifugación a 12300g durante 15 minutos. El sedimento se drenó, se secó al vacío y se resuspendió en 100 μ l de TE.

2.13 Determinación de la concentración de ADN.

Se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Maniatis *et al.* (1982).

Se midió la absorbancia de la solución de ADN en agua o en TE a 260 y 280nm utilizando como blanco agua o TE sin ADN. La concentración de ADN en la muestra se calculó respecto a los valores estándar de DO₂₆₀ 1 para soluciones con 50 μ g/ml de ADN de cadena doble, 40 μ g/ml de ADN de cadena sencilla, y 20 μ g/ml de oligonucleótidos. La relación DO₂₆₀/DO₂₈₀ se usó como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol.

2.14 Restricción de ADN.

Las digestiones totales de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima, según recomendaban los fabricantes.

Las reacciones contenían habitualmente 0,5-5 μ g de ADN y 0,5-10U del enzima de restricción en volúmenes finales de 10-30 μ l. Las digestiones se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2 horas a las temperaturas indicadas por los fabricantes.

2.15 Separación e identificación de fragmentos de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN obtenidos por restricción de plásmidos y comprendidos en el intervalo de 0,5 a 20kb se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en tampón TBE. Para distinguir fragmentos de 0,5 a 0,3kb se utilizaron geles de agarosa al 1,2% (p/v) en TBE. La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida en TBE, a 10V/cm. Las soluciones de carga contenían 2 μ l de tampón indicador por cada 10 μ l de las muestras de ADN.

Para la visualización del ADN, los geles se tiñeron por inmersión en una solución de bromuro de etidio durante 15 minutos, y después de varios lavados con agua se expusieron a luz ultravioleta de 254nm en un transiluminador. Los geles se fotografiaron en película Polaroid 667.

El tamaño de los fragmentos de restricción se estimó por interpolación gráfica en curvas del logaritmo del peso molecular frente a la movilidad relativa del fragmento, usando como patrón de peso molecular los fragmentos de restricción con *Hind*III y *Hind*III+*Eco*RI del fago λ .

Las soluciones empleadas en este procedimiento tienen la siguiente composición:

-TBE:

Tris-Base	10,8g
Acido bórico	5,5g
EDTA.Na ₂	0,93g

H₂O hasta 1l

El pH de esta solución es 8,3.

-Tampón indicador de carga:

Glicerol 30%(v/v)

Azul de bromofenol 0,3%(p/v)

-Bromuro de etidio:

Se diluyen 3-4 gotas de una solución de bromuro de etidio (10µg/ml) en aproximadamente 1l de agua.

2.16 Separación e identificación de fragmentos de ADN mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para discriminar fragmentos de ADN inferiores a 0,3kb se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% (p/v) en TBE. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis vertical en TBE, a 8V/cm. Las muestras contenían 0,1µg de ADN por µl. Las soluciones de carga se prepararon con 2µl de tampón indicador por cada 10µl de muestra.

La visualización de los fragmentos se realizó, como en el caso de los geles de agarosa, por tinción con bromuro de etidio y transiluminación con luz ultravioleta de 254nm.

El tamaño de los fragmentos se estimó también por interpolación gráfica. El patrón de peso molecular en este intervalo de tamaño fueron los fragmentos de ADN obtenidos por restricción del plásmido pBR322 con *Hpa*I.

La composición de las soluciones utilizadas es:

-Solución concentrada de acrilamida 40% (p/v):

Acrilamida	38g
N,N'-metilenbisacrilamida	2g
H ₂ O hasta	100ml

La solución se desionizó con 5g de amberlita durante 30 minutos en agitación. La amberlita se eliminó por filtración a través de papel de filtro Whatman AM3, y la solución se almacenó en oscuridad a 4°C.

-Solución de acrilamida 5% (p/v):

Acrilamida 40%(p/v)	3,2ml
TBE(x10)	2,5ml
H ₂ O	19ml

Para catalizar la polimerización de la acrilamida se añadieron a la solución anterior, inmediatamente antes de verter el gel, 0,3ml de persulfato amónico 10% (p/v) y 25µl de TEMED.

-Tampón indicador de carga:

Xilanilcianol	0,25%(p/v)
Azul de bromofenol	0,25%(p/v)
Glicerol	30%(v/v)

El montaje de los geles se realizó según el procedimiento descrito por Maniatis *et al.* (1982). Uno de los dos cristales entre los que se vertió la solución de acrilamida se impregnó con dimetil-dicloro-silano al 2% en 1,1,1-tricloroetano, con el fin de poder desprender posteriormente el gel para su tinción y visualización.

2.17 Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

2.17.1 Extracción de fragmentos de ADN con membranas de DEAE celulosa.

Los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa de concentración adecuada al intervalo de tamaño de los fragmentos a extraer. Para una recuperación efectiva, se cargaron en geles de 1cm de espesor muestras conteniendo 3-5 μ g de ADN. Los fragmentos se separaron por electroforesis y se visualizaron como se indica en la sección correspondiente. Una vez identificado el fragmento de ADN que se quería extraer, se introdujo una membrana de DEAE celulosa NA-45 activada practicando un corte en el gel delante de la banda correspondiente al fragmento. El ADN se transfirió a la membrana por electroforesis.

Después de lavar la membrana en TE para eliminar los restos de agarosa, el ADN se recuperó incubando la membrana en 300 μ l de tampón de elución durante 2 horas a 68°C. Para comprobar si el ADN se había desprendido totalmente se utilizó luz ultravioleta de 254nm. Una vez que la membrana quedó libre de ADN, éste se precipitó con 750 μ l de etanol absoluto durante 5 horas a -20°C. El ADN se recuperó por centrifugación a 12300g durante 15 minutos. El sedimento se drenó y se secó al vacío, y finalmente el ADN se resuspendió en 10 μ l de TE.

Las membranas de DEAE celulosa NA-45 se activaron de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Secciones de membrana de 1cm² se incubaron en EDTA.Na₂ 10mM pH 7,6 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de varios lavados en agua destilada se incubaron en NaOH 0,5M durante 5 minutos a temperatura ambiente, volviéndose a lavar abundantemente con agua destilada. Las membranas así activadas se almacenaron en agua

destilada a 4°C.

El tampón de elución utilizado en el procedimiento descrito tiene la siguiente composición:

NaCl	1M
Tris-HCl pH 8,0	20mM
EDTA.Na ₂	0,1M

2.17.2 Extracción de fragmentos de ADN con "GeneClean".

Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis y se identificaron como en el caso de la extracción con membranas. Las secciones del gel de agarosa que contenían las bandas de ADN correspondientes al fragmento se cortaron y extrajeron del mismo. El ADN se recuperó utilizando el kit comercial "GeneClean" (BIO 101 Inc.) según las instrucciones indicadas por los fabricantes.

2.18 Ligación de ADN.

Los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción se mezclaron con vector linearizado en un sitio de restricción compatible para la ligación, en proporción vector/inserto de 1/3. La reacción se llevó a cabo en tampón de ligación en un volumen final de 20µl, con 1U de ADN-ligasa del fago T4. La mezcla de reacción se incubó durante 16 horas a 10°C para ligaciones de extremos romos, o a 15°C para extremos cohesivos.

El tampón de ligación utilizado se preparó 10 veces concentrado, y su composición es la siguiente:

-Tampón de ligación (10x):

Tris-HCl, 1M pH 7,2	0,66ml
EDTA.Na ₂ , 0,1M	0,1ml

MgCl ₂ , 1M	0,1ml
Ditiotreitol, 1M	0,1ml
ATP, 40mM	25μl

Se conservó a -20°C.

2.19 Deleciones con *Bal31*.

Las deleciones progresivas en el extremo 5' de Pu se llevaron a cabo en el plásmido pERD400, que contiene al promotor Pu en un fragmento *EcoRI-BamHI* de 0,3kb clonado entre los sitios *EcoRI-BamHI* de pTZ19 (Fig.10). Las deleciones con la exonucleasa *Bal31* se realizaron en las condiciones descritas por Maniatis *et al.* (1982).

8μg de una preparación de cloruro de cesio de pERD400 se linearizaron en el sitio de restricción único *EcoRI*. Tras eliminar la restrictasa por extracción con fenol-cloroformo, el ADN linearizado se precipitó con etanol y se resuspendió en 60μl de tampón de *Bal31*. A la mezcla de reacción se añadieron 2U de *Bal31* y se incubó a 30°C, retirándose cada 5 minutos una alícuota de 10μl a la que se añadía EGTA hasta alcanzar una concentración final de 0,2M para detener la reacción. La exonucleasa de cada alícuota se eliminó por extracción con fenol-cloroformo y el ADN de cada una se precipitó independientemente con etanol. Los plásmidos delecionados se resuspendieron en 10μl de tampón de Klenow y los extremos monocatenarios 5' generados en la digestión con *Bal31* se rellenaron con 1U del fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa de *E.coli* en volúmenes finales de 20μl con 0,25mM de cada desoxinucleótido. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eliminar el fragmento de Klenow por extracción con fenol-cloroformo y precipitación del ADN con etanol, los fragmentos delecionados se separaron del vector pTZ19 por restricción con *BamHI* y se subclonaron como fragmentos extremo romo-*BamHI* entre los sitios *SmaI-BamHI* de pMC1403. Los plásmidos ligados se transformaron en células competentes de *E.coli* 5K, y de entre los transformantes se seleccionaron los clones con las deleciones mediante análisis

de los plásmidos recombinantes. El alcance de las deleciones se estimó por electroforesis en gel de poliacrilamida 5% (p/v) de los fragmentos *EcoRI-BamHI*, que contenían al promotor Pu o sus formas delecionadas. El alcance de las deleciones se determinó con precisión por secuenciación de los fragmentos seleccionados.

Los tampones utilizados en este procedimiento tienen la siguiente composición:

-Tampón de *Bal31* (10x):

CaCl ₂	24mM
MgCl ₂	24mM
NaCl	400mM
Tris-HCl pH 8,0	40mM
EDTA.Na ₂	2mM

-Tampón de Klenow (10x):

Tris-HCl pH 8,0	100mM
Mg ₂ Cl	500mM

Ambos tampones se conservaron a -20°C.

2.20 Mutagénesis con sulfonato de etilmetano.

La mutagénesis con sulfonato de etilmetano se realizó en medio mínimo sólido suplementado con 1µg/ml de sulfonato de etilmetano comercial (SIGMA). Las placas de medio selectivo con el mutágeno se sembraron con un césped de células (aproximadamente 10⁸) a partir de las cuáles se querían obtener los mutantes y se incubaron a 30°C hasta que aparecieron colonias.

2.21 Mutagénesis dirigida con oligonucleótidos.

Se utilizó el método descrito por Kunkel *et al.* (1987), con algunas modificaciones.

2.21.1 Preparación de cadenas sencillas uridiladas.

Para preparar cadena sencilla de ADN se utilizaron alternativamente como vectores los plásmidos pERD450, un derivado Km^r de pGC2 (Fig. 12), o pTZ19 (Fig. 10), ya que ambos tienen el polilinquer en la orientación adecuada para la clonación del inserto que se deseaba mutagenizar. pERD450 tiene el origen de replicación del fago M13, y pTZ19 el del fago F1.

El enriquecimiento de la cadena sencilla en uracilos se realizó en la cepa de *E. coli* CJ236, un mutante *dut⁻ ung⁻* que presenta alta concentración celular de dUTP y que ha perdido la capacidad de eliminar los uracilos incorporados por error durante la replicación del ADN.

A 0,5ml de un cultivo en fase estacionaria de *E. coli* CJ236 portando el plásmido a mutagenizar se añadieron 25 μ l de una preparación de fago auxiliar M13K07 que contenía con 10¹¹ufp/ml. Tras incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la adsorción del fago a la superficie celular, la mezcla se transfirió a 25ml de 2xYT suplementado con 0,2% (p/v) de glucosa y los correspondientes antibióticos. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 16-24 horas con buena aireación. Las células se eliminaron por centrifugación a 12000g durante 30 minutos. A los sobrenadantes se añadieron 6ml de una solución de polietilenglicol 8000 al 20% (p/v) en NaCl 2,5M y se incubaron durante 30 minutos en hielo para precipitar los fagos. Estos se recuperaron por centrifugación a 1000g durante 30 minutos. El sedimento se secó al vacío y se resuspendió en 300 μ l de TE. Las células que pudieran quedar se eliminaron por centrifugación a 12300g durante 1 minuto. Los fagos se trataron con fenol-cloroformo para eliminar las envueltas proteicas, tal como se detalló en el procedimiento de las extracciones de plásmidos a pequeña escala, hasta obtener una interfase libre de proteínas. El ADN de cadena sencilla se recuperó por precipitación con 750 μ l de etanol absoluto a -20°C durante 16 horas y posterior centrifugación a 12300g durante 15 minutos, resuspendiéndose finalmente en 150 μ l de TE. La preparación de ADN de cadena sencilla se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa, usando como patrón ADN de cadena doble obtenido del cultivo inicial.

2.21.2 Preparación de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis se prepararon en un sintetizador de oligonucleótidos Beckman, en el laboratorio del Prof. Federico Garrido en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada. Los oligonucleótidos se extrajeron de la columna del sintetizador por elución con 0,5ml de NH_4OH 35% (v/v). Se realizaron tres lavados de la columna. El NH_4OH se eliminó del eluato por diálisis frente a agua destilada durante 4 horas. La concentración de los oligonucleótidos en la solución se estimó espectrofotométricamente, determinando la absorbancia de la solución a 260nm.

La fosforilación de los oligonucleótidos se llevó a cabo en tampón de quinasa. Cada reacción contenía 20ng de oligonucleótido, ATP 2,5mM y 1U de polinucleótido-quinasa del fago T4 en un volumen final de reacción de 20 μl . Después de 1 hora de incubación a 37°C la polinucleótido-quinasa se inactivó por calor a 65°C durante 10 minutos.

El tampón de fosforilación (10x) tiene la siguiente composición:

Tris-HCl pH 7,8	500mM
Ditiotreitol	50mM
MgCl ₂	100mM

Se conservó a -20C.

2.21.3 Hibridación y extensión.

Los oligonucleótidos fosforilados se utilizaron como cebadores en las reacciones de extensión. Las reacciones de hibridación se llevaron a cabo en tampón de hibridación SCC. A cada mezcla de reacción de fosforilación se añadió 1 μg de ADN de cadena sencilla y 1,3 μl de tampón SCC por cada μl de solución de ADN. La mezcla se incubó 5 minutos a 70°C y se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

La extensión se realizó en tampón de polimerasa. Cada mezcla de reacción

contenía 0,5mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos, 1mM de ATP pH 7,0, 2,5U de ADN-polimerasa del fago T4 y 2U de ADN-ligasa del fago T4 en volúmenes finales de 100 μ l. La reacción se incubó 5 minutos en hielo, 5 minutos a temperatura ambiente, y 2 horas a 37°C. La reacción se detuvo adicionando EDTA.Na₂ hasta una concentración 15mM.

La extensión se comprobó por electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v), preparada en tampón TBE con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio para separar topoisómeros, utilizando como control ADN de cadena sencilla (Fig. 13).

La mitad de cada extensión positiva se transformó en cepas de *E.coli dut*⁺ *ung*⁺, que eliminan los uracilos de las cadenas y mantienen la mutación introducida. Los transformantes se analizaron mediante preparaciones de plásmidos a pequeña escala y los clones mutantes se identificaron por secuenciación. En los casos en que la nueva mutación eliminaba o introducía una secuencia reconocida por algún enzima de restricción, los plásmidos mutantes se seleccionaron respectivamente por resistencia a la digestión o por digestión con las restrictasas correspondientes.

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

-Tampón de hibridación SCC (20x):

NaCl	3M
Citrato sódico	300mM

Se conservó a 4°C.

-Tampón de extensión (10x):

Hepes pH 7,8	200mM
Ditiotreitol	20mM
MgCl ₂	100mM

Se conservó a -20°C.

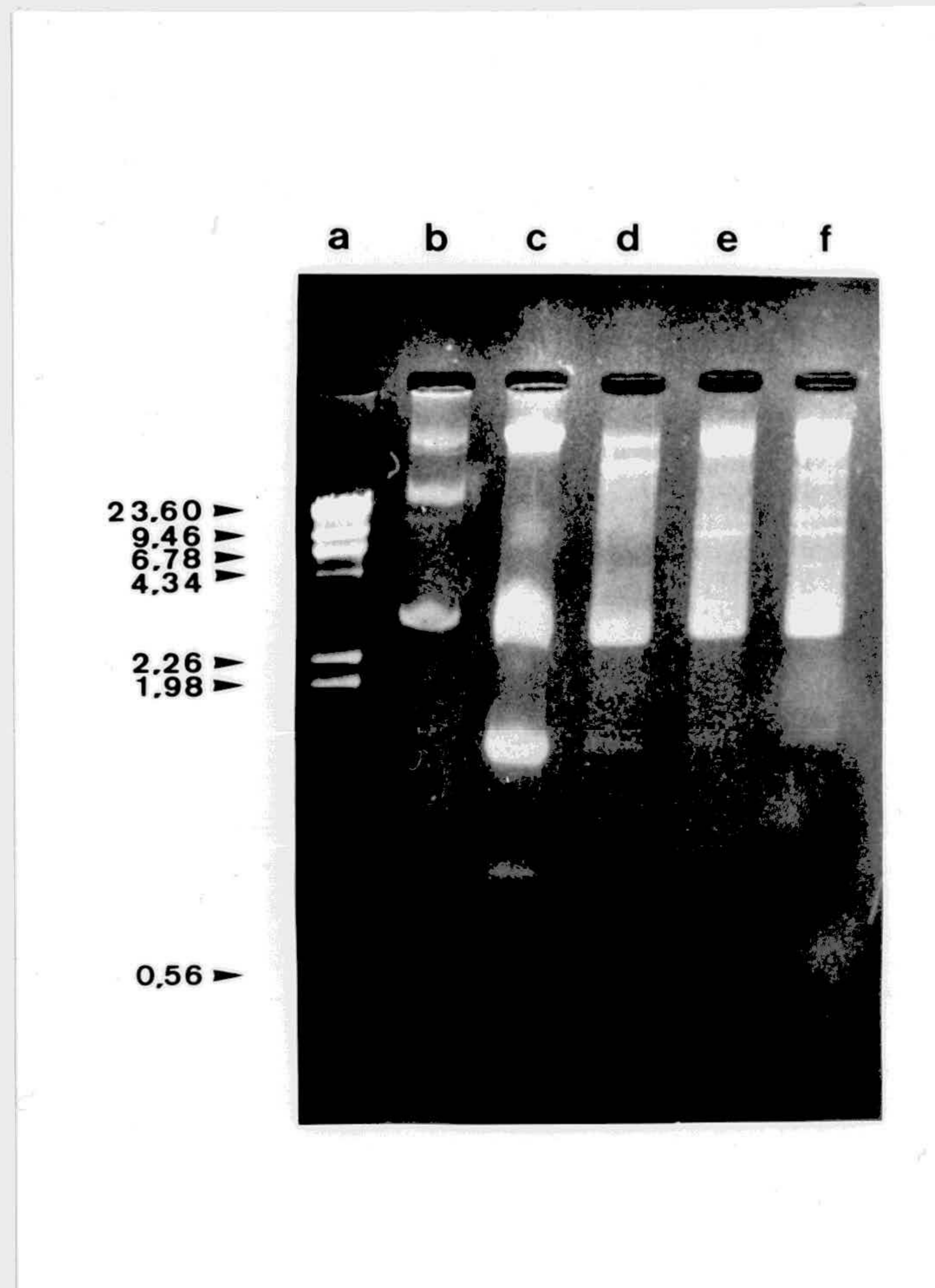


Figura 13: Electroforesis de la extensión de los oligonucleótidos 10, 11 y 12. $1\mu\text{g}$ de ADN de cadena sencilla de pERD406 se hibridó con 20ng de cada oligonucleótido fosforilado. La extensión se realizó en tampón de polimerasa con los cuatro desoxinucleótidos y ATP, en presencia de ADN-polimerasa y ADN-ligasa del fago T4. Una vez transcurrida la reacción se cargaron en un gel de agarosa $0,8\%$ (p/v), preparada en TBE con $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio. (a) $0,25\mu\text{g}$ de ADN del fago λ digerido con *Hind*III; los fragmentos de ADN están señalados por flechas y su tamaño se expresa en kb; (b) $0,25\mu\text{g}$ de pERD406 de cadena doble; (c) $0,25\mu\text{g}$ de pERD406 de cadena sencilla; (d, e, f) $0,25\mu\text{g}$ de ADN de cada una de las reacciones de extensión.

2.22 Secuenciación de ADN en plásmidos.

La secuenciación de ADN se llevó a cabo por el método de terminación de la extensión de la cadena por didesoxinucleótidos descrito por Sanger *et al.* (1977), y modificado por Hattori y Sakaki (1986).

La secuenciación se realizó a partir de ADN de cadena doble. Los fragmentos a secuenciar se clonaron en pTZ19 en la orientación adecuada, y los plásmidos recombinantes se prepararon en gran escala y se purificaron en gradiente de cloruro de cesio. El ADN se resuspendió en 400 μ l de TE y el ARN se eliminó por digestión con 8 μ l de ARN-asa libre de ADN-asa durante 1 hora a 37°C. La ARN-asa se eliminó por extracción con fenol-cloroformo, y el ADN se recuperó por precipitación con etanol, tal como se describe en el método de preparación de plásmidos por desnaturalización alcalina. El ADN se resuspendió en TE para alcanzar una concentración final de 0,1 μ g/ μ l.

2.22.1 Preparación de cadenas sencillas.

Para la obtención de cadenas sencillas se empleó el método de desnaturalización alcalina. Se tomaron 18 μ l de la solución de ADN (aproximadamente 2 μ g) a los que se añadieron 2 μ l de una solución fresca de NaOH 2N. Después de 5 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se neutralizó añadiendo 2 μ l de acetato amónico 2M, pH 4,5. El ADN desnaturalizado se precipitó con 75 μ l de etanol absoluto a -70°C durante 15 minutos, y se recuperó por centrifugación a 12300g durante 10 minutos. El precipitado se drenó, se secó al vacío, y finalmente se resuspendió en 8 μ l de agua bidestilada.

La preparación de ARN-asa libre de ADN-asa contenía 10mg/ml de ARN-asa A en Tris-HCl 10mM, pH 7,5, NaCl 1M. La preparación se calentó a 95°C durante 15 minutos para eliminar la ADN-asa, se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se conservó en alícuotas de 1ml a -20°C.

2.22.2 Hibridación y extensión.

Cada preparación de cadena sencilla se hibridó con 2ng de cebador universal para secuenciación en tampón de Klenow en volúmenes finales de 10 μ l. Las mezclas de hibridación se incubaron a 60°C durante 20 minutos y después se dejaron enfriar lentamente a temperatura ambiente.

La extensión se realizó en el mismo tampón de Klenow que la hibridación. A cada mezcla de hibridación se añadieron 1 μ l de ³⁵S-dATP (desoxiadenosina 5'-(α -³⁵S)tiotriofato, sal trietilamónica, 10,0mCi/ml), y 0,5U del fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa de *E.coli*, que se mezclaron por centrifugación 5 segundos a 12300g. De estas soluciones de extensión se tomaron alícuotas de 3 μ l a las que se añadieron 2 μ l de cada una de las cuatro mezclas de didesoxinucleótidos. Las reacciones de extensión se incubaron a 42°C durante 20 minutos. Para evitar las terminaciones inespecíficas, a cada reacción se añadió 1 μ l de una mezcla de desoxinucleótidos 2mM (0,5mM de cada uno), y volvieron a incubarse a 42°C durante 20 minutos.

El tampón de Klenow utilizado en este procedimiento es el mismo que se usó para rellenar los extremos resultantes de la digestión con Bal31.

Las mezclas de didesoxinucleótidos tienen la siguiente composición:

Mezcla	ddA:	ddC:	ddG:	ddT:
dCTP	62,5 μ M	4 μ M	80 μ M	80 μ M
dGTP	62,5 μ M	80 μ M	4 μ M	80 μ M
dTTP	62,5 μ M	80 μ M	80 μ M	4 μ M
ddATP	30 μ M	-	-	-
ddCTP	-	10 μ M	-	-
ddGTP	-	-	25 μ M	-
ddTTP	-	-	-	25 μ M

Las soluciones se conservaron a -20°C.

2.22.3 Separación de cadenas extendidas por electroforesis.

Las cadenas sencillas con distinta extensión se separaron por electroforesis a intensidad fija de 31mA y voltaje variable de 1500-2500V, en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6% (p/v) en TBE, de 40cm de longitud. A cada reacción de extensión se añadieron 4 μ l de tampón indicador de carga y se calentaron a 95°C durante 3 minutos para separar totalmente las cadenas. De cada reacción se cargaron muestras de 3 μ l.

La separación electroforética se visualizó en autorradiografías. Para evitar la difusión de las bandas de ADN durante la exposición se realizó una fijación de las mismas rociando el gel adherido a uno de los cristales con ácido acético 10% (v/v). El gel se transfirió por adherencia a un papel de filtro Whatman AM3, y después de eliminar el exceso de urea con agua destilada, se cubrió con plástico transparente y se secó al vacío en un secador de geles BIO-RAD. El gel se autorradiografió en una película Amersham Hyperfilm-MP durante 36 horas a temperatura ambiente, que posteriormente se reveló utilizando revelador P-121 para positivos y fijador N-FIX172 de Negra. La electroforesis en geles de 40cm permitía leer secuencias de 200 a 300 pares de bases.

La composición de las soluciones utilizadas es la siguiente:

-Acrilamida desnaturizante 6% (p/v):

Acrilamida 40% (p/v)	9ml
Urea	25,2g
TBE(x10)	6ml
H ₂ O hasta	60ml

La preparación de la solución de acrilamida 40% (p/v) es la ya descrita en la sección 2.16 para geles de poliacrilamida 5% (p/v). Para catalizar la polimerización de la acrilamida se añadieron a la solución anterior, inmediatamente antes de verter el gel, 0,3ml de persulfato amónico 10% (p/v) y 50 μ l de TEMED. El montaje de los geles se realizó del mismo

modo descrito para los geles de poliacrilamida 5% (p/v) en la sección 2.16.

-Tampón indicador de carga:

Xilanilcianol	0,1g
Azul de bromofenol	0,1g
EDTA.Na ₂ 0,5M	4ml
Formamida desionizada	100ml

La formamida se desionizó con 5g de amberlita durante 30 minutos en agitación. La amberlita se retiró por filtración a través de papel de filtro Whatman AM3. El tampón de carga se conservó a 4°C.

2.23 Ensayo de improntas *in vivo*.

Los ensayos de improntas *in vivo* se realizaron en fusiones transcripcionales del promotor Pu al gen *lacZ* en el plásmido pRD579 (Fig. 14), con *xylR* en *trans* en el plásmido pTS174 (Fig. 15), según el método descrito por Morett y Buck (1989).

2.23.1 Metilación de ADN.

La metilación *in vivo* se realizó en cultivos de *E.coli* 5K (pRD579) y *E.coli* 5K (pRD579, pTS174) incubados a 30°C durante 4 horas en 100ml de LB, en presencia y en ausencia del alcohol *m*-metilbencílico 5mM como efector de XylR. A los cultivos se añadieron 100µl de una solución fresca de dimetilsulfato (DMS) al 2% (v/v) en solución salina y se incubaron a 30°C durante 2 minutos. Las células se recogieron por filtración a través de filtros estériles de 0,45µm de diámetro de poro, y se lavaron dos veces con 150ml de solución salina. Las células se desprendieron de los filtros por agitación fuerte en 15ml de solución salina, y los plásmidos se extrajeron por el método de preparación rápida a gran escala ya descrito. Después de eliminar el ARN por digestión con ARN-asa como se describe en el método de secuenciación, el ADN se resuspendió en 20µl de agua bidestilada.

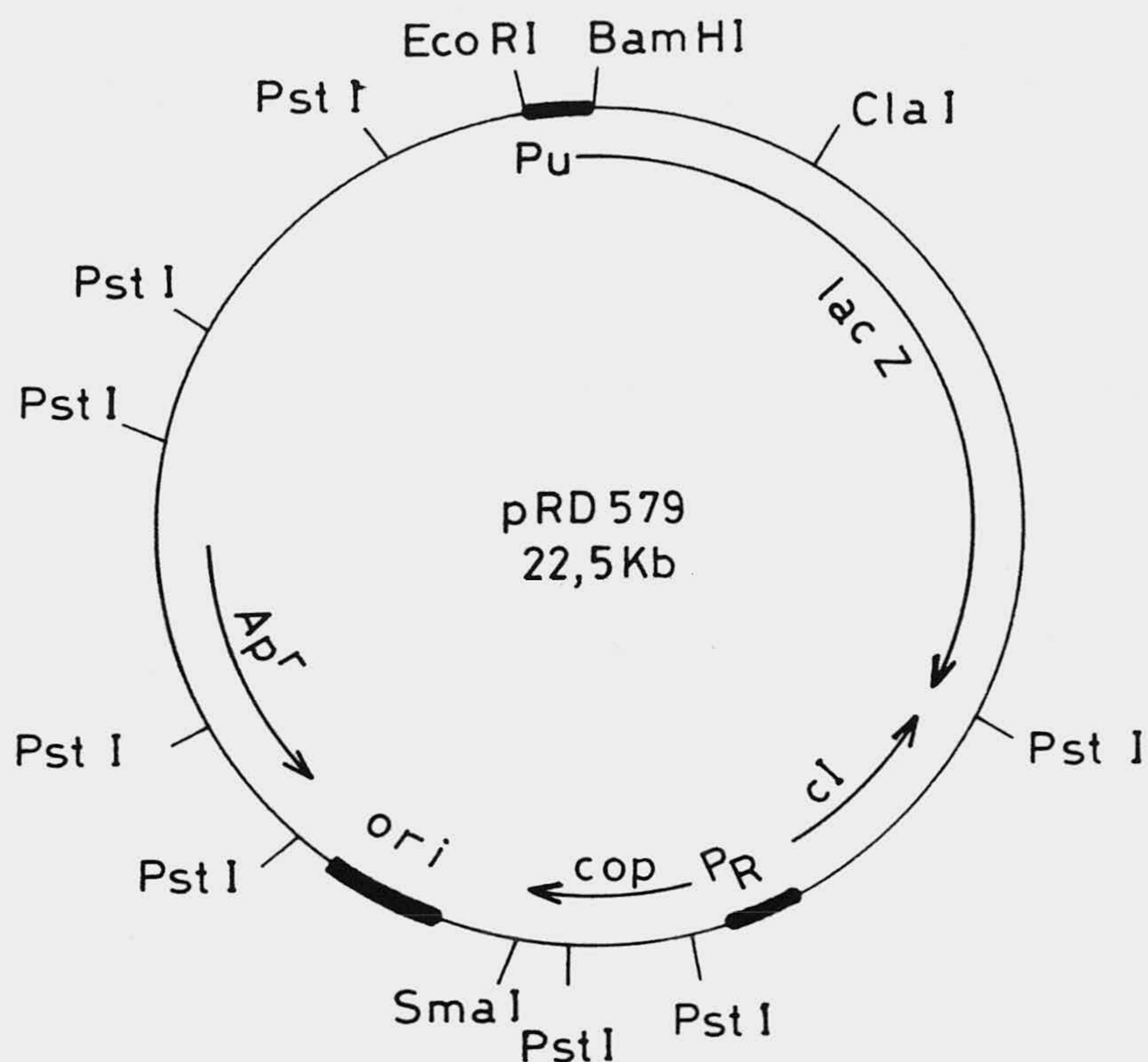


Figura 14: Representación del plásmido pRD579. Los detalles de su construcción los describió Dixon (1986). pRD579 contiene una fusión transcripcional del promotor Pu, clonado como un fragmento *Eco*RI-*Bam*HI de pRD578 (Dixon, 1986) frente al gen *lacZ* del vector de clonaje pJEL126 (Løve-Larsen *et al.*, 1984), derivado del plásmido de bajo número de copia R1. La inserción de *cI*₈₅₇ y del promotor *P_R* del fago λ frente a la región *cop* de R1 permite que a 37°C se incremente el número de copia por cromosoma por inactivación térmica de *cI*₈₅₇.

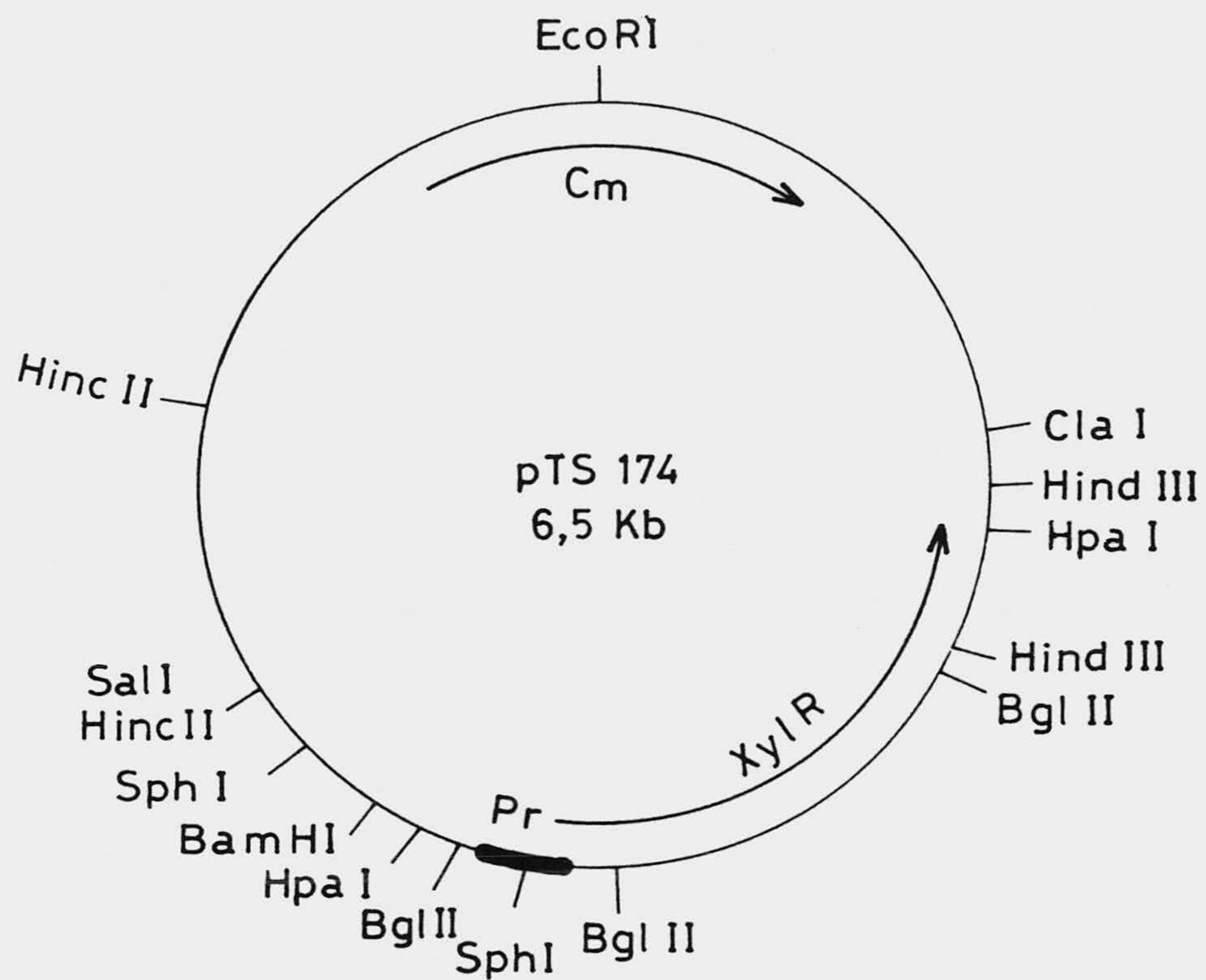


Figura 15: Representación del plásmido pTS174. El plásmido contiene el gen *xylR* bajo el control de sus propios promotores (Pr_1 y Pr_2), en un fragmento *HpaI* de 2,5kb del plásmido TOL. La construcción detallada del plásmido la describieron Inouye *et al.*, (1983).

La metilación *in vitro* de Pu se realizó también en el plásmido pRD579. A una mezcla de reacción que contenía 25 μ g de plásmido en 200 μ l de cacodilato sódico 50mM se añadió 1 μ l de DMS. Después de 2 minutos a 20°C la reacción se detuvo con 50 μ l de solución de parada. El ADN se recuperó por precipitación con etanol y se resuspendió en 100 μ l de agua bidestilada.

El ADN metilado tanto *in vivo* como *in vitro* se cortó al azar en las guaninas metiladas con piperidina a concentración final 1M, incubándose las reacciones a 90°C durante 30 minutos. La piperidina se eliminó por precipitación con etanol. El ADN metilado *in vivo* se resuspendió en 32 μ l de agua bidestilada, y el metilado *in vitro*, en 100 μ l.

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

-Solución salina:

NaCl	8,5g
K ₂ HPO ₄	7g
KH ₂ PO ₄	3g
H ₂ O hasta	1l

El pH se llevó a 7,2 y la solución se esterilizó en autoclave. Se conservó a temperatura ambiente.

-Solución de parada DMS:

Acetato sódico pH 7,0	1,5M
β -mercaptoetanol	1M

Se conservó a temperatura ambiente.

2.23.2 Marcaje de oligonucleótidos con γ - ^{32}P -ATP.

Como cebadores para la extensión de las cadenas metiladas y cortadas con piperidina se utilizaron dos oligonucleótidos de síntesis cuyas secuencias son 5'-CAG-AGTTGAGAAAATACAAC-3' para la cadena superior y 5'-CCAGCGTCACAG-ACTCCAG-3' para la cadena inferior. Estos se obtuvieron en un sintetizador de oligonucleótidos Applied Biosystems modelo 381A, en el laboratorio del Dr. Martin Buck, en la Universidad de Sussex (Brighton), y se purificaron del mismo modo que los oligonucleótidos usados para la mutagénesis dirigida.

Los oligonucleótidos se marcaron radiactivamente por fosforilación en su extremo 5' con ^{32}P . Cada reacción contenía 5pmol de oligonucleótido, 1 μl de ^{32}P -ATP (adenosina 5'-(γ - ^{32}P)trifosfato, sal tetra (trietil amónica), 10,0mCi/ml), y 0,5U de polinucleótido-quinasa del fago T4 en un volumen final de 10 μl de tampón de quinasa. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 30 minutos. La polinucleótido-quinasa se inactivó por calor, incubando las reacciones a 70°C durante 10 minutos.

El tampón de quinasa (10 \times) utilizado tiene la misma composición que el empleado en la fosforilación de oligonucleótidos para mutagénesis.

2.23.3 Hibridación y extensión.

Para la hibridación de los oligonucleótidos marcados con las cadenas de ADN metiladas y cortadas con piperidina se mezcló 0,1pmol del oligonucleótido marcado con ^{32}P con aproximadamente 1 μg de ADN, en un volumen final de 10 μl de tampón de hibridación. Las mezclas se incubaron a 95°C durante 3 minutos y se dejaron enfriar en hielo durante 30 minutos.

Las reacciones de extensión se llevaron a cabo en el mismo tampón de hibridación. A cada reacción de hibridación se añadieron 2 μl de una mezcla 2mM de los cuatro desoxinucleótidos (0,5mM de cada uno) y 1U del fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa de *E.coli* en tampón de hibridación. Las extensiones se incubaron a 42°C durante 20 minutos, y la reacción se detuvo añadiendo 2 μl de

tampón indicador de carga. Las cadenas sencillas con distinta extensión se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante, en las mismas condiciones que se han descrito para la secuenciación.

La separación electroforética de las cadenas de ADN cortadas en las guaninas metiladas se visualizó por autorradiografías. Las películas (Hyperfilm-MP de Amersham) se expusieron directamente sobre los geles aún adheridos a uno de los soportes de cristal, cubiertos por un papel de plástico. No fué necesaria la fijación de las bandas, ya que la exposición se llevó a cabo a -70°C durante 16-24 horas.

La intensidad de las bandas de ADN se cuantificó por densitometría de las autorradiografías en un densitómetro LKB Ultrascan modelo XL. La protección de las guaninas se estimó como el logaritmo de la relación entre las áreas densitométricas de las bandas en ausencia y presencia de XylR, indicando los valores positivos protección de las guaninas por XylR, y los valores negativos hipermetilación de las guaninas en presencia de XylR.

El tampón indicador de carga, así como la solución de acrilamida empleadas en este procedimiento son las mismas que se utilizaron para la secuenciación.

El tampón de hibridación ($10\times$) tiene la siguiente composición:

Tris-HCl pH 8,0	100mM
MgCl ₂	100mM

Se conservó a temperatura ambiente.

2.24 Ensayo de actividad β -galactosidasa.

La medida de actividad β -galactosidasa se realizó en células permeabilizadas, según el método descrito por Miller (1972).

Cultivos de las células correspondientes preincubados durante 16 horas a 30°C en agitación se diluyeron 100 veces en LB suplementado con los antibióticos adecuados.

En los ensayos de inducción, los compuestos aromáticos se suministraron al medio de cultivo en fase gaseosa, introduciendo varillas huecas de vidrio con 200 μ l del compuesto aromático en matraces de cultivo Erlenmeyer sellados con parafina; los derivados de alcohol bencílico y benzaldehído se suministraron en solución en el medio de cultivo a las concentraciones indicadas en cada caso. Después de 6 horas de incubación a 30°C en agitación se tomaron alícuotas de los cultivos de 0,5ml, a las que se añadieron 0,5ml de solución fresca de bromuro de alquiltrimetilamonio (MATAB) para permeabilizar las células. La máxima permeabilización de las células se alcanzó después de 20 minutos de incubación en hielo. La concentración celular de los cultivos se estimó por su turbidez a 660nm.

La determinación de actividad β -galactosidasa se realizó a 30°C en tampón Z. A tubos de ensayo conteniendo 0,8ml de tampón Z y 0,1 ml de células permeabilizadas se añadieron 0,2ml de *o*-nitrofenil-D-piranósido de galactosa (ONPG), sustrato de la β -galactosidasa. Los tubos de reacción se incubaron durante 2,5 minutos a 30°C. La reacción se detuvo añadiendo 2ml de una solución de Na₂CO₃ 0,5M. La concentración del producto de hidrólisis del ONPG, el *o*-nitrofenol, se estimó espectrofotométricamente determinando la absorbancia a 420nm. Para cada muestra se realizó a su vez una corrección de turbidez a 550nm.

Las unidades de actividad β -galactosidasa (unidades de Miller) se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación (Miller, 1972):

$$U(\beta - \text{gal}) = \frac{DO_{420} - 1,7 \cdot DO_{550}}{t \cdot v \cdot DO_{660}} \times 1000$$

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

Los reactivos y tampones usados en este ensayo tienen la siguiente composición:

-Solución de bromuro de alquiltrimetilamonio (MATAB):

MATAB 20mg

Tris-HCl 0,2M pH 8,010ml

La solución se prepara antes de su utilización.

-Tampón Z:

Na₂HPO₄60mM
 NaH₂PO₄40mM
 KCl10mM
 MgSO₄1mM
 β-mercaptoetanol50mM

La solución es estable a 4°C.

-Solución de ONPG:

ONPG40mg
 Na₂HPO₄ 100mM pH 7,010ml

La solución es estable a 4°C en oscuridad.

2.25 Medida de actividad tolueno monooxigenasa *in vivo*.

2.25.1 Método polarográfico.

La actividad tolueno monooxigenasa (TO) en cepas de *P.putida* portadoras del plásmido TOL o sus mutantes se determinó estimando el consumo de oxígeno dependiente de hidrocarburos por células enteras.

Células de *P.putida* portadoras de plásmidos TOL se cultivaron a 30°C en volúmenes de 50ml de medio de cultivo mínimo con *m*-xileno como fuente de carbono e inductor de la ruta "upper". El hidrocarburo se suministró en fase gaseosa

como se indica en la sección anterior. Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento (turbidez a 660nm 0,6-0,7) las células se recogieron por centrifugación a 4000g durante 5 minutos, se lavaron dos veces en medio mínimo sin fuente de carbono, y finalmente, se resuspendieron en el mismo medio hasta alcanzar una turbidez a 660nm de 0,45-0,5. Alícuotas de 2ml se depositaron en la cámara de un electrodo de oxígeno (Hansatech) a 30°C, y se determinó el consumo basal de oxígeno debido a respiración endógena. Los sustratos de la TO, tolueno y sus derivados, se inyectaron en la cámara del electrodo en solución en N,N'-dimetilformamida para que su concentración final fuese 0,5mM. La actividad TO se estimó como el incremento de consumo de oxígeno sobre el consumo basal por respiración. La actividad TO se expresó en nmoles de oxígeno consumidos por minuto y unidad de DO₆₆₀. Aunque clásicamente se han tomado estos valores como actividad TO (Franklin *et al.*, 1981; Harayama *et al.* 1989; Kunz y Chapman, 1981; Worsey y Williams, 1975), es de interés señalar que esta medida sobreestima la actividad TO, ya que el consumo de oxígeno no sólo se debe a la oxidación de los hidrocarburos a sus correspondientes alcoholes bencílicos, sino también al metabolismo del esqueleto carbonado de éstos últimos.

2.25.2 Producción de alcoholes bencílicos a partir de toluenos.

La actividad TO en células de *E.coli* JM101 con los genes *xylMA* clonados bajo el control del promotor de *lac* en el plásmido pWA21, se estimó en base a la velocidad de producción de alcoholes bencílicos a partir de tolueno y derivados sustituidos.

50ml de medio de cultivo mínimo con 0,4% (p/v) de glucosa como fuente de carbono se inocularon con 0,5ml de un cultivo de *E.coli* JM101 (pWA21), preincubado en LB durante 24 horas a 30°C en agitación. Para inducir la TO se añadió isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) para alcanzar una concentración final de 100 μ M. Simultáneamente se añadieron los sustratos de la TO, que se suministraron al medio de cultivo en fase gaseosa tal como se indicó en la sección anterior. Las células se cultivaron durante 16 horas a 30°C en agitación.

Los alcoholes bencílicos que se habían excretado al medio de cultivo se extrajeron con 2 volúmenes de éter etílico. Los extractos se secaron con MgSO₄ anhidro y se

concentraron por evaporación en un rotavapor. El precipitado se disolvió en agua, y la concentración de los alcoholes bencílicos en cada muestra se determinó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (modelo 5730) dotado de un detector de ionización de llama a 300°C, y equipado con una columna Chromasorb-W-AW-OMCS 100/200mesh. La temperatura del horno fué 20°C superior al punto de ebullición de los alcoholes determinados. Como patrones se utilizaron soluciones de concentración conocida de alcoholes bencílicos comerciales.

2.26 Preparación de extractos libres de células.

Volúmenes de 50ml de medio de cultivo mínimo con *p*-xileno o *m*-xileno en fase gaseosa como fuente de carbono e inductor de la ruta "upper", se inocularon con 0,5ml de cultivos de las cepas adecuadas de *P.putida* preincubados en LB a 30°C durante 16 horas en agitación. Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento (turbidez a 660nm 0,6-0,7), las células se recogieron por centrifugación a 4000g durante 5 minutos, se lavaron una vez en Na₂HPO₄ 100mM, pH 7,0 y se resuspendieron en 3ml del mismo tampón. La suspensión se lisó en frío por ultrasonidos en un sonicador Braun Biotec modelo Labsonic 2000, con una sonda tipo aguja. Se dieron pulsos de 1 minuto a 50W, a intervalos de 2 minutos para evitar el calentamiento de la muestra, hasta que se obtuvo un extracto transparente. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación en tubos de centrífuga a 12300g durante 1 minuto.

2.27 Determinación de proteínas en extractos libres de células.

La concentración de proteínas en extractos libres de células se determinó por interpolación gráfica, según el método de Bradford (1976).

Se prepararon diluciones adecuadas de las muestras a ensayar en el mismo tampón en que se encontraba el extracto. A partir de una solución patrón de albúmina bovina con 1,5mg/ml en el mismo tampón, se prepararon diluciones con

0, 150, 375, 750, 1125 y 1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína en tampón de muestra. A cada tubo se añadieron 5ml de solución de azul de Coomassie. Después de agitar por inversión, los tubos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrida la reacción, se midió la absorbancia a 595nm de cada muestra y de las diluciones patrón. La concentración de proteínas en las muestras se calculó por interpolación en curvas de DO_{595} frente a las concentraciones de la proteína patrón.

La solución de azul de Coomassie tiene la siguiente composición:

Azul de Coomassie G-250	100mg
Etanol 95%(v/v)	50ml
Acido fosfórico 85%(v/v)	100ml
H ₂ O hasta	1l

La solución se filtró a través de papel, y se conservó a -20°C .

2.28 Medida de las actividades alcohol bencílico deshidrogenasa y benzaldehido deshidrogenasa codificadas por el plásmido TOL.

La actividad alcohol bencílico deshidrogenasa (BADH) y benzaldehido deshidrogenasa (BZDH) en cepas de *P.putida* se determinó en extractos libres de células, según el método descrito por Worsey y Williams (1975).

Los extractos libres de células se obtuvieron por sonicación, según se indica en la sección correspondiente.

Las actividades BADH y BZDH se midieron espectrofotométricamente siguiendo a 340nm la reducción de NAD^+ a NADH. La actividad BADH se determinó en tampón glicina 66mM, pH 9,4. La mezcla de reacción contenía además 2,5mM de NAD^+ , 2,5mM del alcohol bencílico ensayado como sustrato y 10-100 μl del extracto libre de células en un volumen final de reacción de 3ml.

La actividad BZDH se determinó en Tris-HCl 66mM, pH 8,0. Cada mezcla de reacción contenía además 2,5mM de NAD⁺, 0,4mM del benzaldehído ensayado como sustrato y 10-100 μ l de extracto libre de células en un volumen final de 3ml.

La actividad enzimática se expresó en mU por mg de proteína. Una unidad (U) de actividad BADH y BZDH corresponde a la reducción de 1 μ mol de NAD⁺ a NADH por minuto en las condiciones del ensayo estándar. Para calcular la concentración de NADH se usó el coeficiente de extinción a 340nm, $\epsilon(340) = 6,11\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.29 Medida de actividad catecol 2,3-dioxigenasa codificada por el plásmido TOL.

La actividad catecol 2,3-dioxigenasa (C 2,3-O) se determinó espectrofotométricamente en extractos celulares de cepas de *P.putida* portadoras de plásmidos TOL, según el método descrito por Sala-Trepat y Evans (1971).

Para estabilizar el enzima, los extractos libres de células se prepararon en tampón Na₂HPO₄ 100mM, pH 7,0 suplementado con 10% (v/v) de acetona, y se obtuvieron por sonicación.

La actividad C 2,3-O se midió colorimétricamente siguiendo la aparición del semialdehído del ácido mucónico resultante de la fisión del anillo aromático del catecol. La mezcla de reacción contenía Na₂HPO₄ 100mM, pH 7,0, catecol 10mM y 10-100 μ l de extracto celular en un volumen final de 3ml.

La actividad enzimática se expresó en mU por mg de proteína, correspondiendo una unidad (U) de actividad C 2,3-O a la producción de 1 μ mol de semialdehído del ácido mucónico por minuto en las condiciones del ensayo estándar. La concentración del semialdehído del ácido mucónico se estimó utilizando el coeficiente de extinción a 375nm $\epsilon(375) = 33\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Capítulo 3

Resultados

3.1 Expansión de la ruta "upper" codificada por el plásmido TOL de *Pseudomonas putida* para la degradación de derivados recalcitrantes de tolueno

La evolución en el laboratorio de rutas catabólicas para la expansión del espectro de sustratos que se degradan a través de las mismas implica el reclutamiento de actividades enzimáticas de otras rutas o la adquisición de nuevas especificidades por parte de los enzimas y, en su caso, por parte de las proteínas reguladoras de la síntesis o activación de la ruta. La manipulación genética de cualquier ruta catabólica requiere, por tanto, conocer los perfiles de efectores de las proteínas reguladoras, así como el perfil de sustratos de las proteínas enzimáticas para localizar los puntos que bloquean el metabolismo de ciertos compuestos recalcitrantes. Esto debe permitir diseñar la estrategia genética más apropiada para salvar dichos puntos de bloqueo.

El objetivo de esta sección del trabajo ha sido la localización de los puntos que bloquean el metabolismo de ciertos alquiltoluenos y clorotoluenos a través de la ruta "upper" del plásmido TOL de *Pseudomonas putida*. Para ello se ha analizado el perfil de efectores del regulador XylR y el perfil de sustrato de los enzimas implicados

en la oxidación secuencial de la cadena lateral de los toluenos hasta sus ácidos carboxílicos correspondientes. A su vez esta información se utilizó para diseñar las estrategias genéticas que permitieran la expansión de las rutas catabólicas de TOL o rutas catabólicas de bacterias del género *Pseudomonas*.

3.1.1 Análisis del espectro de efectores de XylR.

Dentro del análisis del sistema de regulación de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0 se realizó una primera aproximación experimental analizando el perfil de efectores del regulador último de las rutas, la proteína XylR.

Para el diseño de los experimentos de análisis se estableció previamente la cinética de inducción de las rutas, así como la validez experimental de la utilización de fusiones transcripcionales de los promotores de las rutas al gen *lacZ* de *E.coli* desprovisto de su promotor natural.

3.1.1.1 Cinéticas de inducción de las rutas "upper" y meta codificadas por el plásmido TOL pWW0 de *P.putida*.

P.putida 2440 (pWW0) presenta bajos niveles de los enzimas de las rutas "upper" y meta cuando crece en presencia de azúcares o ácidos dicarboxílicos como fuente de carbono; la presencia de tolueno o *m*-xileno induce la síntesis coordinada de los enzimas de ambas rutas catabólicas (Ramos *et al.*, 1987a; Worsey *et al.*, 1978).

Con objeto de estudiar las cinéticas de inducción de los enzimas de ambas rutas en respuesta a la adición de inductores, se analizaron los niveles de alcohol bencílico deshidrogenasa (BADH), un enzima de la ruta "upper", y catecol 2,3-dioxigenasa (C 2,3-O), un enzima de la ruta meta en cultivos de *P.putida* 2440 (pWW0) a distintos tiempos tras la adición de *m*-xileno a células creciendo en medio de cultivo mínimo suplementado con ácido acético como fuente de carbono (Fig. 16). Como testigos se utilizaron cultivos de la misma cepa a los que no se adicionaron inductores, y en los que se midieron las mismas actividades (Fig. 16).

La inducción de los enzimas de ambas rutas fué relativamente lenta, alcanzándose los niveles máximos de actividad de ambos enzimas después de 6 horas de incubación

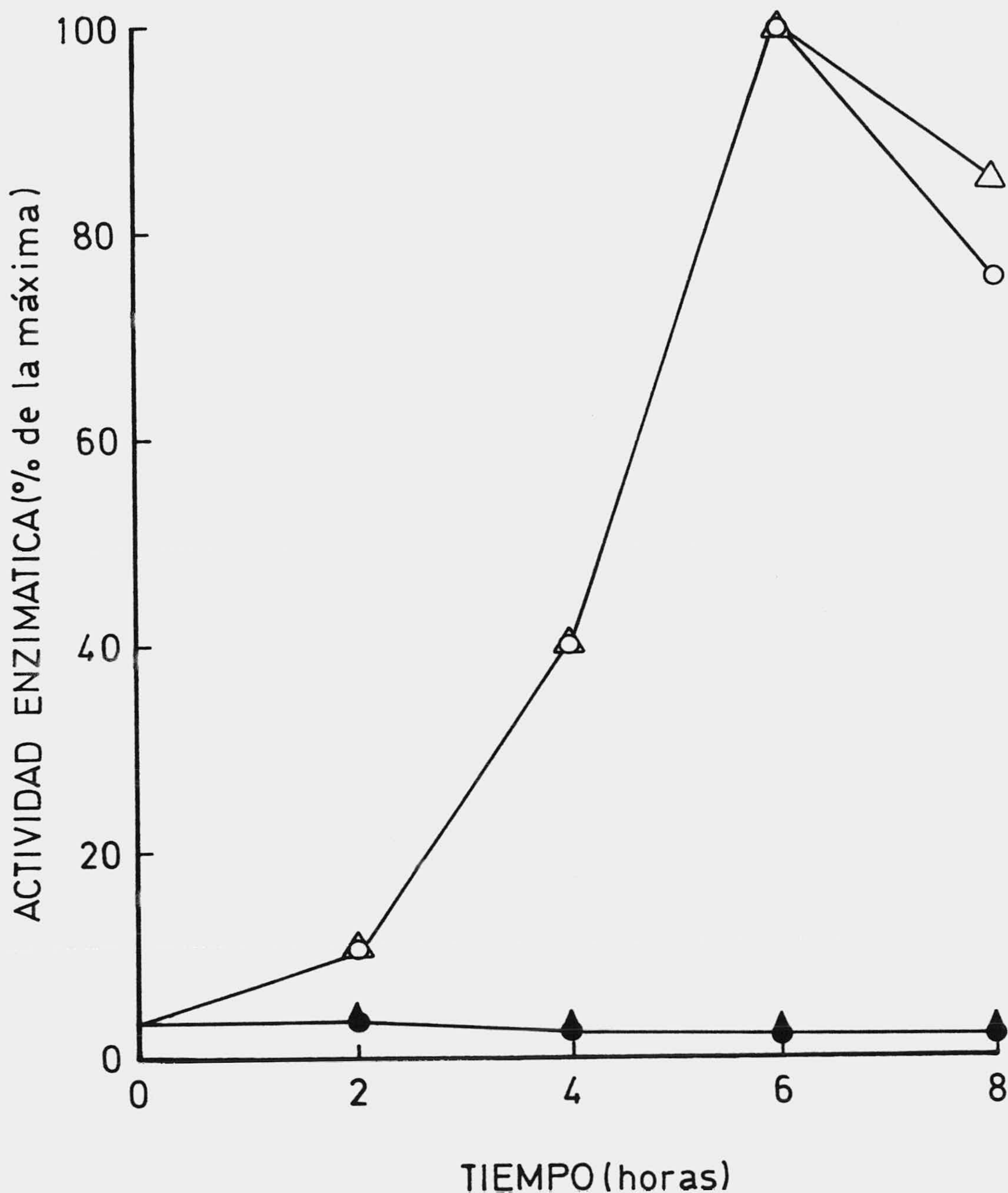


Figura 16: Inducción coordinada de actividad BADH (ruta "upper") y C 2,3-O (ruta meta) por *m*-xileno. Células de *P.putida* 2440 (pWW0) se cultivaron en 250ml de medio de cultivo mínimo con 10mM de ácido acético como fuente de carbono en presencia (\circ y \triangle) o ausencia (\bullet y \blacktriangle) de *m*-xileno. A los tiempos indicados se determinó la actividad BADH (\circ y \bullet) y C 2,3-O (\triangle y \blacktriangle) en extractos libres de células preparados a partir de 50ml de cultivo. El 100% de actividad fué 1,4U para la BADH y 1000U para la C 2,3-O.

en presencia de *m*-xileno. En los cultivos testigo los niveles de actividad BADH y C 2,3-O se mantuvieron uniformemente bajos. El nivel máximo de actividad BADH fué de 1,4U, mientras que el nivel máximo de actividad C 2,3-O fué de 1000U. Después de 6 horas de inducción se observó un ligero descenso de los niveles de actividad de ambas enzimas. La actividad BADH disminuía más rápidamente, alcanzando a las 8 horas de inducción un 75% de la máxima actividad, mientras que los niveles de actividad C 2,3-O aún alcanzaban un 85% de la máxima.

3.1.1.2 Cinéticas de inducción de los promotores Pu y Pm en fusiones transcripcionales.

Para estudiar si las cinéticas de inducción de las rutas recogidas en la sección anterior reflejaban la transcripción de los promotores de las mismas, se realizaron fusiones transcripcionales de Pu, promotor de la ruta "upper", y Pm, promotor de la ruta *meta*, al gen *lacZ* desprovisto de su promotor natural y se estudió la expresión de β -galactosidasa en presencia y ausencia de XylR y en presencia y ausencia de *m*-xileno, comparándose posteriormente estos resultados con los obtenidos en la sección anterior.

Para estudiar la inducción de Pu se utilizó el plásmido pRD579, mientras que pERD100 se utilizó como fuente de la fusión Pm::*lacZ*. Los ensayos de inducción se realizaron en cepas de *E.coli* 5K portadoras de pRD579 o pERD100 y de los genes *xylR* y *xylS* en el plásmido compatible pKT570. Los cultivos se incubaron en LB suplementado con los antibióticos correspondientes en presencia y ausencia de *m*-xileno. A distintos tiempos después de la adición del inductor se determinaron los niveles de actividad β -galactosidasa en células permeabilizadas (Fig. 17).

Tanto Pu como Pm alcanzaban los niveles máximos de inducción a las 6 horas de incubación en presencia de *m*-xileno. Los niveles de inducción de Pm experimentaban un rápido aumento en respuesta a la adición de inductor, alcanzando el 50% del nivel máximo después de sólo 2 horas de incubación en presencia de inductor; en cambio los niveles de expresión de Pu disminuían durante las dos primeras horas de incubación, tanto en presencia como en ausencia de *m*-xileno, y después aumentaban lentamente en presencia de *m*-xileno, alcanzando el 50% de la actividad

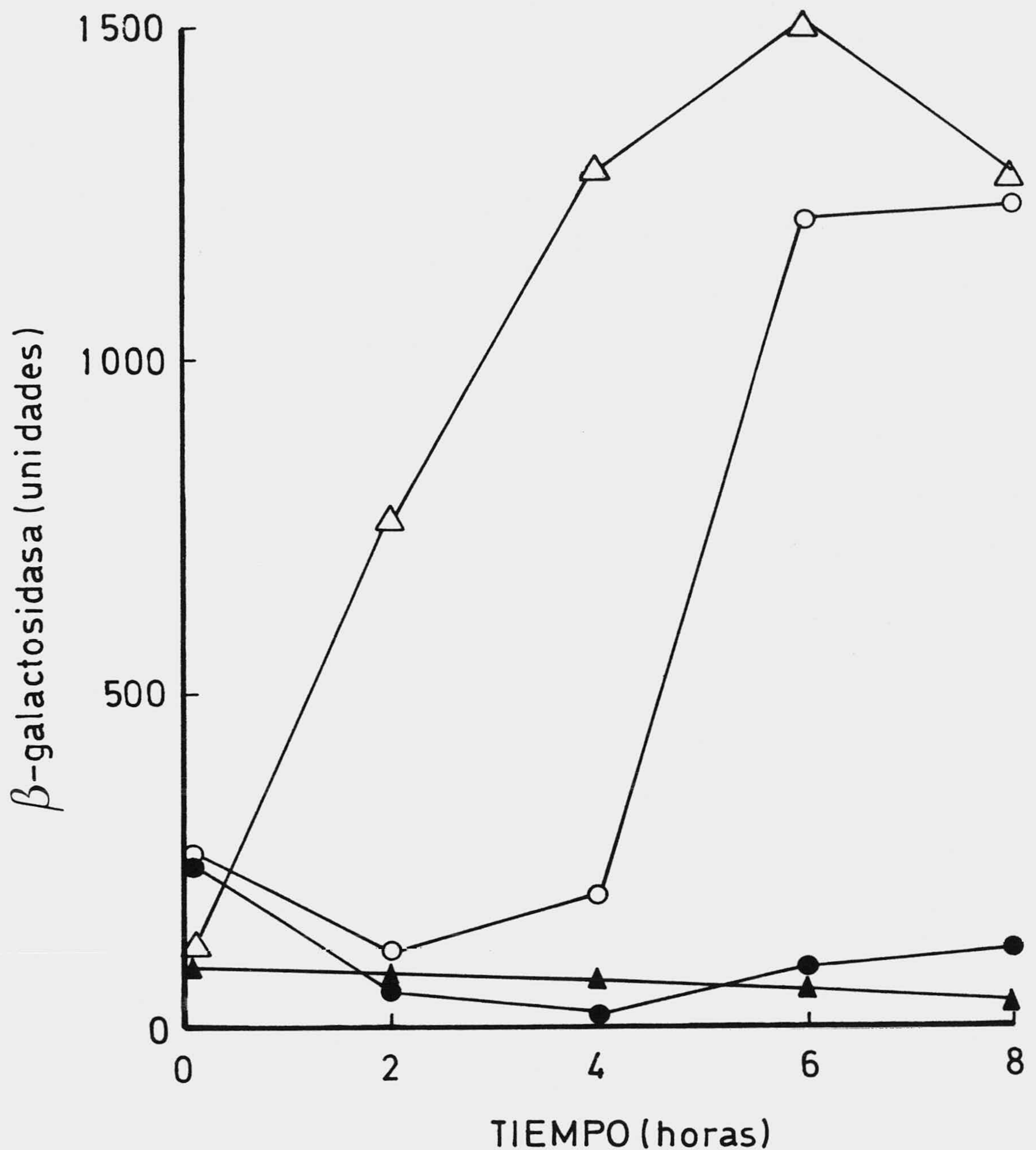


Figura 17: Inducción de los promotores Pu y Pm en fusiones transcripcionales al gen *lacZ*. Células de *E. coli* 5K (pRD579, pKT570) (○ y ●) y *E. coli* 5K (pERD100, pKT570) (△ y ▲) se cultivaron a 30°C en LB suplementado con los antibióticos correspondientes en presencia (○ y △) o ausencia (● y ▲) de *m*-xileno. A los tiempos indicados se determinó la actividad β -galactosidasa de alícuotas de 3ml en células permeabilizadas. La actividad se expresa en unidades calculadas de acuerdo con Miller.

β -galactosidasa máxima a las 4,5 horas de la adición del inductor. A partir de las 6 horas los niveles de inducción de Pm disminuían ligeramente, mientras que los de Pu se mantenían estables.

Puesto que las cinéticas de inducción de actividad β -galactosidasa desde Pu y Pm fueron similares a las determinadas para la inducción de enzimas de la ruta "upper" y *meta* respectivamente, se sugiere que la inducción lenta de estas rutas refleja la actividad transcripcional de sus respectivos promotores. Por tanto, la similitud de los resultados obtenidos al comparar el sistema de expresión de TOL y el de las fusiones transcripcionales a *lacZ* hacen válida esta última aproximación experimental.

3.1.1.3 Determinación del perfil de efectores de XylR utilizando fusiones transcripcionales Pu::*lacZ*.

El perfil de efectores de XylR se analizó utilizando la fusión transcripcional de Pu al gen *lacZ* en el plásmido pRD579, en cepas de *E.coli* 5K portadoras del gen *xyIR* en el plásmido pTS174. Las células se cultivaron en LB suplementado con los antibióticos correspondientes en presencia y ausencia de los efectores ensayados suministrados como se indica en la sección 2.24 de Materiales y Métodos. Los cultivos se incubaron durante 6 horas a 30°C en agitación, determinándose entonces la actividad β -galactosidasa en una alícuota de los cultivos.

Los niveles de actividad β -galactosidasa inducidos por hidrocarburos aromáticos y compuestos relacionados se muestran en la Tabla 3. De entre los compuestos ensayados con sustituciones en el anillo aromático, sólo el tolueno se comportó como efector, mientras que el fenol, la anilina y el benceno, que no son sustratos de la ruta "upper", no indujeron expresión desde Pu. El tamaño del grupo alquílico que permitía la inducción desde Pu se analizó utilizando aromáticos con distinto número de carbonos en la cadena lateral del anillo aromático. Además del tolueno, sólo el etilbenceno se comportó como efector de XylR, mientras que compuestos con cadenas laterales de mayor número de carbonos, como el isopropil- y el nonilbenceno, no indujeron síntesis de β -galactosidasa.

Una vez fijada la sustitución con un grupo metilo en la posición 1 del anillo

Efactor	Actividad β -galactosidasa (U)	
	Pu:: <i>lacZ</i>	Pm:: <i>lacZ</i>
Ninguno	201	140
Fenol	203	-
Anilina	205	-
Benceno	197	-
Tolueno	2050	1860
Etilbenceno	670	-
Isopropilbenceno	210	-
Nonilbenceno	200	-
<i>o</i> -xileno	1850	-
<i>m</i> -xileno	2960	1650
<i>p</i> -xileno	2070	-
<i>o</i> -etiltolueno	520	-
<i>m</i> -etiltolueno	1510	-
<i>p</i> -etiltolueno	500	160
<i>o</i> -clorotolueno	3660	810
<i>m</i> -clorotolueno	3320	-
<i>p</i> -clorotolueno	3280	1020
<i>o</i> -cloro- <i>m</i> -xileno	1030	-
<i>o</i> -cloro- <i>p</i> -xileno	1810	-
<i>p</i> -cloro- <i>o</i> -xileno	1780	-
1,2,3-trimetilbenceno	1220	640
1,3,4-trimetilbenceno	1600	1640
1,3,5-trimetilbenceno	910	-
2,5-diclorotolueno	1710	500
2,6-diclorotolueno	820	570

Tabla 3: Activación de XylR por compuestos con un anillo aromático. 25ml de cultivos de *E. coli* 5K (pRD579, pTS174) y *E. coli* 5K (pERD100, pKT570) en LB suplementado con los antibióticos correspondientes se incubaron durante 6 horas a 30°C con los hidrocarburos indicados en fase gaseosa, y entonces se determinó la actividad β -galactosidasa de cada cultivo en células permeabilizadas. Los resultados se expresan en unidades de actividad β -galactosidasa calculadas de acuerdo con Miller, y representan la media de 2 a 6 determinaciones independientes. La desviación estándar fue del 5% al 40% de los valores indicados. - indica no determinado.

aromático se analizó qué sustituciones eran permisivas en las otras posiciones del anillo, probándose como efectores derivados sustituidos de tolueno. Todos los derivados monosustituidos ensayados y relacionados en la Tabla 3 indujeron expresión desde Pu, tanto los que pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía por *Pseudomonas* portadoras del plásmido TOL, *m*- y *p*-xileno y *m*-etiltolueno, como los que no lo son, como *o*-xileno, *o*- y *p*-etiltolueno y los clorotoluenos. De éstos últimos, los derivados clorados *o*-, *m*- y *p*-clorotolueno fueron los efectores más potentes de XylR, mientras que el *o*- y *p*-etiltolueno fueron efectores débiles. El *o*-xileno, a pesar de no ser sustrato de la ruta, es un inductor gratuito de la misma ya que inducía niveles de actividad β -galactosidasa próximos a los mediados por sus isómeros *m*- y *p*-xileno. Los derivados de tolueno disustituidos ensayados también indujeron altos niveles de expresión desde Pu, tanto el único sustrato de la ruta, el 1,3,4-trimetilbenceno, como los que no son sustratos de la misma: 1,2,3-trimetilbenceno, 1,3,5-trimetilbenceno, *p*-cloro-*o*-xileno, *o*-cloro-*m*-xileno, *o*-cloro-*p*-xileno, 2,5-diclorotolueno y 2,6-diclorotolueno.

Los niveles de actividad β -galactosidasa inducidos por alcohol bencílico, benzaldehído, y sus derivados se muestran en la Tabla 4. El alcohol bencílico así como sus derivados con un grupo metilo o un átomo de cloro en las posiciones *meta* y *para* del anillo aromático se comportaron como efectores de XylR; en contraste, el alcohol *p*-etilbencílico no era efector. Los niveles de inducción mediados por XylR y los alcoholes aromáticos dependían de la concentración del alcohol en el medio de cultivo, obteniéndose los mayores niveles de inducción medidos como actividad β -galactosidasa a concentraciones de 10mM para el alcohol bencílico y los alcoholes *m*- y *p*-metilbencílico, y a 5mM para los alcoholes *m*- y *p*-clorobencílico. A concentraciones mayores de las indicadas los niveles de actividad β -galactosidasa eran muy bajos, probablemente debido a efectos tóxicos sobre las células, ya que el crecimiento de los cultivos se veía notablemente disminuido. Es de interés señalar que los niveles de expresión desde Pu mediados por XylR con alcoholes bencílicos eran similares a los inducidos por los correspondientes hidrocarburos aromáticos.

De los derivados de benzaldehído ensayados como efectores de XylR sólo el *p*-clorobenzaldehído fué capaz de activar la transcripción desde Pu. En todos los

Efactor	Concentración (mM)	Actividad β -galactosidasa (U)	
		Pu:: <i>lacZ</i>	Pm:: <i>lacZ</i>
Ninguno		200	150
Alcohol bencílico	1	490	-
	5	800	350
	10	900	500
Alcohol <i>m</i> -metilbencílico	1	1690	-
	5	2250	720
	10	3040	-
Alcohol <i>p</i> -metilbencílico	1	330	-
	5	800	180
	10	1350	560
Alcohol <i>p</i> -etilbencílico	1	350	110
	2,5	400	100
Alcohol <i>m</i> -clorobencílico	1	1120	110
	5	2540	170
Alcohol <i>p</i> -clorobencílico	1	550	-
	5	3740	460
Alcohol 3,5-diclorobencílico	5	675	750
Benzaldehido	1	300	2500
<i>o</i> -metilbenzaldehido	1	400	-
<i>m</i> -metilbenzaldehido	1	430	1200
<i>p</i> -metilbenzaldehido	1	320	-
<i>p</i> -etilbenzaldehido	1	300	-
<i>m</i> -clorobenzaldehido	1	400	-
<i>p</i> -clorobenzaldehido	0,1	560	-
	0,5	830	-
	1	1750	1770

Tabla 4: Activación de XylR por alcoholes bencílicos y benzaldehidos. Las condiciones para el cultivo e inducción de *E. coli* 5K (pRD579, pTS174) y *E. coli* 5K (pERD100, pKT570) fueron las indicadas en la Tabla 3, excepto que los alcoholes bencílicos y benzaldehidos utilizados como inductores se suministraron en disolución en el medio de cultivo a la concentración indicada. Los valores de actividad β -galactosidasa son la media de 2 a 6 determinaciones independientes. La desviación estándar fué del 5% al 40% de los valores indicados. - indica no determinado.

casos concentraciones de benzaldehidos mayores de 1mM fueron tóxicas para las células, si bien en el caso del *p*-clorobenzaldehido se observó, como en el caso de los alcoholes, un aumento de los niveles de inducción dependiente de la concentración de efector en el cultivo.

3.1.1.4 Activación de la transcripción del operón *meta* mediada por XylR: regulación en cascada de Pm.

La inducción de Pm por tolueno implica un sistema de regulación en cascada, en el que XylR activado por tolueno estimula la transcripción desde el promotor del gen *xylS*, Ps, e induce la superproducción de XylS; la alta concentración intracelular de XylS es suficiente para inducir la transcripción desde Pm en ausencia de sus efectores específicos, el ácido benzoico y sus derivados (Ramos *et al.*, 1987a). Es de interés señalar que se ha demostrado previamente que XylR no actúa directamente sobre Pm (Franklin *et al.*, 1983; Inouye *et al.*, 1981; Ramos *et al.*, 1987a). La Figura 5 resume los acontecimientos conocidos de este sistema de activación en cascada desde Pm.

Para estudiar el efecto del tolueno, alcohol bencílico, benzaldehido y sus derivados sobre el sistema de regulación en cascada, se utilizó la fusión transcripcional de Pm al gen *lacZ* en el plásmido pERD100 en células de *E.coli* 5K con los genes *xylR* y *xylS* en el plásmido compatible pKT570. Las condiciones de inducción desde Pm fueron las mismas que se han descrito para el análisis de la expresión de Pu. Los cultivos se incubaron a 30°C en agitación hasta alcanzar los niveles de máxima inducción, estimados en 6 horas como se indica en el apartado 3.1.1.2.

Los niveles de actividad β -galactosidasa inducidos por tolueno y sus derivados se muestran en la Tabla 3. En todos los casos los niveles de actividad fueron más bajos que los inducidos por cada efector en Pu, pero el patrón de inducción fue similar para ambos promotores. En contraste con los hidrocarburos, los alcoholes bencílicos se comportaron como inductores pobres de la ruta *meta* (Tabla 4), incluso los derivados clorados, que mediaban altos niveles de síntesis de β -galactosidasa desde Pu. Benzaldehido, *m*-metil- y *p*-clorobenzaldehido se comportaron como efectores potentes de Pm (Tabla 4), aunque este efecto se debe a la activación de XylS por estos

compuestos más que a la inducción del sistema en cascada, de acuerdo con otras observaciones de este grupo (Michán, 1991; Holtel, resultados sin publicar). Sin embargo, estas últimas observaciones contrastan con el hecho de que la ruta *meta* no se induzca en células de *P.putida* 2440 (pWW0) creciendo en acetato y en presencia de benzaldehído, ya que éstas no exhibían actividad catecol 2,3-dioxigenasa. La razón de esta contradicción no tiene explicación evidente.

3.1.2 Análisis de la transcripción de *xyIR* utilizando fusiones transcripcionales de *Pr* al gen *lacZ*: autorregulación de la síntesis de XylR.

La cinética de inducción del promotor *Pu* analizada en la fusión transcripcional *Pu:lacZ* en el plásmido pRD579 con el regulador XylR sintetizado por el plásmido pTS174 (Fig. 17), mostraba un retardo en la inducción de *Pu*, así como oscilaciones en su expresión basal. Esto sugería que la concentración intracelular de XylR capaz de activar la transcripción de *Pu* no era constante, sino que variaba con la fase de crecimiento del cultivo. Para comprobarlo se analizó la expresión de *Pu* medida como actividad β -galactosidasa en ausencia de efectores de XylR, en células de *E.coli* 5K portadoras de pERD579 con o sin *xyIR* en el plásmido pTS174 (Fig. 18). Los niveles basales de expresión de *Pu* se mantuvieron uniformemente bajos en ausencia de XylR; en contraste, los niveles de expresión del promotor en presencia de XylR disminuían rápidamente durante la fase de latencia, y esta disminución se hacía más lenta al alcanzarse la fase exponencial temprana. Sin embargo, la expresión de *Pu* aumentaba bruscamente coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial tardía, alcanzando el máximo a las 6 horas. Al inicio de la fase estacionaria la expresión de *Pu* descendía bruscamente, incrementándose de nuevo lentamente a lo largo de la fase estacionaria (Fig. 18).

Para estudiar la regulación de la síntesis de XylR se construyó una fusión transcripcional de los promotores del gen *xyIR*, *Pr*₁ y *Pr*₂, al gen *lacZ* en el plásmido pERD99 (Fig. 19). Un fragmento *Bgl*II de 0,6kb de pRL38 que contiene a los

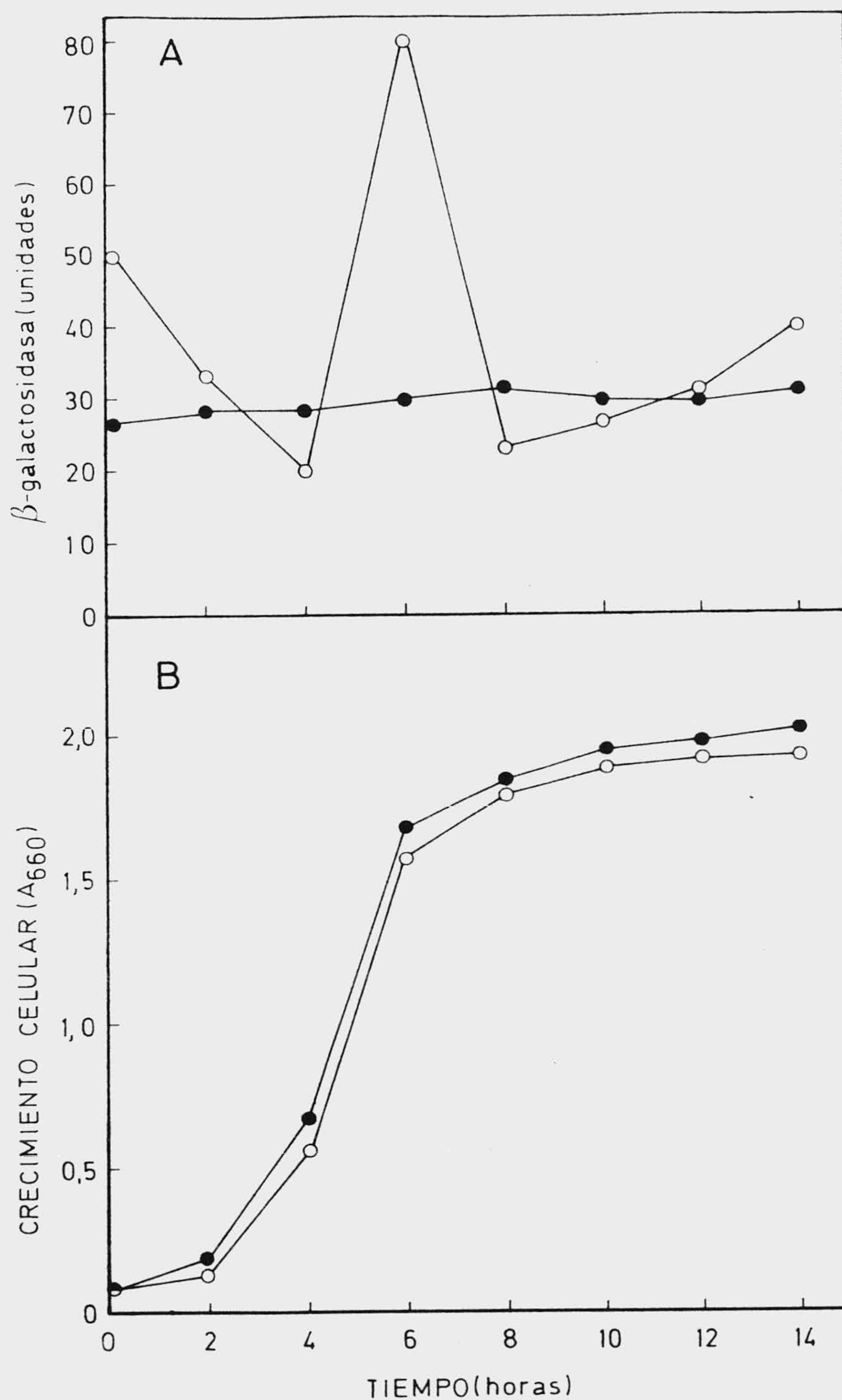


Figura 18: Expresión basal de Pu a lo largo de las fases de crecimiento. Cultivos de *E. coli* 5K (pRD579, pTS174) (○) y *E. coli* 5K (pRD579) (●) en LB con los antibióticos correspondientes se incubaron a 30°C en agitación. A los tiempos indicados se midió la actividad β -galactosidasa de alícuotas de 3ml en células permeabilizadas (A) y se determinó la turbidez del cultivo a 660nm (B). Las unidades de β -galactosidasa se calcularon de acuerdo con Miller.

promotores Pr se clonó en el sitio único *Bam*HI del vector para ensayo de promotores pMD1405. En el plásmido recombinante obtenido, pERD98, el gen *lacZ* se encontraba en fase de lectura incorrecta (+1). Con objeto de conseguir la fase de lectura apropiada, pERD98 se linearizó con *Pst*I en el punto único situado entre Pr y *lacZ*, los extremos cohesivos 3' monocatenarios de 4 nucleótidos se digirieron con nucleasa S1, y finalmente se ligaron con ADN-ligasa del fago T4. En el plásmido resultante, pERD99, el gen *lacZ* estaba en fase correcta de lectura desde Pr (Fig. 19).

Los niveles de transcripción de Pr se estimaron como actividad β -galactosidasa en cultivos de *E.coli* 5K (pERD99) en presencia y ausencia de *xylR* en el plásmido compatible pTS174, y en presencia y ausencia de efectores de XylR (Tabla 5). Las medidas de actividad β -galactosidasa demostraron que, en presencia de XylR, la expresión de Pr disminuye a la mitad: los cultivos de *E.coli* 5K (pERD99) tenían una actividad β -galactosidasa de 2500U, frente a 1300U de los cultivos de *E.coli* 5K (pERD99, pTS174); además, en presencia de efectores de XylR la inhibición de la transcripción desde Pr fué aún más notoria, disminuyendo el nivel de expresión del promotor entre el 30% y el 50% respecto a los valores alcanzados sin efector, mientras que en presencia de compuestos aromáticos que no son efectores de XylR no se incrementó la inhibición de la transcripción mediada por XylR. Estos resultados sugieren que XylR es capaz de regular su propia síntesis.

3.1.3 Análisis del perfil de sustratos de los enzimas de la ruta "upper".

Con objeto de conocer las posibles limitaciones de los enzimas de la ruta "upper" con vistas a su manipulación genética para la adquisición de nuevas especificidades, se realizó un análisis de su perfil de sustratos.

La determinación de las actividades enzimáticas de la ruta "upper", tolueno monooxigenasa (TO), alcohol bencílico deshidrogenasa (BADH) y benzaldehído deshidrogenasa (BZDH), se realizó *in vivo* para la primera de ellas e *in vitro* para las dos deshidrogenasas.

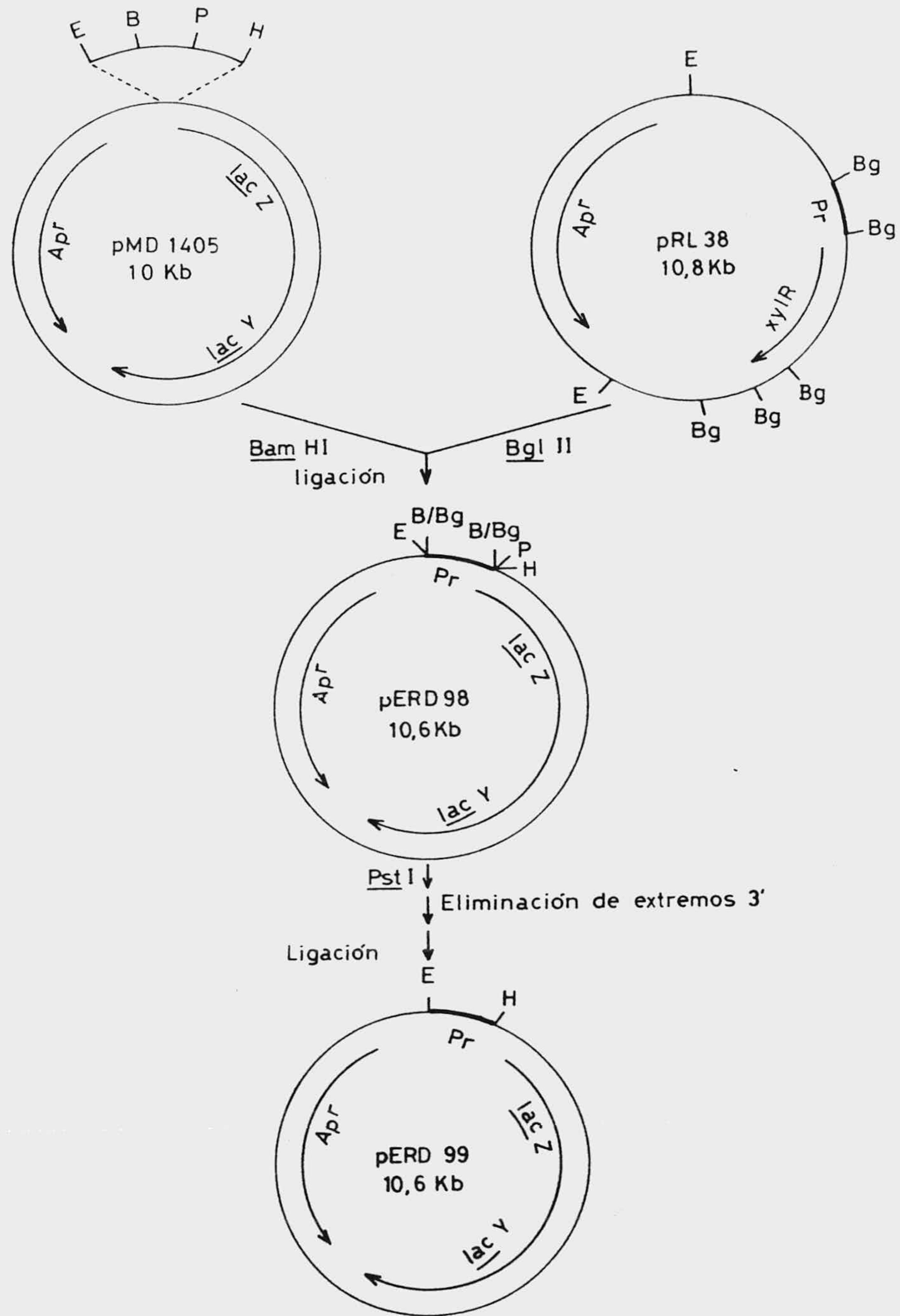


Figura 19: Esquema de la construcción del plásmido pERD99. El fragmento *Bgl*II de 0,6kb de pRL38 que contiene a los promotores *Pr*₁ y *Pr*₂ de *xyIR* y divergentemente al promotor del gen *xyIS*, *Ps*, se clonó en el sitio *Bam*HI del polinquer del vector de ensayo de promotores pMD1405. Para obtener la fase correcta de lectura del gen *lacZ*, el plásmido recombinante pERD98 se linealizó con *Pst*I, los extremos cohesivos resultantes se digirieron con nucleasa S1 y se ligaron con ADN-ligasa del fago T4. El plásmido obtenido, pERD99, tenía el gen *lacZ* en fase correcta de lectura bajo el control de los promotores *Pr*₁ y *Pr*₂. Las abreviaturas usadas para las restrictasas son: E, *Eco*RI; B, *Bam*HI; P, *Pst*I; H, *Hind*III; Bg, *Bgl*II; B/Bg, ligación de extremos compatibles *Bam*HI y *Bgl*II.

Efactor	Actividad β -galactosidasa (U)	
	XylR	Pr:: <i>lacZ</i>
Ninguno	-	2500
Tolueno	-	2500
Ninguno	+	1300
Benceno	+	1430
Tolueno	+	890
<i>o</i> -xileno	+	570
<i>m</i> -xileno	+	810
<i>p</i> -xileno	+	626
<i>o</i> -etiltolueno	+	889
<i>o</i> -clorotolueno	+	754
<i>p</i> -clorotolueno	+	774
2,5-diclorotolueno	+	1020
2,6-diclorotolueno	+	1024
Alcohol bencílico	+	1209
Alcohol <i>m</i> -metilbencílico	+	1154
Alcohol <i>m</i> -clorobencílico	+	1041
Benzaldehido	+	1376
<i>p</i> -clorobenzaldehido	+	843

Tabla 5: Autorregulación de XylR dependiente de sus efectores. Células de *E. coli* 5K (pERD99) (XylR,-) y *E. coli* 5K (pERD99, pTS174) (XylR,+) se cultivaron en LB suplementado con los antibióticos correspondientes en presencia y ausencia de los efectores indicados. Los hidrocarburos se suministraron en fase gaseosa, y los alcoholes y aldehidos en solución a concentración 5mM y 1mM, respectivamente. Después de 6 horas de incubación a 30°C se determinó la actividad β -galactosidasa de cada cultivo en células permeabilizadas. Los resultados indicados son la media de 2 a 4 determinaciones independientes. La desviación estándar fué del 5% al 25% de los valores indicados.

3.1.3.1 Especificidad de sustrato de la tolueno monooxigenasa.

La especificidad de la tolueno monooxigenasa (TO) se determinó en células enteras de *P.putida* 2440 (pWW0) cultivadas en medio mínimo con *m*-xileno como fuente de carbono, o en células de *E.coli* JM101 portadoras de los genes *xylMA* clonados bajo el control del promotor *lac* en el plásmido pWA21.

La especificidad de la TO en células de *P.putida* 2440 (pWW0) se determinó mediante el método polarográfico descrito en Materiales y Métodos. La actividad TO frente a los toluenos ensayados como sustratos se estimó como el incremento del consumo de oxígeno en respuesta a la adición de cada hidrocarburo sobre el consumo basal, debido éste a respiración endógena (Tabla 6). La adición de tolueno provocó un incremento notable en el consumo de oxígeno (15nmoles por minuto y unidad de DO₆₆₀). La adición de *m*- y *p*-xileno también provocó un fuerte incremento en la velocidad de consumo de oxígeno, aunque la actividad TO frente a estos sustratos fué del orden del 60% de la registrada frente a tolueno (Tabla 6). En contraste, aquellos derivados de tolueno que no pueden ser utilizados por *P.putida* 2440 (pWW0) como única fuente de carbono (*o*-xileno, *p*-etiltolueno, *m*- y *p*-clorotolueno), no provocaron incremento significativo del consumo de oxígeno por las células (Tabla 6).

Estos resultados se confirmaron determinando la oxidación de hidrocarburos aromáticos a sus alcoholes bencílicos correspondientes por la TO. Células de *E.coli* JM101 (pWA21) se cultivaron en medio de cultivo mínimo con glucosa como fuente de carbono, y la expresión de los genes *xylMA* se indujo añadiendo IPTG al cultivo. Cuando las células se cultivaron en presencia de tolueno, suministrado en fase gaseosa como se indica en la sección correspondiente de Materiales y Métodos, acumularon 2,68 μ moles de alcohol bencílico por ml de medio de cultivo en 16 horas de incubación. En cambio no se detectó el alcohol bencílico correspondiente a la oxidación de *p*-etiltolueno cuando éste se suministró en lugar de tolueno.

Es de interés señalar que cultivos de *P.putida* 2440 (pWW0) incubados durante 24-30 horas en medio de cultivo mínimo con glucosa como fuente de carbono en presencia de *m*- y *p*-clorotolueno, acumularon en el medio de cultivo *m*-clorocatecol y el semialdehído del ácido 4-cloromucónico respectivamente, lo cual sugiere que la TO

Tabla 6: Especificidad de los enzimas de la ruta "upper". Células de *P.putida* 2440 (pWW0) se incubaron a 30°C durante 6 horas en medio mínimo con *m*-xileno como fuente de carbono. La actividad TO se estimó polarográficamente mediante el incremento del consumo de oxígeno en respuesta a la adición de 0,5mM de los hidrocarburos señalados. La actividad se expresa en nmoles de oxígeno consumido por minuto y unidad de DO₆₆₀. Las actividades BADH y BZDH se midieron espectrofotométricamente en extractos libres de células de *P.putida* 2440 (pWW0) cultivadas en medio mínimo con *p*-xileno como fuente de carbono, tal como se describe en Materiales y Métodos. Ambas actividades se expresan en mU por mg de proteína en el extracto celular. Los valores indicados son la media de tres determinaciones independientes, con una desviación estándar del 5% al 30%.

Enzima	Sustrato	Actividad específica
TO	Tolueno	15
	<i>o</i> -xileno	<0,1
	<i>m</i> -xileno	9
	<i>p</i> -xileno	10,2
	<i>p</i> -etiltolueno	<0,1
	<i>m</i> -clorotolueno	<0,1
	<i>p</i> -clorotolueno	<0,1
BADH	Alcohol bencílico	1443
	Alcohol <i>o</i> -metilbencílico	132
	Alcohol <i>m</i> -metilbencílico	1007
	Alcohol <i>p</i> -metilbencílico	728
	Alcohol <i>p</i> -etilbencílico	414
	Alcohol <i>m</i> -clorobencílico	771
	Alcohol <i>p</i> -clorobencílico	711
BZDH	Benzaldehido	5058
	<i>o</i> -metilbenzaldehido	16
	<i>m</i> -metilbenzaldehido	3033
	<i>p</i> -etilbenzaldehido	5016
	<i>p</i> -clorobenzaldehido	3250

es capaz de oxidar lentamente ambos clorotoluenos, pero no a velocidad suficiente para observar esta oxidación en ensayos a tiempos cortos. Esta observación ha sido confirmada por U. Brinkman (comunicación personal).

3.1.3.2 Especificidad de sustrato de la alcohol bencílico deshidrogenasa y benzaldehido deshidrogenasa.

Las especificidades de sustrato de la alcohol bencílico deshidrogenasa (BADH) y de la benzaldehido deshidrogenasa (BZDH) codificadas por el plásmido TOL pWW0, se determinaron en extractos libres de células de *P.putida* 2440 (pWW0) cultivadas en medio de cultivo mínimo con *p*-xileno como fuente de carbono e inductor de la ruta "upper".

La BADH demostró tener un amplio espectro de sustratos, ya que todos los derivados de alcohol bencílico ensayados fueron oxidados a alta velocidad (Tabla 6). La actividad máxima se registró con el alcohol bencílico sin sustituir, y fué del orden de 1400mU/mg de proteína. La actividad con los alcoholes cloro- y metilbencílicos fué del orden del 50-70% de la máxima. Aunque el *o*-xileno no es sustrato de la TO, el alcohol *o*-metilbencílico fué oxidado por la BADH, aunque a baja velocidad (132mU/mg de proteína). La actividad con los alcoholes *p*-etil- y 3,5-diclorobencílicos fué del orden del 30% de la máxima (Tabla 6).

La BZDH codificada por el plásmido TOL pWW0 exhibió asimismo un amplio perfil de sustrato. La actividad máxima se registró con benzaldehido como sustrato y fué del orden de 5000mU/mg de proteína. A excepción del *o*-metilbenzaldehido, que no es sustrato del enzima, los derivados de benzaldehido ensayados con sustituciones en las posiciones *meta* y *para* fueron oxidados a velocidades del orden del 60-99% de la máxima (Tabla 6).

3.1.3.3 Constantes de afinidad de la alcohol bencílico deshidrogenasa y de la benzaldehido deshidrogenasa por sus sustratos respectivos.

Para estimar la afinidad de la BADH y la BZDH por sus respectivos sustratos se determinó la actividad de ambos enzimas a distintas concentraciones de sustratos.

La BADH presentaba cinética de saturación frente a todos los derivados de alcohol bencílico ensayados. Se determinó la actividad BADH en las condiciones descritas frente a distintas concentraciones de alcohol bencílico y los alcoholes *p*-etil- y *p*-clorobencílicos. Las representaciones dobles recíprocas de Lineweaver-Burk (v_o^{-1} frente a $[S]^{-1}$) y de Eddie-Scatchard (v_o frente a $v_o[S]^{-1}$) fueron lineales, con un coeficiente de correlación lineal de 0,95-0,98. Las $K'm$ calculadas fueron $9\mu M$ para el alcohol bencílico, $30\mu M$ para el alcohol *p*-etilbencílico (Fig. 20) y $28\mu M$ para el alcohol *p*-clorobencílico.

La BZDH catalizaba una reacción compleja con los benzaldehidos y NAD^+ , ya que a una actividad lineal máxima durante los 10 primeros segundos de la reacción, seguía una actividad lineal submáxima que no alcanzaba la saturación. En la Figura 21 se representan los resultados obtenidos con benzaldehido. Las representaciones de dobles recíprocos (v_o^{-1} frente a $[S]^{-1}$) con benzaldehido, *p*-etil- y *p*-clorobenzaldehido no se ajustaron a rectas, y lo mismo ocurrió al realizar las representaciones de Eddie-Scatchard (v_o frente a $v_o[S]^{-1}$). Los valores de $K'm$ se estimaron como las concentraciones de sustrato a las que la velocidad (v_o) fué el 50% de la v_o máxima. La $K'm$ fué del orden de $130\mu M$ para benzaldehido, $88\mu M$ para *p*-clorobenzaldehido, y $45\mu M$ para *p*-etilbenzaldehido.

3.1.4 Manipulación de la ruta "upper" del plásmido TOL pWW0 para conseguir la degradación de derivados recalcitrantes de tolueno.

El análisis del perfil de efectores de XylR demuestra que XylR reconoce un amplio espectro de derivados de tolueno y alcoholes bencílicos como efectores para la inducción del promotor Pu. El análisis del perfil de sustrato de los enzimas de la ruta "upper" indica que la alcohol bencílico deshidrogenasa (BADH) y la benzaldehido deshidrogenasa (BZDH) tienen una amplia especificidad de sustrato, siendo capaces de oxidar no sólo los sustratos sustituidos con grupos metilo en posiciones *meta* y *para*, sino también sustratos sustituidos en *para* con grupos etilo y átomos de cloro. En contraste, la tolueno monooxigenasa (TO), el primer enzima de la ruta,

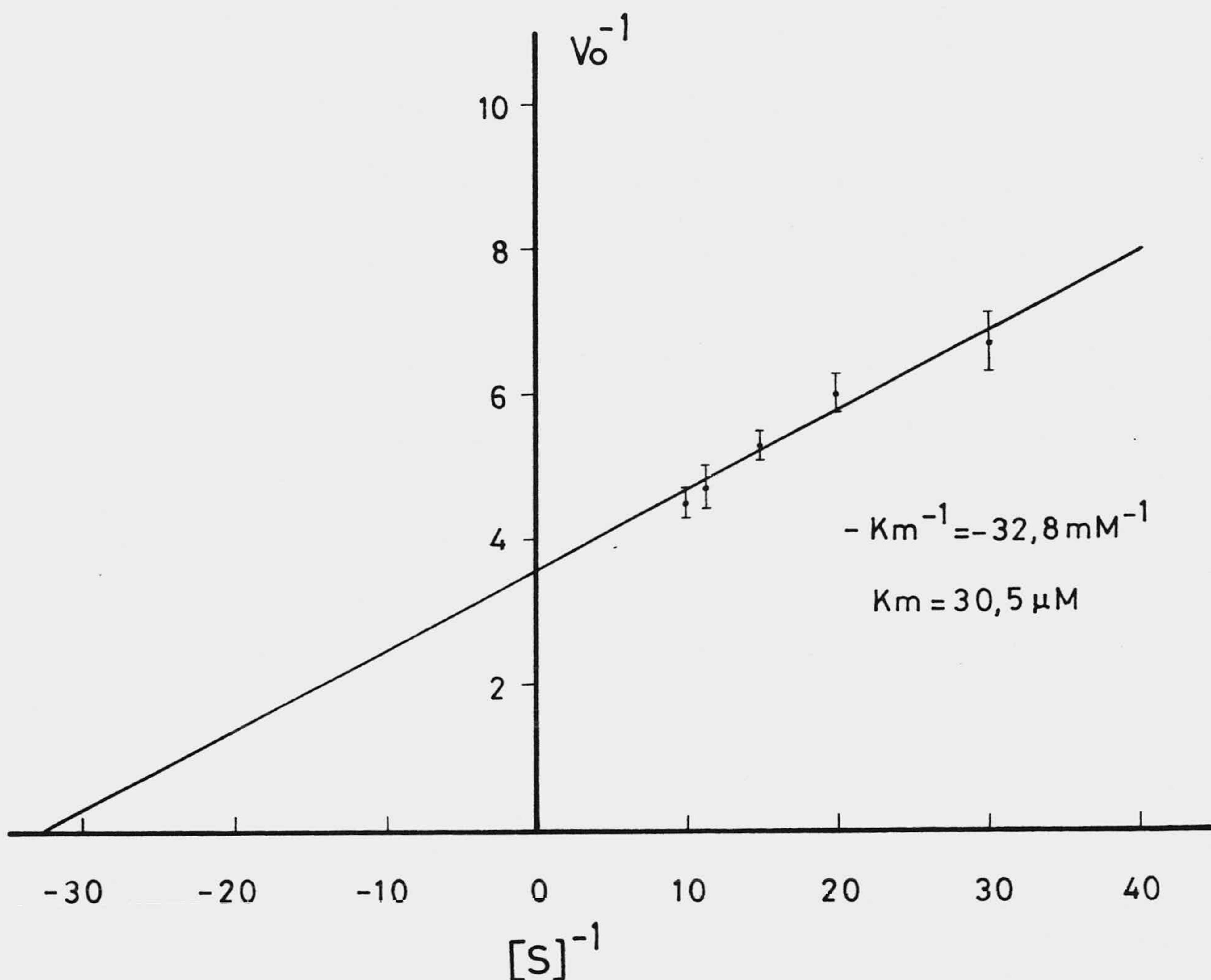


Figura 20: Representación doble recíproca (v_o^{-1} frente a $[S]^{-1}$) de Lineweaver-Burk para el cálculo de la K'_m de la BADH para el alcohol *p*-etilbencílico. La actividad BADH se determinó en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, a las concentraciones de alcohol *p*-etilbencílico indicadas. En cada ensayo se utilizaron $100\mu\text{l}$ de un extracto libre de células preparado a partir de un cultivo de *P.putida* 2440 (pWW0) incubado durante 16 horas a 30°C en medio de cultivo mínimo en presencia de *p*-xileno en fase gaseosa. La concentración de proteína en el extracto celular fué $112\mu\text{g/ml}$. Cada punto representa la media de tres determinaciones independientes, con la desviación estándar que se indica en la figura por una línea vertical. El ajuste a la recta $v_o^{-1} = K'_m \times v_{\text{max}}^{-1} \times [S]^{-1} + v_{\text{max}}^{-1}$ se realizó por regresión lineal de los datos obtenidos, con un coeficiente de correlación de 0,98.

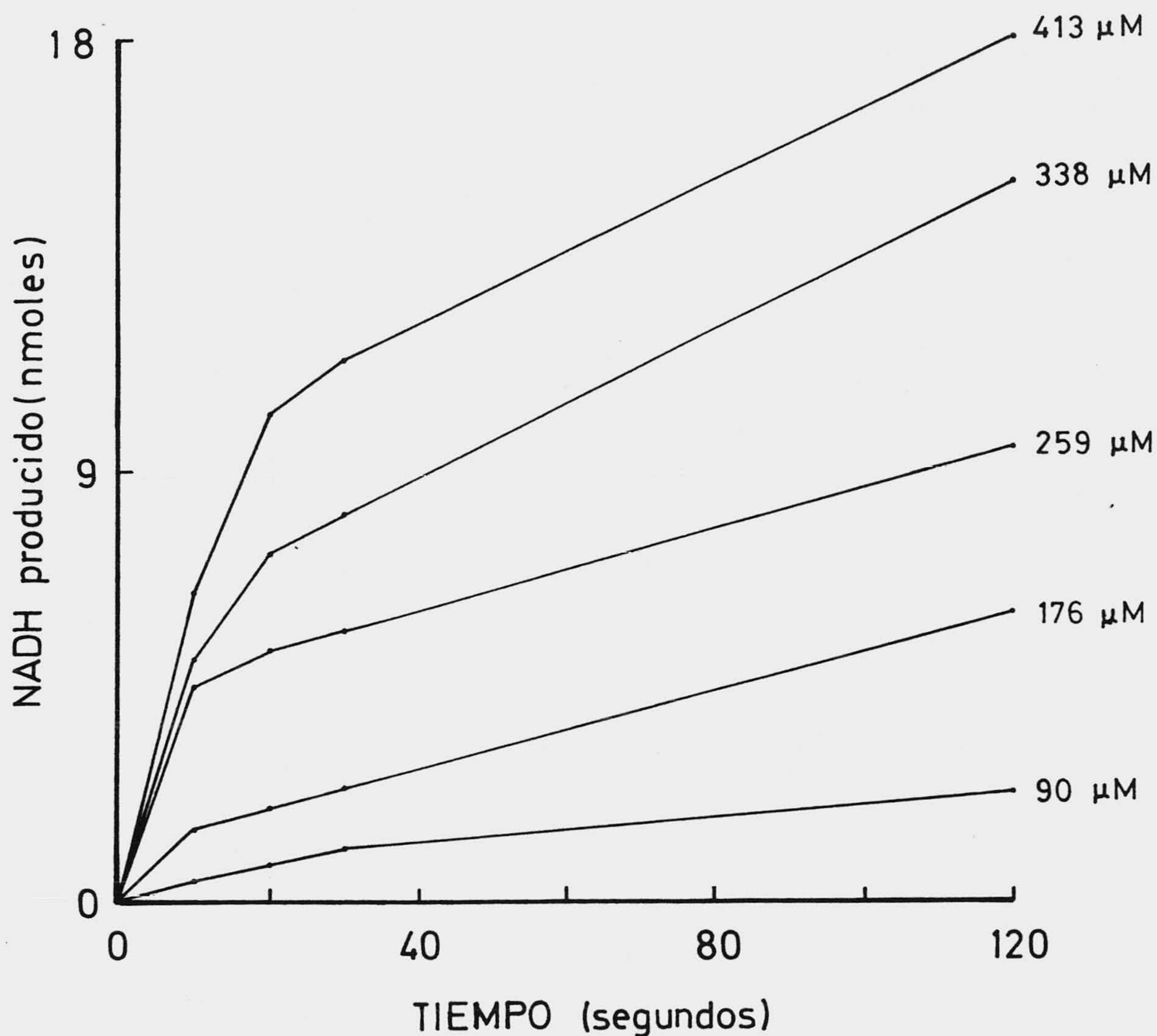


Figura 21: Cinética de la actividad BZDH codificada por el plásmido TOL a distintas concentraciones de benzaldehído. La actividad BZDH se determinó en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, a las concentraciones de benzaldehído indicadas. En cada ensayo se utilizaron 100 μ l de un extracto libre de células de *P. putida* 2440 (pWW0) cultivadas durante 16 horas a 30°C en medio de cultivo mínimo con *p*-xileno en fase gaseosa como fuente de carbono e inductor de la ruta "upper". La concentración de proteína en el extracto celular fué de 112 μ g/ml.

parece ser el punto limitante para la degradación de algunos derivados de tolueno (*o*-xileno, *p*-etiltolueno y clorotoluenos), ya que, o bien no son sustratos del enzima, o son oxidados a baja velocidad.

3.1.4.1 Múltiples puntos bloquean la degradación de *p*-etiltolueno por el plásmido TOL pWW0.

Como primer objetivo se persiguió manipular las rutas de TOL pWW0 para conseguir la degradación de *p*-etiltolueno. Puesto que el *p*-etiltolueno es un efector, aunque débil, de XylR, y tanto el alcohol *p*-etilbencílico como el *p*-etilbenzaldehído son oxidados por la BADH y la BZDH de TOL, se requería el aislamiento de mutantes de la TO capaces de oxidar el *p*-etiltolueno. Previamente se había establecido que el *p*-etilbenzoato, ácido carboxílico que resultaría de la oxidación de *p*-etiltolueno, no es efector de XylS, regulador positivo de la ruta *meta*, y por tanto no puede inducir la síntesis de los enzimas codificados por dicho operón (Ramos *et al.*, 1987b). Además, como se observa en la Tabla 3, el nivel de activación mediado por XylR y *p*-etiltolueno en el sistema en cascada tampoco permite la activación de la ruta *meta* para el metabolismo de *p*-etilbenzoato. Finalmente, el *p*-etilcatecol, producto de la dioxigenación y descarboxilación del *p*-etilbenzoato, inactiva a la catecol 2,3-dioxigenasa (C 2,3-O) de la ruta *meta* (Ramos *et al.*, 1987b), y por tanto se acumula sin ser degradado hasta intermediarios del ciclo de Krebs. Es decir, que la degradación completa de *p*-etiltolueno por las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0 se encuentra bloqueada en tres puntos: la oxidación del grupo metilo, la inducción de la ruta *meta* y la fisión del anillo aromático del catecol correspondiente.

La estrategia descrita a continuación para la construcción de una cepa de *P.putida* capaz de degradar *p*-etiltolueno se esquematiza en la Figura 22, y parte de la experiencia previa del grupo para permitir el metabolismo de *p*-etilbenzoato a través de una ruta *meta* modificada (Ramos *et al.*, 1987b; Ramos y Timmis, 1987).

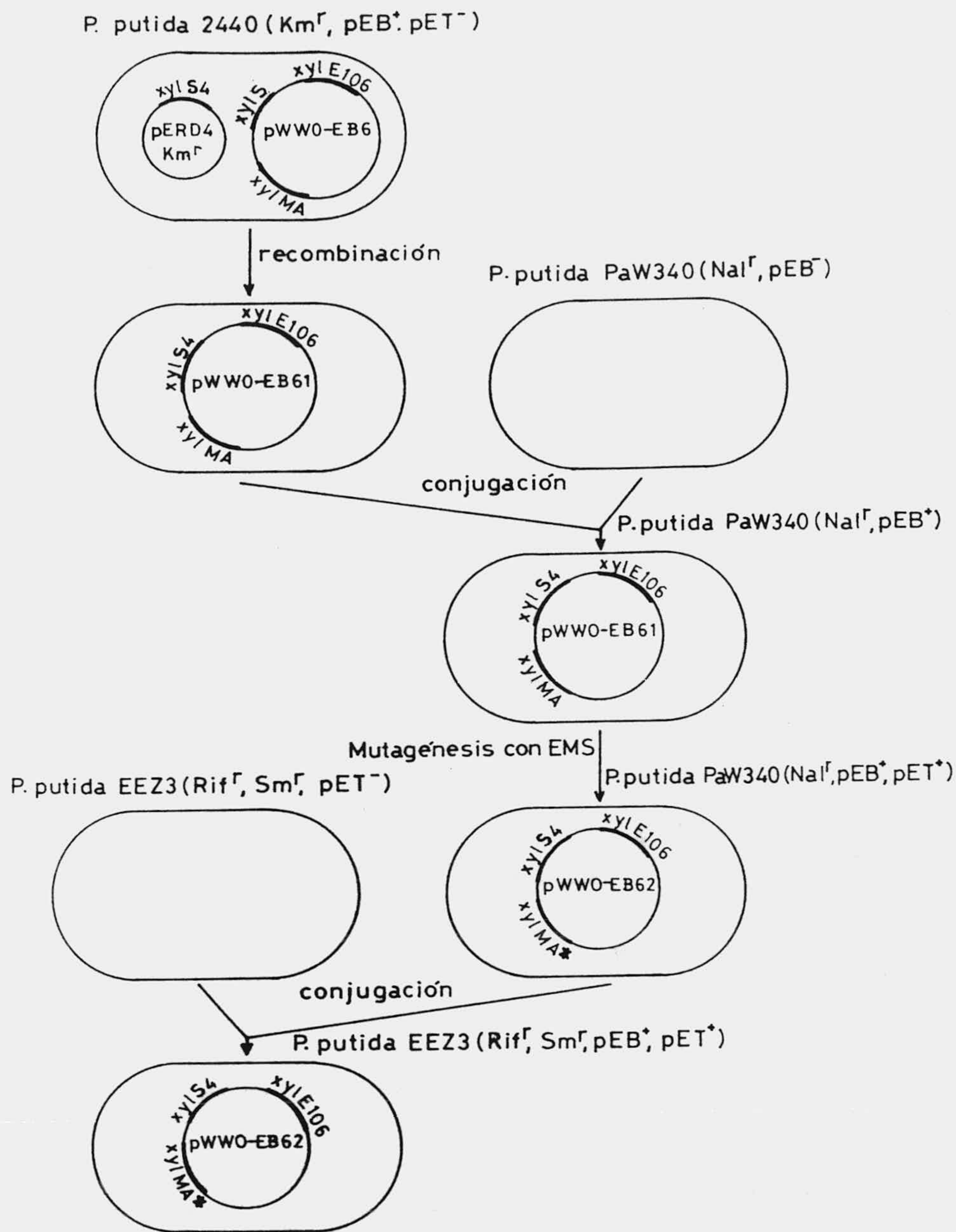


Figura 22: Esquema de la construcción de una cepa de *P. putida* capaz de degradar *p*-etiltolueno. La cepa de *P. putida* 2440 ($pWW0-EB6$, $pERD4$) contiene los genes mutantes $xylE106$ y $xylS4$, que permiten la degradación de *p*-etilbenzoato a través de la ruta *meta*. $xylS4$ recombinó con $xylS$ en el plásmido TOL $pWW0-EB6$. El plásmido TOL recombinante $pWW0-EB61$, portador de los alelos $xylE106$ y $xylS4$, se transfirió por conjugación a *P. putida* PaW340 y se seleccionaron los transconjugantes Nal^R , Km^s , *p*-etilbenzoato⁺ ($p-EB^+$). *P. putida* PaW340 (Nal^R) se sometió a mutagénesis con EMS, y se seleccionaron mutantes capaces de crecer en *p*-etiltolueno ($p-ET^+$). La localización de la mutación en el plásmido TOL mutante, $pWW0-EB62$, se comprobó por transferencia del mismo a *P. putida* EEZ3. El asterisco en los genes $xylMA$ de $pWW0-EB62$ indica que codifican una TO mutante, pero los alelos no han sido secuenciados.

3.1.4.2 Construcción de una ruta *meta* recombinante para la degradación de *p*-etilbenzoato.

Ramos *et al.* (1987b) construyeron una ruta *meta* modificada, capaz de degradar *p*-etilbenzoato que se basaba en la introducción de mutaciones independientes en *xylE*, el gen que codifica la C 2,3-O, en el plásmido TOL y en *xylS* clonado en el vector de relativo bajo número de copia pNM185. pERD4, un derivado de pNM185, es un plásmido Km^r de amplio espectro de hospedador, portador del mutante *xylS*4 [G(134)→C], cuyo producto génico XylS4 presenta una sustitución de la arginina en posición 45 por treonina. Este regulador reconoce al *p*-etilbenzoato como efector (Ramos *et al.*, 1990). El plásmido pWW0-EB6 es un derivado de TOL portador del mutante *xylE*106, que codifica una C 2,3-O resistente a la inactivación por *p*-etilcatecol y capaz de llevar a cabo la fisión del anillo aromático del *p*-etilcatecol. Además es capaz de movilizar a pERD4 con una frecuencia de 10⁻⁶ por receptor (Ramos *et al.*, 1987b). Durante este trabajo se procedió a la recombinación de la mutación *xylS*4 en el plásmido pWW0-EB6. Para ello, ambos plásmidos se transfirieron a la cepa *recA*⁺ *P.putida* 2440. La selección de recombinantes del plásmido TOL portadores de la mutación *xylS*4 se basó en que TOL se transfiere entre cepas de *Pseudomonas* con una frecuencia del orden de 1 a 10⁻² por receptor. Un cultivo de *P.putida* (pWW0-EB6, pERD4) se conjugó con *P.putida* PaW340 (Nal^r, Sm^r, *p*-EB⁻) como cepa receptora, y se seleccionaron transconjugantes capaces de crecer en *p*-etilbenzoato como única fuente de carbono, los cuales aparecieron con una frecuencia de 2 × 10⁻⁵ por receptor. Entre los transconjugantes se buscaron clones Km^s, que presumiblemente portaban un plásmido TOL recombinante en lugar de TOL y pERD4 adquiridos por cotransferencia o cointegración. Para comprobar la incorporación del alelo *xylS*4 a pWW0-EB6 se analizaron diez de los transconjugantes, y se comprobó que ninguno de ellos contenía el plásmido pERD4. Una de las cepas portadoras del plásmido recombinante, denominado pWW0-EB61, se eligió al azar para posterior estudio. pWW0-EB61 confería la capacidad de crecer en *p*-etilbenzoato cuando se transfería por conjugación a *P.putida* EEZ1 (Rif^r); de hecho el 100% de los transconjugantes crecieron en *p*-etilbenzoato, confirmando la asociación del fenotipo con el plásmido pWW0-EB61.

3.1.4.3 Aislamiento de mutantes de la TO codificada por el plásmido TOL pWW0-EB61 para permitir la degradación de *p*-etiltolueno.

Para obtener una cepa de *P.putida* capaz de degradar *p*-etiltolueno la cepa de *P.putida* PaW340 (pWW0-EB61) se mutagenizó con el agente mutagénico sulfonato de etilmetano (EMS) en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los mutantes se seleccionaron en placas de medio de cultivo mínimo con *p*-etiltolueno en fase gaseosa como única fuente de carbono. El hidrocarburo se suministró en una varilla de vidrio hueca con 50 μ l del mismo impregnado en un papel de filtro en el interior de la varilla, y las placas se sellaron con parafina. Los mutantes se obtuvieron con una frecuencia del orden de 5×10^{-8} . Para comprobar que la mutación se encontraba en el plásmido TOL se transfirió el plásmido de uno de los mutantes por conjugación a *P.putida* EEZ3, una cepa resistente a rifampicina y estreptomicina y que no utiliza *p*-etiltolueno como única fuente de carbono. Los transconjugantes capaces de crecer en *p*-etiltolueno aparecieron con una frecuencia de 10^{-2} por receptor, frecuencia similar a la de transferencia del plásmido TOL cuando la selección se realizó con tolueno. Estos resultados sugieren que la mutación que permite a las células crecer en *p*-etiltolueno se encuentra en el plásmido TOL, uno de los cuales se denominó pWW0-EB62 y se utilizó en estudios posteriores.

3.1.4.4 Caracterización de la TO mutante codificada por el plásmido TOL pWW0-EB62.

El perfil de sustratos de la TO codificada por el plásmido TOL pWW0-EB62 se estimó en células de *P.putida* EEZ3 (pWW0-EB62) cultivadas con *p*-etiltolueno como única fuente de carbono midiendo el consumo de oxígeno dependiente de hidrocarburos aromáticos. El enzima presentó actividad máxima con *m*-xileno, 10,5 nmoles de oxígeno consumido por minuto y unidad de DO₆₆₀, mientras que con *p*-xileno, *m*-etiltolueno, tolueno y *p*-etiltolueno, la actividad enzimática fué de 6,0; 3,1; 1,4; y 0,7 nmoles de oxígeno consumido por minuto y unidad de DO₆₆₀ (Tabla 7). La velocidad de crecimiento de *P.putida* EEZ3 (pWW0-EB62) con estos hidrocarburos como única fuente de carbono concordaba con los resultados señalados, ya que

Sustrato	Actividad	Tiempo de generación (h)
<i>m</i> -xileno	10,5	3,0
<i>p</i> -xileno	6,0	3,5
<i>m</i> -etiltolueno	3,1	10,0
Tolueno	1,4	12,0
<i>p</i> -etiltolueno	0,7	18,0

Tabla 7: Perfil de sustratos de la TO codificada por el plásmido TOL pWW0-EB62. Células de *P.putida* EEZ3 (pWW0-EB62) se cultivaron en medio de cultivo mínimo a 30°C durante 6 horas con *p*-etiltolueno como única fuente de carbono. La actividad TO se estimó polarográficamente mediante el incremento del consumo de oxígeno en respuesta a la adición de 0,5mM de los hidrocarburos indicados. La actividad se expresa en nmoles de oxígeno consumido por minuto y unidad de DO₆₆₀. El tiempo de generación en horas se estimó en cultivos de *P.putida* EEZ3 (pWW0-EB62) en fase exponencial de crecimiento en medio mínimo con los hidrocarburos indicados como única fuente de carbono.

el tiempo de generación de la cepa en medio mínimo con *m*-xileno, *p*-xileno, *m*-etiltolueno, tolueno y *p*-etiltolueno como única fuente de carbono fué de 3; 3,5; 10; 12; y 18 horas respectivamente (Tabla 7).

Al comparar estos datos con los obtenidos para la TO silvestre codificada por el plásmido TOL pWW0 (Tabla 6), se observa que el mutante reconoce *p*-etiltolueno como sustrato y presenta máxima actividad con *m*-xileno, en contraste con la TO silvestre, que presentaba actividad máxima con tolueno y no era capaz de oxidar *p*-etiltolueno.

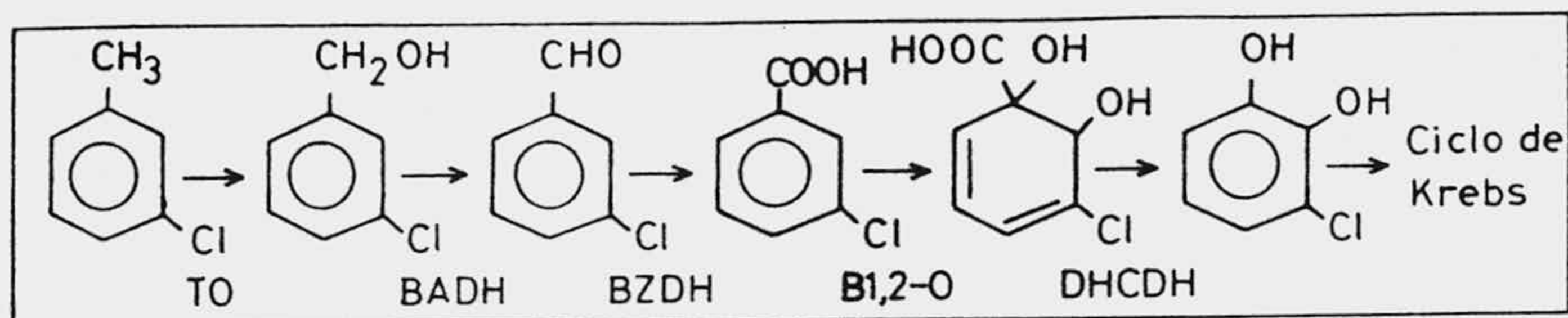
3.1.4.5 Construcción de una ruta para la degradación de *m*-clorotolueno en cepas derivadas de *Pseudomonas* sp. B13.

El *m*-clorobenzoato no se degrada a través de la ruta *meta* codificada por el plásmido TOL debido a que el producto de su descarboxilación y oxidación, el *m*-clorocatecol, inactiva irreversiblemente a la C 2,3-O (Bartels *et al.*, 1984). Además los enzimas que actúan a continuación en la ruta no son capaces de actuar sobre sustratos halogenados, por lo que se planteaba la necesidad de una nueva aproximación experimental para permitir el metabolismo de clorotoluenos, partiendo de cepas en las que el metabolismo de clorobenzoatos fuera permisivo. Dorn *et al.* (1974), aislaron

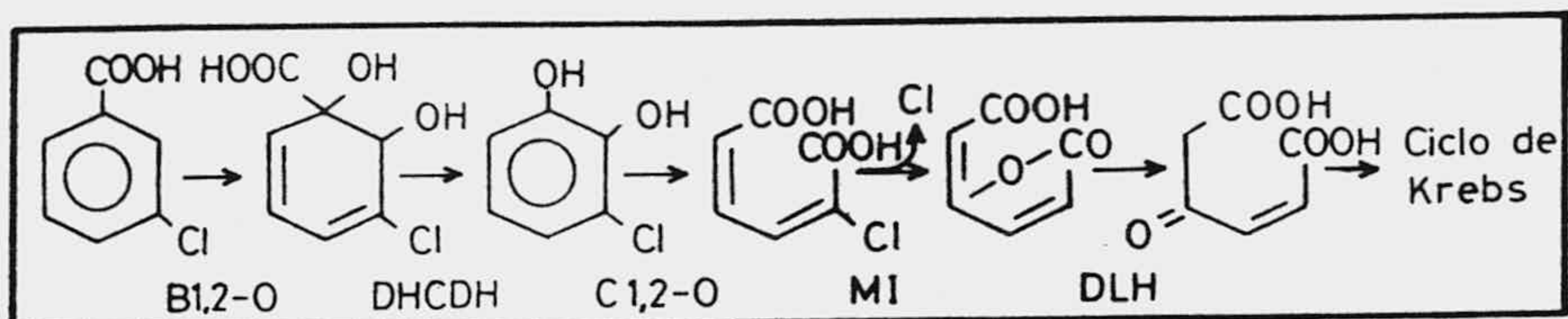
una cepa de *Pseudomonas* denominada B13, capaz de crecer en *m*-clorobenzoato, vía clorocatecol a través de una ruta *orto* modificada (Fig. 23). Esta cepa no crece en *m*-clorotolueno, ya que carece de la maquinaria necesaria para la oxidación de clorotoluenos a clorobenzoatos. Por otro lado, como ya se indicó anteriormente, *P.putida* 2440 (pWW0) acumula *m*-clorocatecol cuando se cultiva con glucosa como fuente de carbono en presencia de *m*-clorotolueno. Dado que la TO de TOL oxida el *m*-clorotolueno a baja velocidad, la transferencia del plásmido TOL a *Pseudomonas* B13 debería permitir el aislamiento de cepas capaces de crecer lentamente en *m*-clorotolueno.

La transferencia por conjugación del plásmido TOL de *P.putida* 2440 (pWW0) a la cepa *Pseudomonas* sp. EEZ4, un derivado Rif^r de *Pseudomonas* sp.B13, permitió el aislamiento de microcolonias transconjugantes que crecían a expensas de *m*-clorotolueno como fuente de carbono (Fig. 23). Sólo uno de los clones aislados, llamado *Pseudomonas* sp. EEZ5, formaba colonias homogéneas en placas de medio de cultivo mínimo con *m*-clorotolueno como única fuente de carbono. En los cultivos de *Pseudomonas* sp. EEZ5 no se observó acumulación de clorocatecoles, lo cual sugiere que se metabolizaron a través de la ruta *orto* modificada de la cepa hospedadora, mientras que la oxidación del *m*-clorotolueno a *m*-clorocatecol era mediada por los enzimas adquiridos del plásmido TOL pWW0 (Fig. 23).

A) TOL



B) B13



C) EEZ5

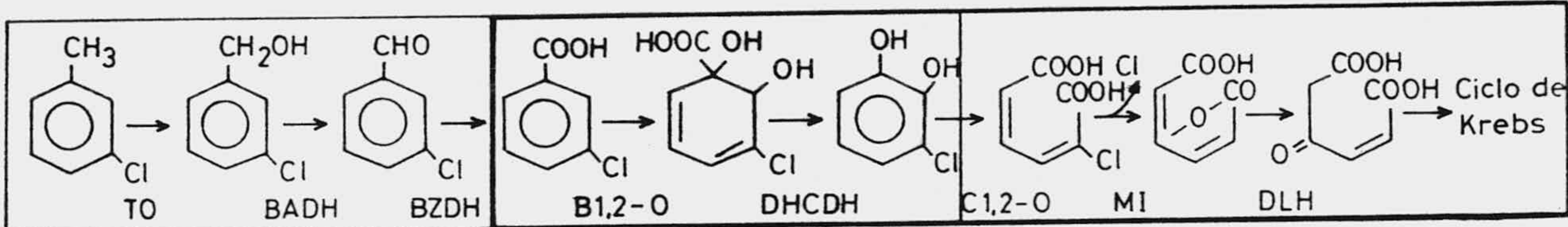


Figura 23: Esquema de la construcción de una ruta para la degradación de *m*-clorotolueno en cepas derivadas de *Pseudomonas* B13. (A) Ruta de degradación de *m*-clorotolueno a *m*-clorocatecol codificada por el plásmido TOL pWW0. (B) Ruta de degradación de *m*-clorobenzoato por *Pseudomonas* B13. (C) Ruta híbrida para la degradación de *m*-clorotolueno por *Pseudomonas* EEZ5. Las abreviaturas usadas para los enzimas son: TO, tolueno monooxigenasa; BADH, alcohol bencílico deshidrogenasa; BZDH, benzaldehido deshidrogenasa; B 1,2-O, benzoato 1,2-dioxigenasa; DHCDH, 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadieno-1-carboxilato deshidrogenasa; C 1,2-O, catecol 1,2-dioxigenasa; MI, mucato cicloisomerasa; DLH, dienolactona hidrolasa.

3.2 Regulación de la transcripción de la ruta "upper": análisis molecular de la estructura y función del promotor Pu.

La secuencia de ADN en 5' con respecto a la primera fase de lectura abierta del operón "upper" del plásmido TOL pWW0 contiene al promotor Pu. La secuencia, determinada por Inouye *et al.* (1984), se confirmó en este trabajo y se presenta en la Figura 24. Este promotor, así como el promotor Ps del gen *xylS*, cuya secuencia fue determinada por Inouye *et al.* (1987a) y Ramos *et al.* (1987a), contienen secuencias consensus 5'-CTGG-3' en -24 y 5'-TTGC-3' en -12 con respecto al punto principal de la iniciación de la transcripción (Fig. 24), y dependen para su transcripción del factor σ^{54} (Dixon, 1986; Inouye *et al.*, 1987a; Ramos *et al.* 1987a). Otros promotores del tipo -12/-24 requieren una proteína activadora para su expresión (NtrC para *glnAp2* de *E.coli*, NifA para los genes *nif* de *Klebsiella*, etc), y contienen secuencias específicas para la unión de estos activadores situadas al menos a 100pb del punto de iniciación de la transcripción (ver Kustu *et al.* 1989 para una revisión). Para determinar la organización física y funcional del promotor Pu se realizaron deleciones, inserciones y mutaciones puntuales del mismo. El análisis de la expresión del promotor silvestre y los mutantes permitió determinar que el promotor Pu contiene tres regiones implicadas en la regulación de su expresión, localizadas con respecto al punto principal de iniciación de la transcripción en -12/ - 24, entre -40 y -80, y entre -130 y -170, y que se requieren para la unión del factor σ^{54} , de la proteína IHF y del regulador XylR, respectivamente.

3.2.1 Análisis de la estructura del promotor Pu mediante deleciones de su extremo 5'.

Con objeto de localizar posibles regiones del promotor Pu implicadas en la regulación de la transcripción del operón "upper" se llevaron a cabo una serie de deleciones progresivas de su extremo 5', utilizando la exonucleasa *Bal31* o sitios de restricción

A)

```

┌─── SmaI ───┐
C C C G G G A A A G C G C G A T G A A C C T T T T T A
G G G C C C T T T C G C G C T A C T T G G A A A A A T

T C G C T G C C T T G A T C A A A T C G A C A G G T G G
A G C G A C G G A A C T A G T T T A G C T G T C C A C C

T T A T G C G C G A T T G A T G A T T T G C T C A A A T
A A T A C G C G C T A A C T A C T A A A C G A G T T T A

A C A G C C A G C G T G C T G T A G A T T T T C T C T C
T G T C G C T C G C A C G A C A T C T A A A A G A G A G

A T A C C C C C C C T T T C T T T T T T A C A A A G A A
T A T G G G G G G A A A G A A A A A A T G T T T C T T

A A T C A A T A A T T T A G A T G A A A T A A G G G G A
T T A G T T A T T A A A T C T A C T T T A T T C C C C T

T C G G T A T A A G C A A T G G C A T G G C G G T T G C
A G C C A T A T T C G T T A C C G T A C C G C C A A C G

T A G C T A T A C G A G A C T T A A A A T A A A A A T A
A T C G A T A T G C T C T G A A T T T T A T T T T A T

┌─── BstEII ───┐
G T G G T G A C C C T T C A A T G T T G T A T T T T C T
C A C C A C T G G G A A G T T A C A A C A T A A A A G A

C A A C T C T G T T C A G A T T G G T T G C T T T C G C
G T T G A G A C A A G T C T A A C C A A C G A A A G C G

C A T G T A T A T C C T C A A A G C G G G A T C C
G T A C A T A T A G G A G T T T C G C C C T A G G
└─── BamHI ───┘
    
```

B)

```

          -25 -24          -13 -12          +1
Pu  A T G G C A T G G C G G T T G C T A G C T A T A C G A G
     | |                | |
Ps  T T G G C G T T A T T T T T G C T T G G A A A A G T G G
    
```

Figura 24: Secuencia del promotor Pu y homología de la secuencia consensus en -12/-24 con Ps. En la secuencia de Pu (A) (Inouye *et al.*, 1984) se señala el punto principal de iniciación de la transcripción (+1) y la primera fase de lectura abierta (flecha), así como los principales sitios de restricción utilizados en este trabajo. En el alineamiento de secuencia de Pu y Ps (B) las bases están numeradas con respecto al punto principal de iniciación de la transcripción. La secuencia de Ps es de Ramos *et al.* (1987a).

introducidos mediante mutagénesis dirigida con oligonucleótidos. La expresión de los promotores delecionados se analizó en fusiones transcripcionales al gen *lacZ* desprovisto de su promotor natural.

3.2.1.1 Deleciones con *Bal31*.

Las deleciones de Pu se realizaron por digestión con la exonucleasa *Bal31* en el plásmido pERD400 linearizado con *EcoRI* (Fig. 25), según se describe en la sección 2.19 de Materiales y Métodos. Tras rellenar los extremos 5' con desoxinucleótidos y el fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa de *E.coli*, el ADN se digirió con *BamHI* y los fragmentos extremo romo-*BamHI* que contenían a los promotores delecionados se clonaron entre los sitios *SmaI-BamHI* del vector para ensayo de promotores pMC1403. Los plásmidos recombinantes obtenidos se transformaron en células competentes de *E.coli* 5K. Entre los transformantes Ap^r, los portadores de fusiones transcripcionales de los promotores delecionados al gen *lacZ* se seleccionaron por digestión de los plásmidos recombinantes con la restrictasa *BstEII* (Fig. 26), ya que ésta tiene una diana en 3' con respecto al punto principal de iniciación de la transcripción de Pu dentro del fragmento clonado (Fig. 24). Para confirmar y estimar la naturaleza de la deleción los plásmidos recombinantes se digirieron con *EcoRI* y *BamHI*, y el tamaño del fragmento menor *EcoRI-BamHI* se estimó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% (p/v). El análisis de estos clones permitió establecer cuatro grupos de deleciones que habían perdido del orden de 50, 100, 150 y 200pb. De cada grupo se escogió un plásmido para su caracterización, y se denominaron pERD402 a pERD405. Para determinar con precisión el tamaño de la deleción, los promotores delecionados de pERD402 a pERD405 se subclonaron como fragmentos *EcoRI-BamHI* en pTZ19 y se secuenciaron; los extremos de los promotores delecionados se encontraron a -200 en pERD402, -88 en pERD403, -40 en pERD404 y -25 en pERD405 (Fig. 27).

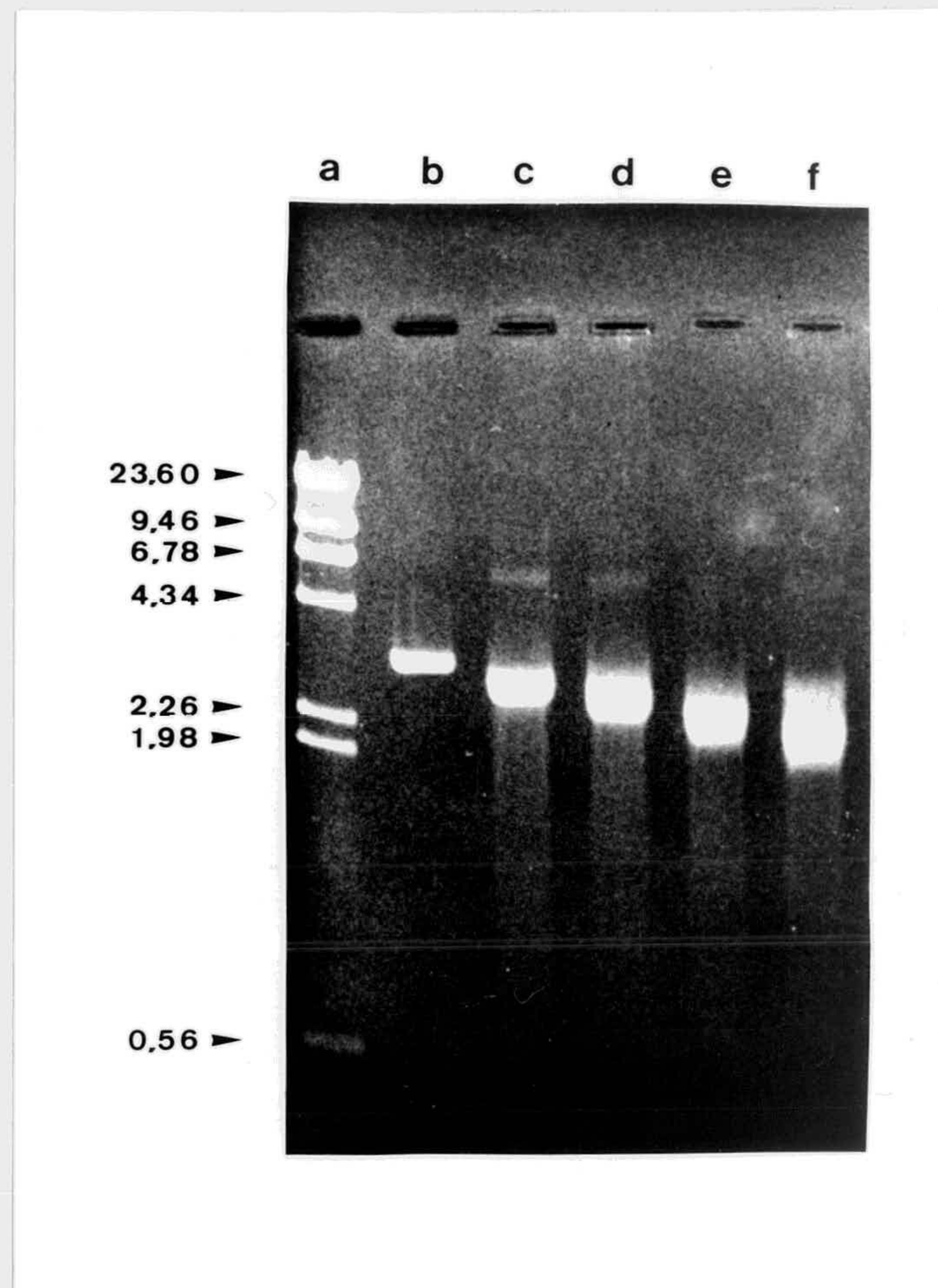


Figura 25: Electroforesis de las deleciones del extremo 5' de Pu con exonucleasa *Bal31*. 8 μ g de pERD400 se linearizaron con *EcoRI* y se sometieron a digestión con 2U de *Bal31* en un volumen de 60 μ l a 30°C. Cada 5 minutos se retiró una alícuota de 10 μ l y la reacción se detuvo con EGTA 0,2M. De cada alícuota se tomaron 3 μ l y se cargaron en un gel de agarosa 0,8% (p/v) en TBE. (a) 0,25 μ g de ADN del fago λ digerido con *HindIII*; los fragmentos de ADN están señalados por flechas y su tamaño se expresa en kb; (b) 0,25 μ g de pERD400 linearizado con *EcoRI*; (c, d, e, f) 3 μ l de las alícuotas extraídas a los 5, 10, 20, y 30 minutos de digestión con *Bal31*.

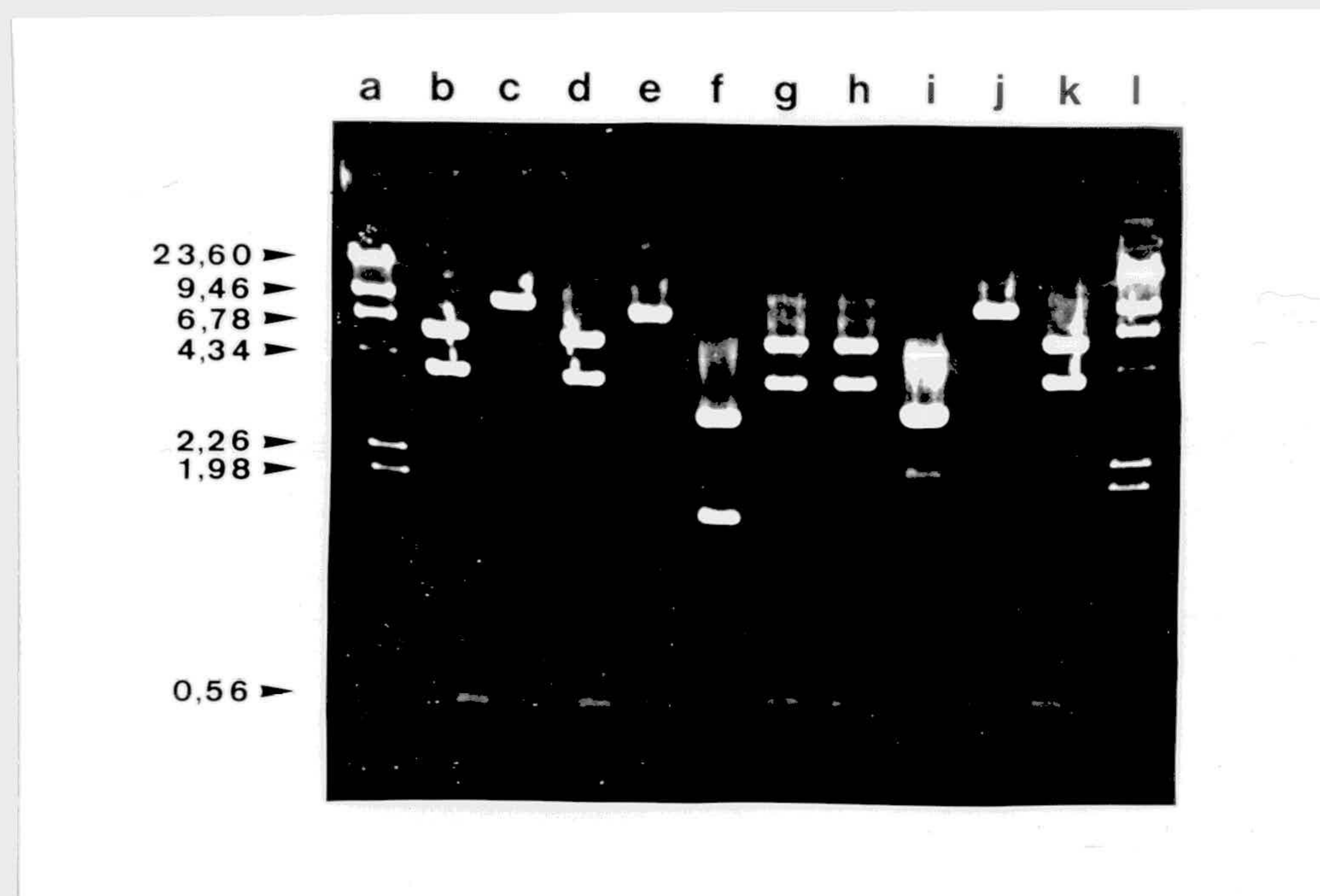


Figura 26: Electroforesis de la restricción con *BstEII* de las fusiones transcripcionales de deleciones de Pu generadas con *Bal31* y clonadas en pMC1403. Los promotores con deleciones de Pu se clonaron como fragmentos extremo romo-*BamHI* en los sitios *SmaI-BamHI* de pMC1403 y se transformaron en células competentes de *E.coli* 5K. 0,5 μ g de los plásmidos extraídos de los transformantes fueron digeridos con *BstEII* y se cargaron en un gel de agarosa 0,8% (p/v) en TBE. (a, l) 0,25 μ g de ADN del fago λ digerido con *HindIII*; Los fragmentos de ADN están señalados por flechas y su tamaño se expresa en kb; (b) 0,5 μ g de pERD401 digerido con *BstEII*; (c) 0,5 μ g de pMC1403 digerido con *BstEII*; (d, g, h, k) plásmidos recombinantes; (e, j) vector sin inserto; (f, i) irrelevantes.

3.2.1.2 Deleciones utilizando sitios de restricción en Pu introducidos mediante mutagénesis dirigida con oligonucleótidos.

Para obtener nuevas deleciones de Pu en la región situada entre -40 y -200 se crearon sitios únicos de restricción en dicha región mediante mutagénesis dirigida con oligonucleótidos. El promotor Pu se clonó como un fragmento *EcoRI-BamHI* en los mismos sitios del polilinker de pERD450 (Fig. 12), obteniéndose el plásmido recombinante pERD406. Para poder introducir en Pu un sitio único de restricción para *PstI* se utilizó como vector en la mutagénesis, en lugar de pERD406 -que contiene dos sitios para *PstI*-, un derivado de pTZ19 al que se había eliminado el sitio único *PstI* por digestión con nucleasa S1 de los extremos 3' monocatenarios generados por restricción con dicho enzima. En este plásmido el promotor Pu se clonó como un fragmento *EcoRI-BamHI* en los mismos sitios del polilinker, obteniéndose el plásmido recombinante pERD407. pERD406 y pERD407 se utilizaron para la preparación de cadenas sencillas uridiladas en la cepa de *E.coli* CJ236. Las cadenas sencillas de pERD406 se hibridaron independientemente con dos oligonucleótidos de síntesis cuya secuencia portaba una única base distinta respecto a la secuencia del promotor silvestre: la hibridación con el oligonucleótido 1 (5'-ACAAAGAAA-ATCGATAATTTAGATG-3') produjo un cambio A(-63)→G subrayado en la secuencia, que creaba un sitio de restricción único *ClaI* en -64, y la hibridación con el oligonucleótido 2 (5'-CAGGTGGTTATTTCGCGATTGATG-3') produjo el cambio G(-147)→T subrayado en la secuencia, que originaba un sitio *NruI* en -144. Las cadenas sencillas de pERD407 se hibridaron con el oligonucleótido 3 (5'-GCCAGC-GTGCTGCAGATTTTCTCTC-3'), que introdujo un cambio T(-108)→C que creó un sitio único *PstI* en -106. Las cadenas extendidas y ligadas se transformaron en células competentes de *E.coli* 5K. Entre los transformantes Ap^r los plásmidos portadores de las mutaciones requeridas se identificaron por la adquisición de los nuevos sitios de restricción. Los plásmidos seleccionados se linearizaron en los sitios únicos de restricción creados por mutagénesis. La restricción con *NruI* generaba extremos romos, mientras que la restricción con *ClaI* y *PstI* generaba extremos cohesivos. Estos últimos se hicieron romos por relleno con los cuatro desoxinucleótidos y el fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa de *E.coli*, y por digestión con nucleasa

S1, respectivamente. Los tres promotores delecionados y con el extremo 5' romo se separaron del vector empleado para la mutagénesis por restricción con *Bam*HI, y se clonaron entre los sitios *Sma*I-*Bam*HI del vector para ensayo de promotores pMC1403 (Fig. 11). Las fusiones transcripcionales obtenidas contenían promotores Pu delecionados desde -64 en pERD410, desde -106 en pERD411 y desde -144 en pERD412 (Fig. 27).

3.2.1.3 Análisis de la expresión de los promotores delecionados.

La expresión de los promotores delecionados y clonados en fase de lectura abierta correcta con el gen *lacZ* en pMC1403, se estimó midiendo los niveles de actividad β -galactosidasa en células de *E. coli* 5K con o sin *xylR* en *trans* en el plásmido pTS174, e incubadas en presencia y ausencia del alcohol *m*-metilbencílico, un efector de XylR (Fig. 27). Como control se utilizó la fusión del promotor Pu silvestre al gen *lacZ* de pMC1403 en el plásmido pERD401.

En ausencia de XylR y en presencia de efector, no se produjo incremento significativo sobre el nivel basal de expresión desde ninguno de los promotores. En las cepas portadoras de *xylR* en el plásmido pTS174 sólo se observó inducción de actividad β -galactosidasa por el alcohol *m*-metilbencílico con el promotor silvestre en pERD401 y con la fusión portadora de la deleción hasta -200 en pERD402. En ambos casos se indujeron niveles de actividad β -galactosidasa en presencia del efector 10 veces superiores a los niveles basales. Con la fusión portadora de la deleción hasta -144 en pERD412 en presencia de efector se observó repetitivamente un incremento de hasta 2 veces del nivel de actividad β -galactosidasa por encima del nivel basal. En contraste, con el resto de las deleciones se había perdido la capacidad de estimulación por XylR de la expresión de Pu. Esto sugiere que las regiones de Pu comprendidas entre -63 y -144, y entre -144 y -200 deben contener secuencias implicadas en la inducción del promotor de la ruta "upper" por efectores de XylR.

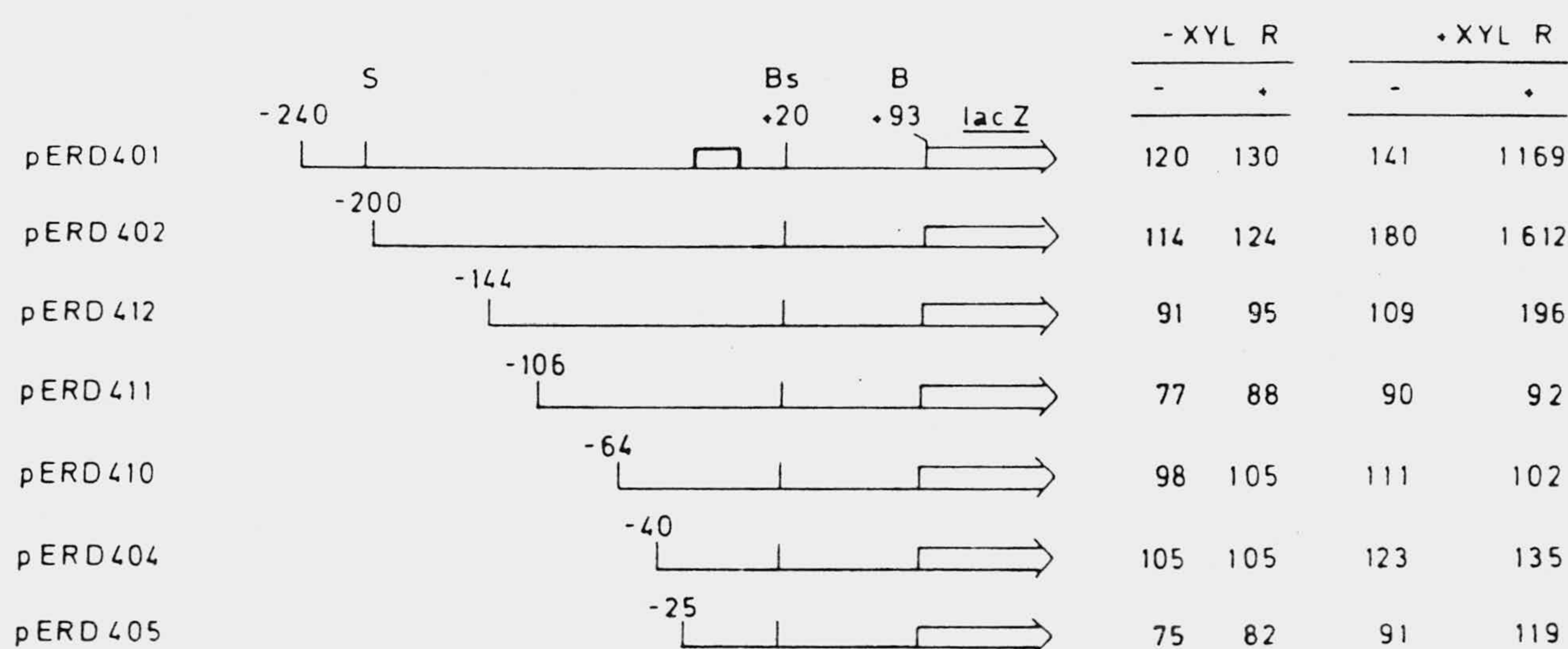


Figura 27: Expresión de promotores con deleciones de Pu en fusiones transcripcionales al gen *lacZ* de pMC1403. Los plásmidos indicados portando deleciones progresivas del extremo 5' del promotor Pu se transformaron en células competentes de *E. coli* 5K con pTS174 (+XylR) o sin pTS174 (-XylR). Los transformantes se cultivaron en LB suplementado con los antibióticos correspondientes a 30°C durante 6 horas, en presencia (+) o ausencia (-) de 5mM de alcohol *m*-metilbencílico. La expresión de los promotores se estimó como actividad β -galactosidasa (U) en células permeabilizadas, y los valores dados representan la media de 3 a 6 determinaciones independientes, con una desviación estándar del 10% al 30%. Los símbolos empleados para los sitios de restricción son: B, *Bam*HI; Bs, *Bst*EII; S, *Sma*I. La caja representa la región de -12/-24, y la flecha representa el gen *lacZ* y la dirección de su transcripción. Asimismo se indican los puntos exactos de las deleciones.

3.2.2 Localización de secuencias activadoras remotas mediante ensayos de improntas *in vivo*.

Con objeto de determinar con mayor detalle las secuencias de Pu implicadas en la regulación de su transcripción por XylR -localizadas mediante análisis de deleciones del promotor- se realizaron ensayos de improntas *in vivo* de Pu en el plásmido pRD579. Los ensayos de protección se realizaron en células de *E.coli* 5K con y sin *xylR* en *trans* en el plásmido pTS174, cultivadas en presencia y ausencia del alcohol *m*-metilbencílico a concentración 5mM. El ADN plasmídico metilado *in vivo* se extrajo por el procedimiento descrito en la sección correspondiente de Materiales y Métodos, y se cortó con piperidina en las guaninas (G) metiladas por dimetilsulfato (DMS). En las autorradiografías de la separación electroforética de los oligonucleótidos marcados y extendidos sobre las cadenas cortadas con piperidina (Figs. 28 y 29) se comparó la intensidad de las bandas de ADN metilado en presencia de XylR con sus correspondientes a la metilación en ausencia de XylR, considerándose por separado la metilación en presencia y ausencia de alcohol *m*-metilbencílico. Las autorradiografías mostraban tres zonas del promotor Pu con el patrón de bandas alterado por XylR (Figs. 28 y 29); dos de las zonas eran distales con respecto al sitio de unión del holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa, y aparecían alrededor de las regiones de -130 y -160, mientras que la tercera región era proximal al sitio de unión del holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa y estaba comprendida entre -45 y -92 (Figs. 28 y 29). En ésta última región se observó metilación de los residuos de timina (T) correspondientes a las posiciones -45 en la cadena inferior (Fig. 29) y -84 en la cadena superior (Fig. 28). La protección o hiperexposición de las Gs a la metilación por DMS se cuantificó mediante análisis densitométrico de las autorradiografías, y se estimó como el logaritmo de la relación entre las áreas densitométricas de cada banda en ausencia y presencia de XylR (Fig. 30); los valores positivos indican protección de las Gs por XylR, y los valores negativos hipermetilación de las Gs en presencia de XylR.

En la región más alejada del punto de iniciación de la transcripción se observó el siguiente patrón de metilación en la cadena superior: protección de la G -160

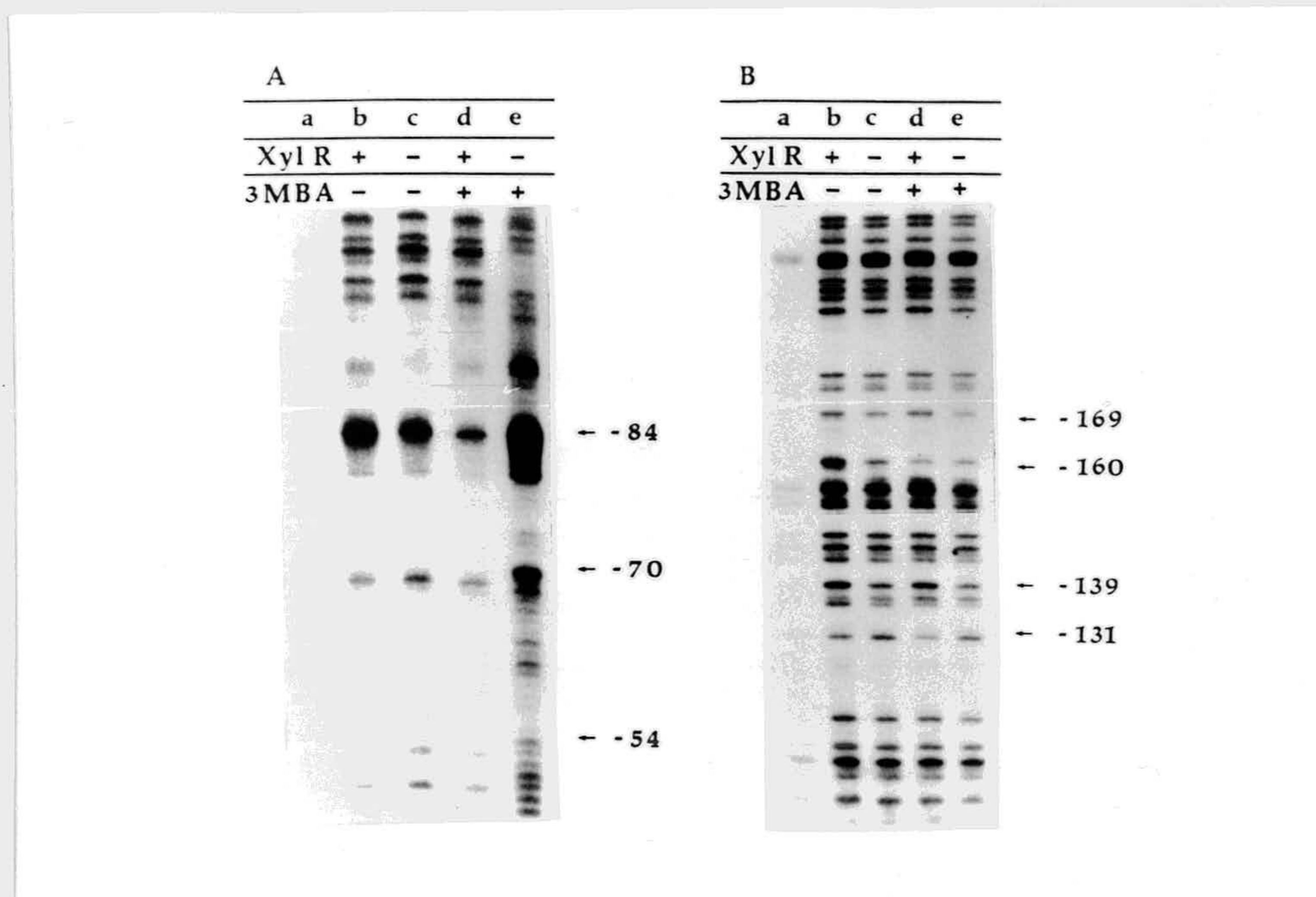


Figura 28: Autorradiografía de la cadena superior de Pu cortada con piperidina en las Gs metiladas *in vivo*. Células de *E.coli* 5K (pRD579) (c y e) o de *E.coli* 5K (pRD579, pTS174) (b y d) incubadas en presencia (d y e) y en ausencia (b y c) de 5mM de alcohol *m*-metilbencílico se expusieron a DMS. El ADN metilado se extrajo, se cortó con piperidina y se hibridó con el oligonucleótido 5'-CAGAGTTGAGAAAATACAAC-3' marcado con γ - ^{32}P -ATP. Después de extender las cadenas sencillas como se indica en Materiales y Métodos los productos de la extensión se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (p/v) en TBE. (a) pRD579 metilado *in vitro*. (A) Región comprendida entre -45 y -92; (B) región comprendida entre -118 y -184. Las posiciones que muestran protección o hipermetilación están señaladas por flechas y numeradas.

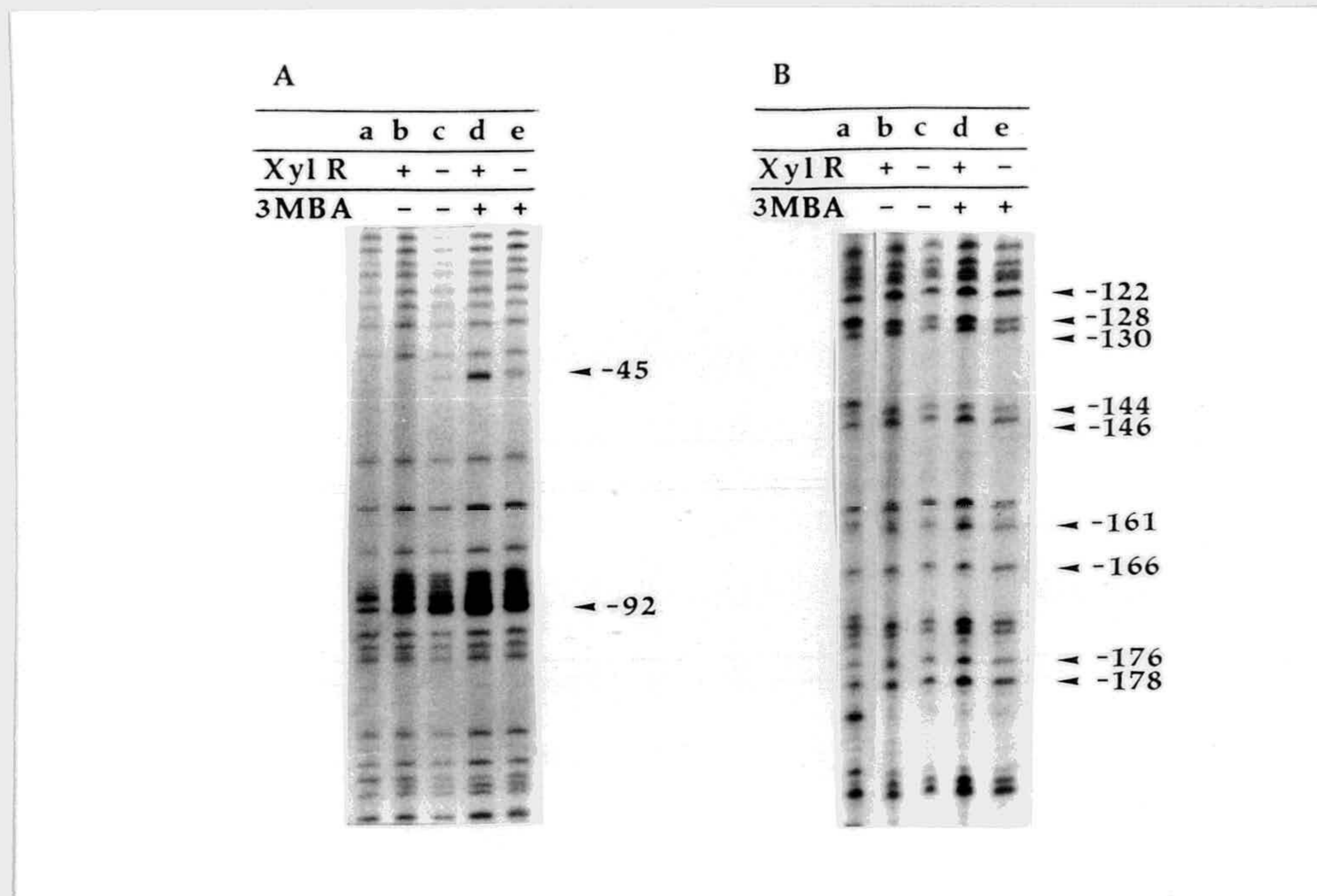


Figura 29: Autorradiografía de la cadena inferior de Pu cortada con piperidina en las Gs metiladas *in vivo*. Células de *E.coli* 5K (pRD579) (c y e) o de *E.coli* 5K (pRD579, pTS174) (b y d) incubadas en presencia (d y e) y en ausencia (b y c) de 5mM de alcohol *m*-metilbencílico se expusieron a DMS. El procesamiento del ADN y la electroforesis se realizaron como se indica en la Figura 28. (a) pRD579 metilado *in vitro*. (A) Región comprendida entre -128 y -3 ; (B) región comprendida entre -188 y -111. Las posiciones que muestran protección o hipermetilación están señaladas por flechas y numeradas.

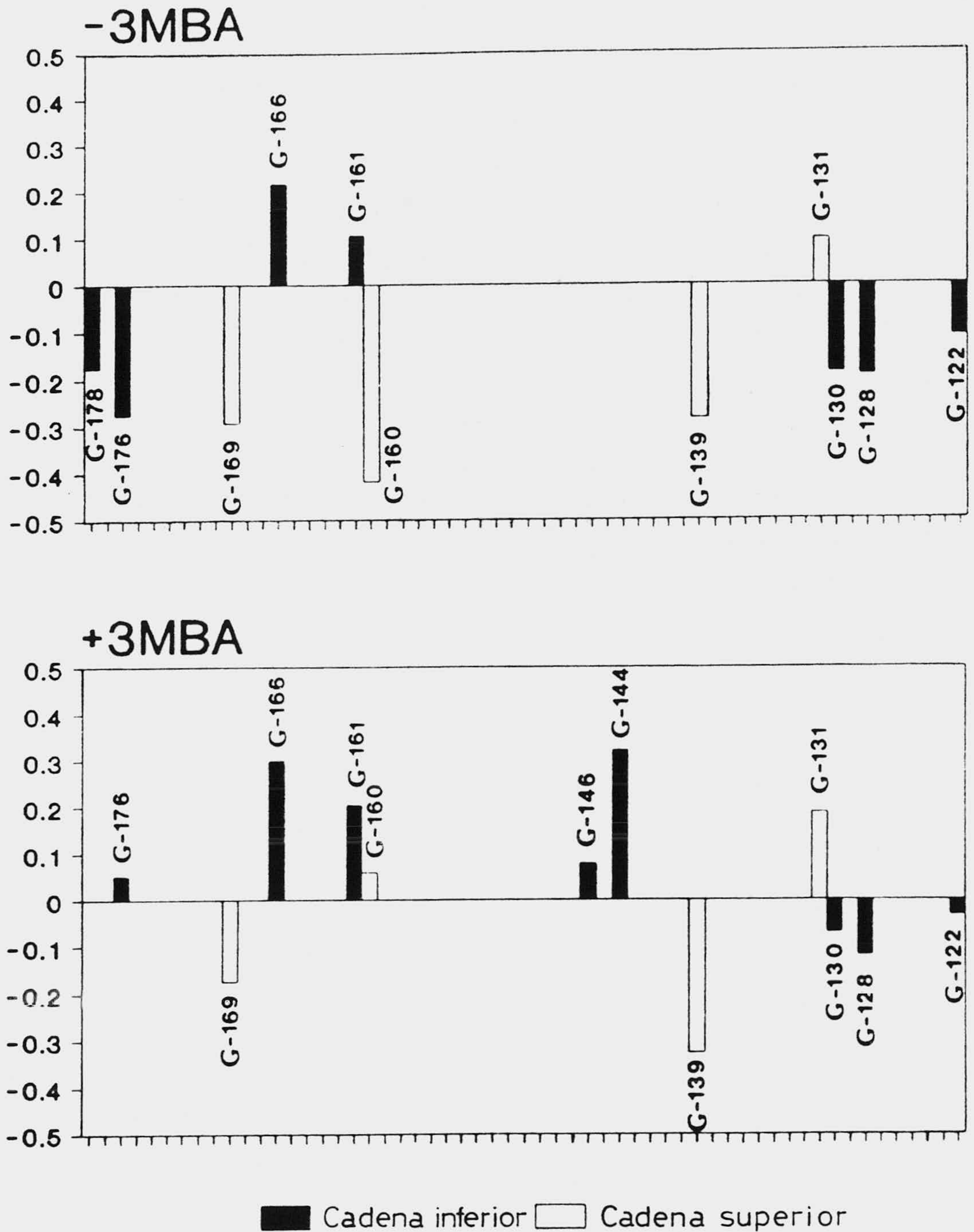


Figura 30: Densitometría de las autorradiografías de los ensayos de improntas *in vivo* de Pu. La intensidad de las bandas de las autorradiografías de las Figuras 28 y 29 se cuantificó por densitometría. La protección o hipermetilación se estimó como el log de la relación entre las áreas densitométricas de cada banda en ausencia y presencia de XylR. Los valores positivos indican protección y los negativos hipermetilación. Las Gs pertenecientes a la cadena superior se representan como barras huecas; las Gs de la cadena inferior como barras sólidas. (A) Gs metiladas en ausencia de alcohol *m*-metilbencílico. (B) Gs metiladas en presencia de alcohol *m*-metilbencílico.

en presencia de efector e hipermetilación en su ausencia, e hipermetilación de la G-169 en ambos casos (Fig. 30). En la cadena inferior, las G-176 y G-178 mostraban hipermetilación en ausencia del alcohol *m*-metilbencílico, y la G-176 mostraba protección en presencia del efector, mientras las G-161 y G-166 estaban protegidas en ambos casos, pero con mayor intensidad en presencia de efector (Fig. 30).

En la región de -130, las G-131 y G-139 de la cadena superior aparecían respectivamente protegida e hipermetilada, independientemente del efector (Fig. 30). En la cadena inferior, las G-122, G-128 y G-130 estaban hipermetiladas tanto en presencia como en ausencia de efector, mientras las G-144 y G-146 sólo mostraban protección en presencia del alcohol *m*-metilbencílico (Fig. 30).

La región proximal al punto de iniciación de la transcripción mostraba protección de las G-54 y G-70 de la cadena superior independientemente de la presencia de efector, mientras que la T-84 mostraba protección con efector e hipermetilación sin él. La G-92 y la T-45 de la cadena inferior estaban hipermetiladas en presencia de alcohol *m*-metilbencílico, pero protegidas en su ausencia (Figs. 28 y 29). Aunque el ensayo de improntas *in vivo* se basa en la reacción del DMS con las Gs, la metilación de las Ts por DMS ha sido descrita con anterioridad (Minchin *et al.*, 1989; Sasse-Dwight *et al.*, 1988; Serrano *et al.*, 1990).

3.2.3 Análisis de las secuencias delimitadas mediante ensayos de improntas *in vivo*.

El análisis de la secuencia de las tres regiones delimitadas mediante los ensayos de protección *in vivo* muestra que las dos zonas distales del punto de iniciación de la transcripción contienen secuencias homólogas con palíndromos casi perfectos de 4pb (-173 5'-CCTTN₄AAAT-3' -162 y -135 5'-ATTTN₄AAAT-3' -124). La delección de una o ambas zonas conducían a la pérdida de actividad inducida del promotor Pu (Fig. 27), mientras que la delección de la región de -170 conducía a una disminución notable de la actividad inducida de Pu, por lo que estas regiones se denominaron secuencias activadoras remotas (UASs) 1 y 2, respectivamente (Fig. 31). La región comprendida entre -45 y -92 era rica en As y Ts, y no presentaba homología alguna

con las anteriores; sin embargo, contiene una secuencia entre -55 y -67 que es 100% homóloga al sitio de unión del factor de integración del hospedador (IHF) (Friedman, 1988; Hoover *et al.*, 1990). Estas regiones se encuentran conservadas en el promotor del gen *xylS*, que también se activa por XylR y pertenece al grupo de promotores del tipo -12/-24 dependientes de σ^{54} (Fig. 32).

3.2.4 Análisis de la interacción de XylR con las secuencias activadoras remotas.

Con objeto de conocer los requerimientos de secuencia y posicionamiento de los sitios de unión de XylR al promotor Pu se crearon una serie de mutaciones en la región del promotor que contiene las secuencias activadoras remotas y se analizó la capacidad de inducción de los promotores mutantes por XylR activado por alcohol *m*-metilbencílico.

3.2.4.1 Alteración de la distancia entre UAS1 y UAS2.

Mediante mutagénesis dirigida de Pu en pERD406 con el oligonucleótido 2, cuya secuencia se definió en el apartado 3.2.1.2, se introdujo un cambio G(-147)→T que creaba un sitio único de restricción para el enzima *NruI* en -144. El plásmido obtenido se linearizó por digestión con *NruI* y entre los extremos romos generados se insertó un linquer *HpaI* de 6pb (5'-GTTAAC-3') o un linquer *NcoI* de 10pb (5'-AGCCATGGCT-3'), de modo que las regiones UAS1 y UAS2 quedaron, en el primer caso, separadas por media vuelta de hélice aproximadamente y, por tanto, en caras opuestas, y en el segundo caso quedaron en la misma cara de la hélice, pero separadas por un giro más que en el promotor silvestre. Ambos promotores mutantes se clonaron como fragmentos *EcoRI-BamHI* frente a *lacZ* en pMC1403 para obtener las fusiones transcripcionales pERD419 (∇ 6pb en -144) y pERD420 (∇ 10pb en -144).

La expresión de los promotores mutantes se estimó como actividad β -galactosidasa en células de *E.coli* S90C con y sin *xylR* en el plásmido pTS174, en presencia y ausencia de alcohol *m*-metilbencílico. Como testigo se utilizó la fusión del promotor

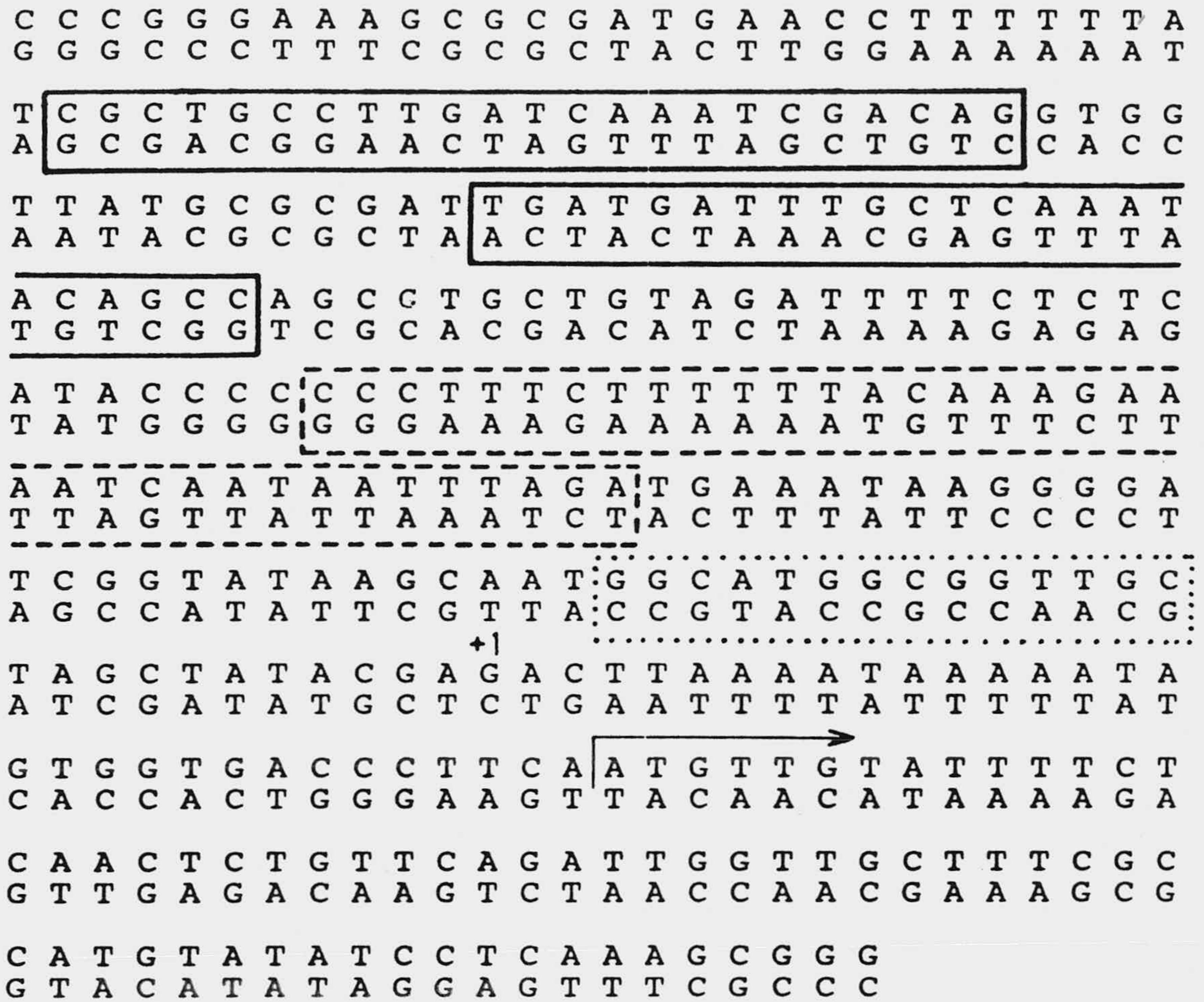


Figura 31: Estructura del promotor de la ruta "upper" codificada por el plásmido TOL pWW0 de *P.putida*. Se señalan los sitios de unión de XylR, UAS1 y UAS2, (cajas cerradas), el sitio de unión del factor IHF (caja a trazos), y el sitio de unión de la ARN-polimerasa y σ^{54} (caja punteada). El punto principal de iniciación de la transcripción se encuentra en +1, y la primera fase de lectura abierta se indica por una flecha.

Consensus de IHF		WATCAANaAgTTR	
Pu	-67	AATCAATAATTTA	-55
Ps distal	-152	AACCAATTGATTA	-140
Ps proximal	-47	AAAGAACGTGTTC	-35

Figura 32: Alineamiento de la secuencia consensus de IHF con las secuencias de Pu y Ps. La secuencia consensus propuesta para la unión de IHF es de Hoover *et al.* (1990). La secuencia de Pu es de Inouye *et al.* (1984), y la de Ps de Ramos *et al.* (1987a). Las bases están numeradas con respecto al sitio principal de iniciación de la transcripción. W puede ser A o T; R puede ser A o G.

silvestre en pERD401 en la misma cepa (Tabla 8).

En las cepas sin XylR todos los promotores presentaron bajos niveles de actividad β -galactosidasa, tanto en presencia como en ausencia de efector. En células portadoras de XylR y en presencia del efector el nivel de actividad β -galactosidasa expresada desde el promotor en pERD419 se redujo al 25% del nivel expresado por el promotor silvestre (Tabla 8). La separación de las regiones UAS1 y UAS2 por un giro completo de la hélice en pERD420 tuvo un mayor efecto sobre la expresión de Pu, ya que los niveles de actividad β -galactosidasa inducida fueron del 16% de la registrada en el tipo silvestre (Tabla 8).

3.2.4.2 Mutagénesis de las secuencias de UAS1 y UAS2.

La secuencia de las regiones UAS1 y UAS2 de Pu se alteró en aquellos puntos que los ensayos de improntas *in vivo* y los análisis de homología de secuencia indicaban como posibles puntos de interacción con XylR.

Las cuatro Gs de la cadena superior protegidas o hipermetiladas en presencia de XylR se sustituyeron por As mediante mutagénesis dirigida de Pu en pERD406 utilizando los siguientes oligonucleótidos: (5'-TATGCGCGATTGATGATTTACTCAA-3'), (5'-GGTTATGCGCGATTAATGATTTGC-3'), (5'-CAAATCAACAGGTGGTTATGCGCGA-3'), y (5'-TTAATCAAATCGACAGGTGGTTATGCG-3'). La extensión de las cadenas generó sustituciones G→A en las posiciones -131, -139, -160 y -169. Las mutaciones se comprobaron mediante secuenciación del ADN, y los promotores mutantes se clonaron como fragmentos *EcoRI-BamHI* en pMC1403, obteniéndose las fusiones transcripcionales pERD424 [G(-131)→A], pERD425 [G(-139)→A], pERD426 [G(-160)→A] y pERD427 [G(-169)→A].

En la región activadora remota más alejada del punto de iniciación de la transcripción, la región denominada UAS1, la secuencia palindrómica de 6pb con homología en UAS2 no es perfecta, ya que presenta dos bases que rompen el palíndromo: -173 5'-CCTTN₄AAAT-3' -162 (Fig. 6). El promotor del gen *xylS*, Ps, que también requiere XylR para su activación, contiene secuencias homólogas a los palíndromos de Pu, lo cual sugería que estas regiones están implicadas en el reconocimiento o interacción con XylR (Holtel *et al.*, 1990). Con objeto de profundizar en la función

Plásmido	Actividad β -galactosidasa (U)		
	<i>m</i> -MBA	-XylR	+XylR
pERD401 (silvestre)	-	67	96
	+	61	1512
Inserciones			
pERD419 (∇ 6pb en -144)	-	75	92
	+	69	388
pERD420 (∇ 10pb en -144)	-	75	98
	+	72	245
Mutaciones en Gs de UAS			
pERD424 [G(-131) \rightarrow A]	-	62	73
	+	60	1510
pERD425 [G(-139) \rightarrow A]	-	58	78
	+	52	1334
pERD426 [G(-160) \rightarrow A]	-	61	75
	+	60	1487
pERD427 [G(-169) \rightarrow A]	-	52	65
	+	55	803
Mutaciones en el palíndromo			
pERD428 [C(-172) \rightarrow T]	-	50	65
	+	48	1832
pERD429 [C(-173) \rightarrow A]	-	58	66
	+	53	1864
pERD430 [CC(-173,-172) \rightarrow AT]	-	56	68
	+	51	2264

Tabla 8: Expresión de promotores mutantes de Pu en la región de las secuencias activadoras remotas. Células de *E. coli* S90C sin pTS174 (-XylR) o con pTS174 (+XylR), portadoras de los plásmidos indicados en la tabla se cultivaron en LB suplementado con los antibióticos correspondientes a 30°C durante 6 horas, en presencia (+) o ausencia (-) de 5mM de alcohol *m*-metilbencílico (*m*-MBA), y entonces se determinó la actividad β -galactosidasa en células permeabilizadas. Los valores indicados son la media de al menos tres determinaciones independientes. La desviación estándar fué del orden del 5% al 20%.

de estas regiones en la activación de Pu, las Cs que rompen el palíndromo en la región UAS1 se sustituyeron individualmente o ambas a la vez para mejorar la homología del palíndromo, mediante mutagénesis dirigida con oligonucleótidos. El promotor Pu en pERD406 se mutagenizó utilizando los siguientes oligonucleótidos: (5'-CCTTTTTTATCGCTGCTTTGATCAAATCG-3'), que introducía un cambio C(-172) → T; (5'-CCTTTTTTATCGCTGACTTGATCAAATCG-3'), que introducía un cambio C(-173) → A, y (5'-CCTTTTTTATCGCTGATTTGATCAAATCG-3') que introducía dos cambios simultáneos CC(-173,-172) → AT. Los promotores mutantes se clonaron en pMC1403, y los plásmidos obtenidos se llamaron pERD428 [C(-172) → T], pERD429 [C(-173) → A] y pERD430 [CC(-173, -172) → AT].

La expresión de los promotores mutantes en las fusiones construidas se estimó como actividad β -galactosidasa en células de *E. coli* S90C con y sin *xyIR* en el plásmido pTS174, en presencia y ausencia de alcohol *m*-metilbencílico (Tabla 8). Como testigo se utilizó el promotor silvestre en condiciones similares. Los cambios G → A en -131, -139, y -160 no afectaron significativamente a la expresión de Pu, ya que los niveles de actividad β -galactosidasa siguieron el mismo patrón de inducción por XylR y su efector que el promotor silvestre. En contraste, la mutación G(-169) → A en pERD427 conducía a un nivel de expresión más bajo que el silvestre, con una actividad máxima inducida del 53% respecto al silvestre.

Las mutaciones en el palíndromo de la región UAS1 tuvieron un efecto positivo sobre la inducción de Pu. El patrón de inducción por XylR activado por alcohol *m*-metilbencílico fué similar en los promotores mutantes y en el silvestre, esto es, bajos niveles basales en ausencia de XylR o en presencia de XylR sin efector, y altos niveles de actividad en presencia de XylR y efector. Sin embargo, los niveles de actividad máxima inducida en los promotores mutantes aumentaban con respecto a la actividad del promotor silvestre a medida que las secuencias mutantes se aproximaban más a un palíndromo perfecto: así, en pERD428 y pERD429, que tienen una base cambiada, la actividad inducida fué aproximadamente un 25% superior a la inducida en el tipo silvestre, y en pERD430, que contiene la secuencia palindrómica perfecta, fué alrededor de un 50% superior a la del promotor silvestre.

3.2.5 Localización de la secuencia de unión del factor de integración del hospedador (IHF).

3.2.5.1 Expresión de Pu en mutantes de *E.coli* defectivos en IHF.

Con objeto de comprobar el requerimiento de IHF para la expresión del promotor Pu por XylR se analizó su expresión en fusiones transcripcionales Pu::*lacZ* en cepas isogénicas de *E.coli* productoras y defectivas en IHF.

La expresión de Pu en pRD579 y en pERD401 se estimó como actividad β -galactosidasa en células de *E.coli* S90C y su cepa isogénica DBP101 defectiva en la síntesis de IHF, con y sin *xylR* en *trans* en el plásmido pTS174, en presencia y ausencia del alcohol *m*-metilbencílico (Tabla 9). En ambas fusiones se midieron bajos niveles de expresión basal desde Pu tanto en la cepa IHF⁺ como en la cepa IHF⁻ en ausencia de XylR e independientemente de la presencia o ausencia del efector. Con *xylR* en *trans* y en ausencia de alcohol *m*-metilbencílico los niveles de actividad β -galactosidasa eran similares en las dos cepas; sin embargo, en presencia de XylR y efector los niveles de expresión de Pu aumentaron en ambas cepas, pero en DBP101 (IHF⁻) fueron sólo del orden del 25% de los niveles obtenidos en S90C (IHF⁺), tanto con pRD579 como en pERD401. Estos resultados sugieren la participación de IHF en la expresión de Pu.

3.2.5.2 Mutagénesis de la secuencia de unión de IHF.

Para estudiar la implicación de la región de Pu comprendida entre -45 y -92 en la expresión inducida del promotor se provocaron alteraciones de su secuencia mediante mutaciones puntuales, inserciones y deleciones.

Mediante mutagénesis dirigida de Pu en pERD406 con el oligonucleótido 1, cuya secuencia se definió en el apartado 3.2.1.2, se introdujo un cambio A(-63)→G que generaba un sitio único de restricción para *Cla*I. El plásmido resultante se linearizó con dicha restrictasa, y los extremos cohesivos generados se rellenaron como se ha descrito anteriormente. Los extremos romos se ligaron, obteniéndose un segundo mutante con una inserción GC en -64. La ligación anterior se repitió en presencia de un linquer *Hpa*I de 6pb, de manera que se obtuvo un tercer mutante con una

Plásmidos	Actividad β -galactosidasa (U)		
	<i>m</i> -MBA	IHF-	IHF+
pRD579 (silvestre)	-	58	49
	+	56	47
pRD579, pTS174	-	73	62
	+	377	1544
pERD401 (silvestre)	-	43	40
	+	40	39
pERD401, pTS174	-	52	49
	+	297	1245
pERD414 [A(-63)→G]	-	41	45
	+	45	47
pERD414, pTS174	-	54	54
	+	350	960
pERD415 (∇ 2pb en -64)	-	44	48
	+	40	44
pERD415, pTS174	-	50	67
	+	243	210
pERD416 (∇ 8pb en -64)	-	32	38
	+	39	45
pERD416, pTS174	-	55	63
	+	287	234
pERD417 (Δ -64 a -111)	-	8	11
	+	10	11
pERD417, pTS174	-	10	10
	+	63	57

Tabla 9: Expresión de Pu y sus mutantes en la región de -64 en cepas de *E. coli* productoras y defectivas en IHF. Células de *E. coli* S90C (IHF⁺) o DBP101 (IHF⁻) portadoras de los plásmidos indicados en la tabla se cultivaron en LB suplementado con los correspondientes antibióticos a 30°C durante 6 horas, en presencia (+) o ausencia (-) del alcohol *m*-metilbencílico (*m*-MBA) a concentración 5mM. La actividad β -galactosidasa se determinó en células permeabilizadas. Los datos son la media de al menos tres determinaciones independientes con una desviación estándar del orden del 5% al 20%. ∇ inserción del número de bases indicadas en la posición -64; Δ delección de la región -64 a -111.

inserción de 8pb (5'-CGGTTAAC-3') en -64.

La Figura 33 resume la construcción de una deleción interna en Pu entre -64 y -111 con respecto al punto principal de iniciación de la transcripción. Para obtener la deleción interna se utilizaron dos mutantes de Pu contruidos previamente: el mutante portador de un sitio para *ClaI* en -64 ya descrito, y el mutante portador de un sitio para *PstI* en -106 cuya construcción se describió en el apartado 3.2.1.2. Este último se linearizó con *PstI*, y los extremos 3' monocatenarios generados se hicieron romos por digestión con nucleasa S1. Por restricción en 5' con *EcoRI* se obtuvo un fragmento *EcoRI*-extremo romo de 130pb que contenía la secuencia de Pu entre -111 y -240 con respecto al punto inicial de la transcripción. De manera análoga se eliminó el fragmento *EcoRI-ClaI* de 194pb en el mutante portador del sitio para *ClaI* en -64, de modo que el fragmento largo contenía la secuencia de Pu en 3' con respecto a -64. La clonación del fragmento *EcoRI-PstI* romo entre los sitios *EcoRI-ClaI* relleno del mutante portador del sitio para *ClaI* permitió generar una deleción interna desde -64 a -111 (Fig. 33).

Los cuatro promotores mutantes se clonaron como fragmentos *EcoRI-BamHI* frente al gen *lacZ* de pMC1403, obteniéndose las fusiones transcripcionales pERD414 [A(-63)→G], pERD415 (∇2pb en -64), pERD416 (∇8pb en -64) y pERD417 (Δ - 64 a -111). La expresión de los promotores mutantes se estimó como actividad β-galactosidasa en células de *E.coli* S90C y en su cepa isogénica DBP101 defectiva en la síntesis de IHF, portando o no el plásmido pTS174 y en presencia o ausencia del alcohol *m*-metilbencílico a concentración 5mM (Tabla 9). Como testigo en estos ensayos se utilizó el promotor silvestre Pu en pERD401 en las mismas condiciones descritas para los mutantes (Tabla 9).

La deleción interna de Pu en pERD417 tuvo un efecto drástico sobre la expresión del promotor. Los niveles de expresión basal en ambas cepas fueron alrededor de 4 veces más bajos que los del promotor silvestre en pERD401, aunque en presencia de XylR y el efector la actividad β-galactosidasa aumentó hasta niveles similares a los basales del tipo silvestre. El resto de los promotores mutantes expresaron niveles basales de actividad β-galactosidasa similares a los del promotor silvestre en ambas cepas, tanto sin XylR como con XylR en ausencia de efector. Sin embargo,

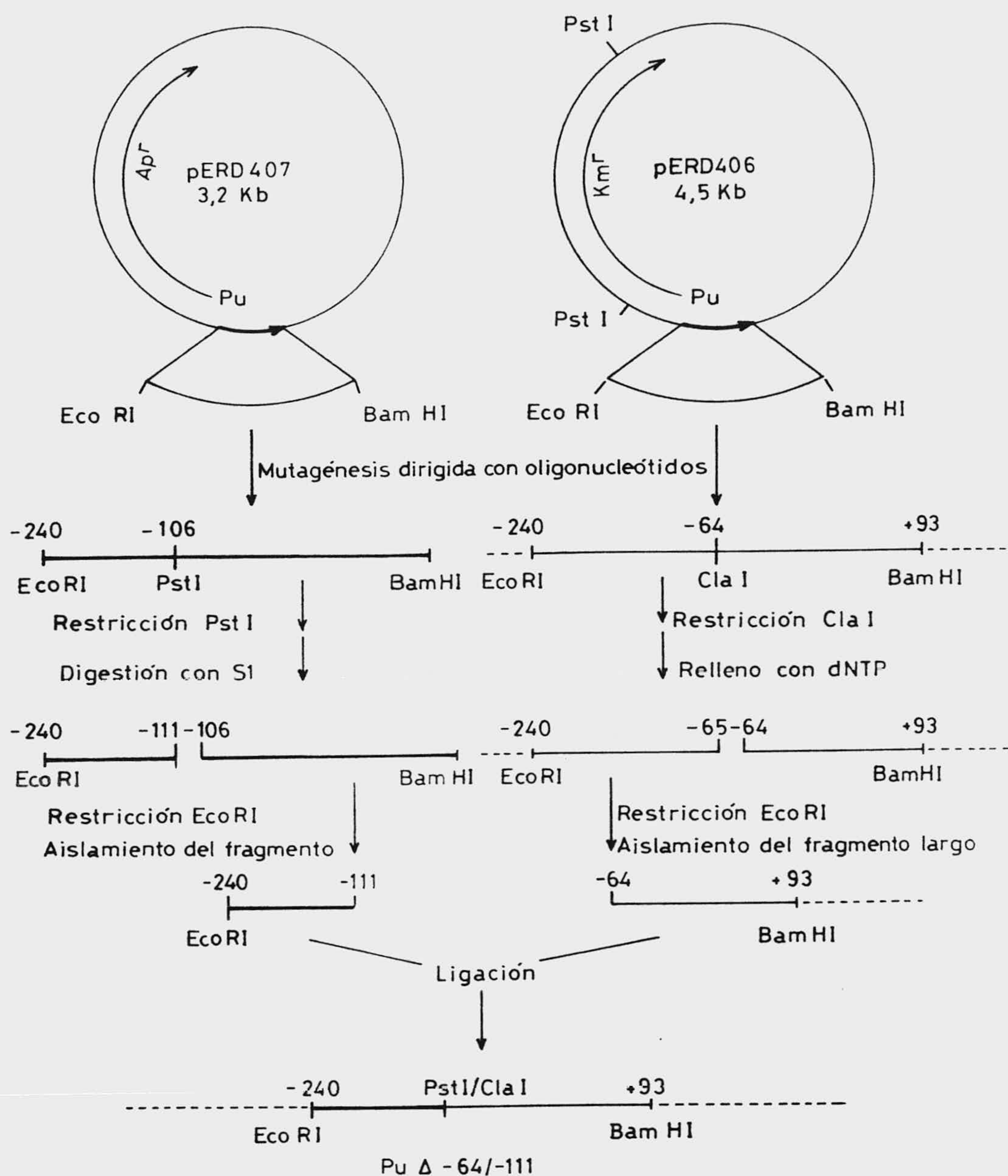


Figura 33: Construcción de una deleción interna de Pu entre -64 y -111. El derivado de pERD407 que contiene un sitio único *PstI* se linearizó con dicha restrictasa, y los extremos cohesivos 3' se hicieron romos por digestión con exonucleasa S1. Por restricción con *EcoRI* se obtuvo un fragmento de 130pb que se aisló por electroforesis en un gel de agarosa al 1,8% (p/v) en TBE y se recuperó del mismo por extracción con "GeneClean". El derivado de pERD406 con un sitio único *ClaI* se linearizó con dicha restrictasa y los extremos cohesivos 5' se rellenaron con los cuatro desoxinucleótidos y el fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa de *E.coli*. Por restricción con *EcoRI* se obtuvo un fragmento de 4,2kb que se recuperó de un gel de agarosa 0,8% (p/v) en TBE con "GeneClean". Por ligación del fragmento *EcoRI-PstI* romo de 130pb entre los sitios *EcoRI-ClaI* relleno, se obtuvo un promotor Pu con una deleción interna de -64 a -111. La línea discontinua representa al vector pERD450.

es de interés analizar en detalle el comportamiento de los promotores mutantes en las cepas IHF⁻ e IHF⁺ en condiciones de inducción, es decir, en presencia de XylR y alcohol *m*-metilbencílico. Con los tres promotores mutantes en pERD414, pERD415, y pERD416 los niveles de expresión en condiciones de inducción en la cepa IHF⁻ fueron de 5 a 7 veces superiores a sus niveles basales y similares a los niveles de expresión del promotor silvestre en la misma cepa. En contraste, en la cepa IHF⁺ la mutación puntual en -63 retenía un 77% de actividad respecto al tipo silvestre, mientras que los mutantes portadores de inserciones de 2pb o de 8pb mostraban sólo niveles de actividad β -galactosidasa del orden del 16%-18% de la determinada con el promotor silvestre. Además hay que señalar que los niveles de actividad β -galactosidasa con XylR y efector con los mutantes pERD415 y pERD416 fueron similares en la cepa productora y defectiva en IHF. Estos resultados sugieren que el factor IHF participa en la activación de Pu y que reconoce su sitio de unión con la mutación puntual pero no en los mutantes con inserciones.

3.2.6 Análisis de la función de IHF en la transcripción de Pu.

Para analizar los requerimientos de composición en bases de la secuencia y de posicionamiento en la hélice de ADN de los factores que intervienen en la transcripción de Pu se provocaron una serie de alteraciones en las regiones del promotor que flanquean a la secuencia consensus de IHF.

3.2.6.1 Alteración de la distancia entre el sitio de unión de IHF y las secuencias activadoras remotas.

Mediante mutagénesis dirigida de Pu en pERD407 con el oligonucleótido 3, cuya secuencia se definió en la sección 3.2.1.2, se obtuvo un promotor mutante con un sitio único de restricción con *Pst*I. El plásmido se linearizó con *Pst*I y los extremos 3' monocatenarios se eliminaron por digestión con nucleasa S1. Por ligación de los extremos romos resultantes se obtuvo un mutante con una delección de 4pb entre -106 y -111, reduciéndose la distancia entre el consensus de IHF y las regiones

UASs aproximadamente en media vuelta de hélice. La inserción de un linker *NcoI* de 10pb (5'-AGCCATGGCT-3') entre los extremos *PstI* romos produjo un segundo mutante con una inserción de 6pb en -106 que aumentaba la distancia de los sitios de unión de XylR e IHF en medio giro de hélice. En ambos mutantes los sitios de unión de las proteínas quedaban en caras opuestas de la hélice respecto al tipo silvestre. Para obtener una elongación de una vuelta completa de hélice entre ambos sitios, el sitio *NcoI* se abrió con la restrictasa correspondiente y se rellenó en presencia de los cuatro desoxinucleótidos con el fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa de *E.coli*, obteniéndose un mutante con una inserción de 10pb (5'-CCATGCATGG-3') en -106.

Para obtener mutantes de Pu con mayores distancias entre los sitios de unión de XylR e IHF y estudiar el efecto de rigidez de la secuencia intermedia se insertaron en el sitio *PstI* cuatro adaptadores *PstI* de síntesis, dos de ellos con un 75% de A:T, y dos con un 75% de G:C en secuencias aleatorias de 21pb (dos giros completos de hélice) y 32pb (tres giros completos) respectivamente, cuyas secuencias son:

5'-GATGTAATATGTTAACGTATCTGCA-3'
3'-ACGTCTACATTATACAATTGCATAG-5',

5'-GATTTTCGCATTGGTTAACAAAGATAGAAATGCTGCA-3'
3'-ACGTCTAAAGCGTAACCAATTGTTTCTATCTTTACG-5',

5'-GCCGCCAGTCGCGAGTCCCGCTGCA-3'
3'-ACGTCGGCGGTCAGCGCTCAGGGCG-5',

5'-GAGTCCCCAGGCTCGCGACTCCCCGTCGGCGCTGCA-3'
3'-ACGTCTCAGGGGTCCGAGCGCTGAGGGGCAGCCGCG-5',

La expresión de los promotores mutantes se analizó en fusiones transcripcionales de cada uno de ellos al gen *lacZ* de pMC1403: pERD421 (Δ 4pb en -106), pERD422 (∇ 6pb en -106), pERD423 (∇ 10pb en -106), pERD431 (∇ 21pb 75% A:T en -110), pERD432 (∇ 32pb 75% A:T en -110), pERD433 (∇ 21pb 75% G:C en -110), y pERD434 (∇ 32pb 75% G:C en -110).

La actividad β -galactosidasa expresada desde cada promotor mutante y desde el silvestre se determinó en células de *E.coli* S90C con y sin *xylR* en pTS174 y en presencia o ausencia de alcohol *m*-metilbencílico. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10.

El promotor mutante en pERD423, con un solo giro de hélice más que el silvestre entre los sitios de unión de IHF y XylR, mostraba el mismo patrón de inducción que el promotor silvestre, mientras que las mutaciones que introducen o eliminan medio giro en pERD421 y pERD422, y por tanto invierten las caras de la hélice de ambos sitios, habían perdido la capacidad de inducción por XylR activado por su efector. La inserción de secuencias de distinta rigidez no afectó a la expresión de Pu, ya que el patrón de inducción de los promotores con adaptadores *PstI* fué el mismo para los ricos en A:T y los ricos en G:C; sin embargo la elongación de la cadena por giros completos de hélice sí alteró la expresión de Pu: la inserción de dos giros de hélice fué permisiva, con un nivel de actividad β -galactosidasa similar al silvestre, mientras que la inserción de tres vueltas redujo drásticamente la expresión de los promotores mutantes, siendo los niveles de actividad β -galactosidasa sólo del 15% de los obtenidos en el tipo silvestre o en los promotores con dos giros entre el sitio de unión de XylR y el de IHF. Estos resultados sugieren que el posicionamiento de los sitios reconocidos por XylR e IHF es crítico para la activación de la transcripción desde Pu, así como también es crítica la distancia entre ambos sitios.

Plásmidos	<i>m</i> -MBA	Actividad β -galactosidasa (U)	
		-XylR	+XylR
pERD401 (silvestre)	-	72	98
	+	69	1520
pERD421 (Δ 4pb en -106)	-	68	92
	+	65	169
pERD422 (∇ 6pb en -106)	-	73	96
	+	70	187
pERD423 (∇ 10pb en -106)	-	70	104
	+	72	1236
pERD431 (∇ 21pb 75% AT)	-	52	66
	+	66	1516
pERD432 (∇ 32pb 75% AT)	-	68	77
	+	54	195
pERD433 (∇ 21pb 75% GC)	-	48	63
	+	51	1532
pERD434 (∇ 32pb 75% GC)	-	49	61
	+	52	228

Tabla 10: Expresión de promotores mutantes de Pu en la región situada entre el sitio IHF y la secuencia UAS2. Células de *E.coli* S90C sin pTS174 (-XylR) o con pTS174 (+XylR) portadoras de los plásmidos que se indican se cultivaron en LB suplementado con los antibióticos correspondientes a 30°C durante 6 horas, en presencia (+) o ausencia (-) de alcohol *m*-metilbencílico (*m*-MBA) a concentración 5mM. La actividad β -galactosidasa se determinó en células permeabilizadas. Los datos son la media de al menos tres determinaciones independientes, con una desviación estándar del 5% al 20%.

Capítulo 4

Discusión.

4.1 Expansión del perfil de sustratos de la ruta "upper" codificada por el plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*.

La presencia de hidrocarburos con uno o más anillos aromáticos en la biosfera es un hecho conocido desde principios de siglo y constatado en los años 40 (Gibson y Subramanian, 1984). Muchos de estos compuestos se han generado a partir de la pirolisis de materia orgánica, ya sea a partir de fenómenos naturales, como incendios, o de la combustión artificial de combustibles fósiles. El origen natural de estos hidrocarburos y su presencia en la biosfera datada en miles de años, permite suponer que han estado en contacto con microorganismos del suelo y del agua durante periodos de tiempo suficientemente largos como para permitir la evolución de rutas metabólicas para la utilización de los mismos como fuente de materia y energía (Gibson y Subramanian, 1984). Sin embargo, diversas agencias del medio ambiente han puesto de manifiesto la presencia de muchos hidrocarburos aromáticos polucionantes cuya eliminación es prioritaria. Esto es consecuencia de la intensa actividad industrial (Tabla 11) y urbana de las últimas décadas, que han supuesto un enorme aporte de compuestos aromáticos a la biosfera. Además este aporte no es sólo cuantitativo, sino también cualitativo, ya que muchos compuestos de síntesis

	Hidrocarburo	1978	1979	1980
Millones de m ³	Benceno	6,7	7,5	7,0
	Tolueno	4,7	4,5	-
Millones de Tm	Etilbenceno	3,7	3,8	3,4
	p-xileno	1,6	2,1	1,7
	o-xileno	0,5	4,8	0,5

Tabla 11: **Producción industrial de hidrocarburos aromáticos.** La producción de benceno y tolueno se expresa en millones de m³, y la de etilbenceno, *p*- y *o*-xileno en toneladas. Los datos son de Gibson y Subramanian, (1984).

industrial presentan estructuras y sustituyentes que no aparecen en los compuestos naturales, denominándose, por tanto, xenobióticos. La mayoría de los xenobióticos son recalcitrantes, ya que no pueden ser metabolizados por microorganismos. De ahí el interés actual en desentrañar los mecanismos que utilizan los seres vivos para eliminar ciertos compuestos para utilizar esta información en la evolución experimental de rutas catabólicas mediante las técnicas de ingeniería genética.

Se han descrito dos tipos de estrategia para acelerar la evolución de rutas catabólicas en el laboratorio, a saber, la adquisición de nuevas especificidades por parte de los enzimas de una ruta, y el ensamblaje de una nueva vía a partir de segmentos de rutas preexistentes (Ramos y Timmis, 1987; Rojo *et al.*, 1987). La utilización de agentes mutagénicos en combinación con métodos de selección apropiados ha demostrado ser un procedimiento efectivo para ampliar la especificidad de sustrato de los enzimas catabólicos (Clarke, 1984; Ramos y Timmis, 1987). Sin embargo, en muchos casos la mutagénesis de los genes estructurales de una ruta no es suficiente para asegurar el metabolismo de nuevos compuestos debido a que la mayoría de las rutas catabólicas son regulables, de manera que los nuevos sustratos de la ruta deben ser además capaces de inducir la síntesis de los enzimas de la misma (Clarke, 1984). Esto hace que la manipulación de vías catabólicas en el laboratorio requiera un amplio conocimiento previo de la bioquímica de los enzimas, así como de la organización física de los genes estructurales y reguladores de la ruta, y de la regulación de la transcripción de dicha información genética.

Parte de los objetivos de este trabajo se encaminaban a determinar el potencial de degradación de derivados de tolueno a través de la ruta "upper" codificada por el plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*. Para ello se partió del conocimiento previo de la organización estructural y la regulación transcripcional del operón "upper" (Harayama *et al.*, 1989), así como de la bioquímica de la oxidación de toluenos a benzoatos por los enzimas de la ruta (Worsey y Williams, 1975). Durante este estudio se analizó la especificidad de sustrato de los enzimas que integran la ruta de degradación, y el perfil de efectores del regulador XylR, activador transcripcional de los genes estructurales del operón. Esta información se utilizó posteriormente para diseñar distintas estrategias genéticas para expandir el espectro de hidrocarburos aromáticos metabolizados a través de esta ruta.

Pseudomonas putida (pWW0) es capaz de crecer a expensas de tolueno, *m*- y *p*-xileno, *m*-etiltolueno y 1,3,4-trimetilbenceno (Kunz y Chapman, 1981; Worsey y Williams, 1975), pero es incapaz de utilizar *p*-etiltolueno o clorotoluenos como fuente de carbono y energía (Abril *et al.*, 1989; Kunz y Chapman, 1981). La limitación para utilizar estos hidrocarburos podría localizarse a nivel de la inducción de los genes estructurales del operón, a nivel de la especificidad de los enzimas de la ruta, o a ambas posibilidades a la vez.

El regulador último de la síntesis de los enzimas de la ruta "upper", e indirectamente, a través del sistema de regulación en cascada mediado por XylS, de la ruta *meta*, es la proteína XylR activada por sus efectores (Fig. 5). La degradación de derivados de tolueno a través de la ruta "upper" de TOL pWW0 podría estar bloqueada a nivel de la síntesis de los enzimas de la misma, ya que aquellos hidrocarburos que no fuesen efectores de XylR serían incapaces de inducir la transcripción de los operones de TOL. Los experimentos diseñados para analizar el perfil de efectores de XylR se basaban en la utilización de fusiones transcripcionales de los promotores de las rutas "upper" (Pu) y *meta* (Pm) al gen *lacZ* desprovisto de su promotor natural, ya que este tipo de ensayo, al realizarse en células permeabilizadas, permite usar volúmenes pequeños de cultivo y analizar muchas muestras simultáneamente en poco tiempo.

La validez del ensayo se confirmó previamente analizando las cinéticas de inducción de las rutas "upper" y *meta* en cultivos de *P.putida* 2440 (pWW0) (Fig. 16), y comparándolas con las cinéticas de inducción de los promotores de ambas rutas en fusiones transcripcionales al gen *lacZ* en células de *E.coli* 5K portadoras de los genes reguladores *xylR* y *xylS* en plásmidos compatibles (Fig. 17). En ambos casos la inducción era lenta, alcanzándose los niveles máximos de actividad C 2,3-O (ruta *meta*) y BADH (ruta "upper") en cultivos de *P.putida* 2440 (pWW0), y de actividad β -galactosidasa en las fusiones de Pu y Pm en *E.coli* 5K (pKT570) a las 6 horas de incubación en presencia de *m*-xileno. Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* (1990) realizaron ensayos similares de expresión de los promotores de TOL. Los resultados que obtuvieron en células de *P.putida* 2440 (pWW0) y en diversas cepas de *E.coli* portadoras de fusiones transcripcionales de Pr, Ps, Pu, y Pm, indican que la inducción de Pm mediada por XylS y la inducción de Ps y Pu mediada por XylR no se produce inmediatamente tras la adición de inductores, sino cuando los cultivos alcanzan la fase exponencial tardía. En cultivos incubados en LB en presencia de efectores de XylR y XylS, la inducción de Pu y Pm se producía tras un periodo de latencia de tres horas, y la inducción se retrasaba aún más cuando los cultivos se diluían en medio fresco con inductores. En cultivos en medio mínimo la inducción comenzaba en una hora, pero en todos los casos era máxima en fase exponencial tardía de los cultivos. Las cinéticas de inducción lenta se han observado también en la síntesis de enzimas de otros operones catabólicos, como el operón para la degradación de naftaleno y salicilato del plásmido pNAH7 (Yen y Gunsalus, 1982), o el de degradación *orto* de benzoato y clorobenzoatos de *Pseudomonas* sp. B13 (Reineke y Knackmuss, 1979). En contraste, en otros sistemas inducibles por sustrato, como los operones *lac*, *gal* y *ara* de *E.coli* para la utilización de lactosa, galactosa y arabinosa, la inducción de los enzimas degradativos es casi inmediata, produciéndose a los dos minutos de la adición del sustrato (Englesberg *et al.*, 1965; Monod *et al.*, 1952). Quizás los nichos ecológicos de estas bacterias aporten una explicación a la diferencia en estos mecanismos de respuesta a la presencia de sustratos; así, *E.coli* es una bacteria del tracto intestinal, un medio rico y con un aporte regular de nutrientes en solución, mientras que *P.putida* es una bacteria del suelo,

donde el aporte de nutrientes es escaso y sujeto a oscilaciones cuantitativas y cualitativas debido a adsorciones a los distintos componentes del suelo. La inducción lenta de los enzimas de las rutas de TOL podría garantizar la presencia de sustratos en el medio cuando la maquinaria metabólica de las células está preparada para su utilización.

Hugovieux-Cotte-Pattat *et al.* (1990) propusieron que la inducción de los promotores de TOL es dependiente de la fase de crecimiento de las células, si bien no se han aportado pruebas concluyentes ni se han identificado las señales implicadas en esta relación. Sin embargo, es de interés señalar que la regulación por fase de crecimiento se ha observado en muchos sistemas de distintas bacterias, como en el operón *mob* de *E.coli* para la producción de microcina B17 (Connell *et al.*, 1987), genes para la síntesis de glucógeno (Okita *et al.*, 1981), de fosfoenolpiruvato carboxilasa (Goldie y Sanwal, 1980), y de fosfatasa ácida (Atlung *et al.*, 1989; Dassa *et al.*, 1982) en *E.coli*, genes para la síntesis de proteasas (Braun y Schmitz, 1980) y fosfolipasas (Gibshov *et al.*, 1988) en *Serratia*, y genes para la síntesis de pectinasas y lipasas en *Erwinia chrysantemi* (Hugovieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1986). A pesar de la diversidad fisiológica de los productos génicos de estos sistemas, la regulación común a todos ellos sugiere que este tipo de control interviene en los ciclos celulares y contribuye especialmente a la supervivencia de los microorganismos en condiciones de escasez de nutrientes (Hugovieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1990).

En cualquier caso, la similitud de las cinéticas de inducción de enzimas de las rutas catabólicas de TOL en *P.putida* y las cinéticas de inducción de los promotores de los operones en *E.coli* sugería que la síntesis de los enzimas se correspondía con la activación transcripcional de los promotores Pu y Pm en ambos organismos, lo cual permitía analizar la inducción de ambos promotores mediada por XylR en respuesta a distintos efectores en fusiones transcripcionales al gen *lacZ*.

Los ensayos de inducción de Pu mediada por XylR en presencia de compuestos aromáticos (Tablas 3 y 4) indicaron que XylR reconocía un amplio espectro de derivados de tolueno, alcohol bencílico y benzaldehído como efectores. Las características químicas de los compuestos ensayados permitieron obtener las siguientes conclusiones sobre la interacción de XylR y sus efectores (Fig. 34):

(i) la presencia de un grupo $-\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2\text{OH}$ en la posición 1 del anillo aromático es necesaria para la activación de XylR;

(ii) las sustituciones por grupos $-\text{CH}_3$ y $-\text{C}_2\text{H}_5$ o átomos de cloro son permisivas en las posiciones 2, 3 y 4, aunque los grupos $-\text{C}_2\text{H}_5$ en posición 2 y 4 sólo permiten bajos niveles de inducción;

(iii) las disustituciones por grupos $-\text{CH}_3$ o átomos de cloro en las posiciones 2 y 3, 2 y 4, y 3 y 4 son permisivas;

(iv) las sustituciones por grupos $-\text{CH}_3$ o átomos de cloro en las posiciones 5 y 6 son permisivas, lo cual contrasta con la reducida permisividad de estas posiciones en el anillo aromático del ácido benzoico en la activación del regulador XylS (Ramos *et al.*, 1986; 1990). El hecho de que las disustituciones en posiciones enfrentadas del anillo aromático del tolueno sean permisivas sugiere que las interacciones del regulador con su efector pueden ser simétricas;

(v) la presencia de un grupo $-\text{COH}$ en posición 1 sólo es permisiva en combinación con una sustitución por cloro en posición 4.

XylR también interviene indirectamente en la expresión de Pm, a través de un sistema de regulación en cascada en el que intervienen los dos reguladores de TOL, XylR y XylS (Fig. 5). Por lo tanto, al ser XylR el regulador primario de la inducción de Pm a través del sistema en cascada, el patrón de inducción de Pm por efectores de XylR debería ser similar al de Pu, y de hecho, los ensayos de expresión de Pm en fusiones transcripcionales al gen *lacZ* con *xylR* y *xylS* en *trans* mostraron perfiles de inducción similares, aunque se observaron algunas diferencias significativas (ver Tablas 3 y 4); así, los niveles de inducción por clorotoluenos fueron más bajos para Pm que para Pu, y el *p*-etiltolueno, inductor débil de Pu, no mediaba estimulación de la transcripción desde Pm en el sistema en cascada. Los derivados de alcohol bencílico inducían niveles de expresión más bajos desde Pm que desde Pu, y el alcohol *m*-clorobencílico, que inducía altos niveles de expresión desde Pu, no inducía la expresión desde Pm. Los benzaldehidos, que salvo el *p*-clorobenzaldehido, no eran inductores de Pu, se comportaron como inductores fuertes de Pm. Los experimentos de inducción desde Pm mediada por XylS con benzaldehido y sus derivados (A. Holtel y C. Michán, comunicación personal) han demostrado que estos compuestos

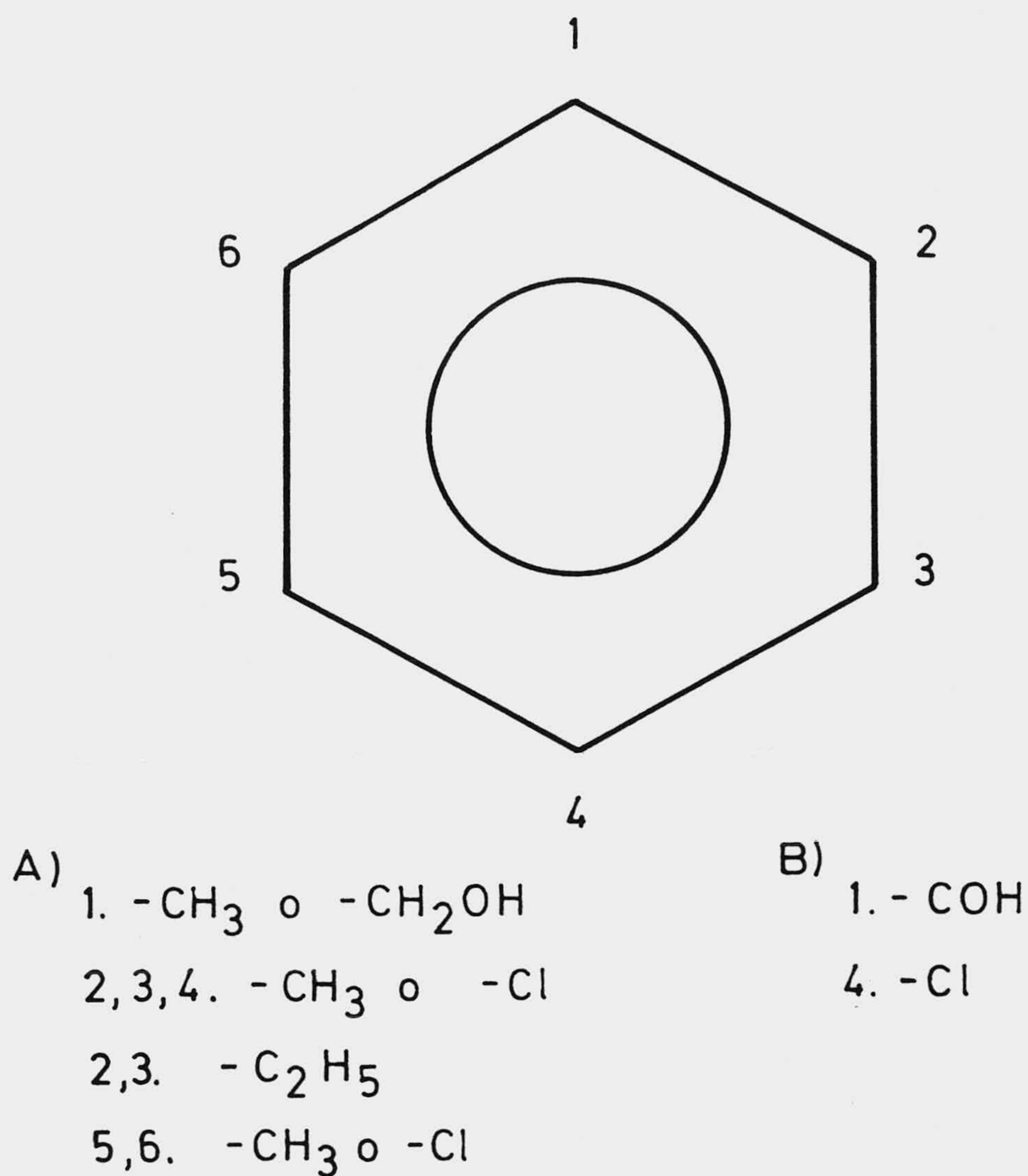


Figura 34: Resumen de las sustituciones permisivas en el anillo aromático de los efectores de XylR. A) Sustituciones permisivas en las posiciones numeradas cuando el C-1 está sustituido por un grupo metilo o carbonilo. B) Sustituciones permisivas cuando el C-1 está sustituido por un grupo aldehido.

son efectores de XylS, y por tanto, esta inducción no se debe al efecto en cascada mediado por XylR.

A modo de resumen, se puede decir que XylR tiene un espectro de efectores muy amplio (Tablas 3 y 4), y el bloqueo en el metabolismo de derivados recalcitrantes de tolueno (*o*-xileno, *p*-etiltolueno y *m*- y *p*-clorotolueno) no se encuentra a nivel de la transcripción de los genes estructurales del operón, ya que estos compuestos son efectores de XylR y permiten inducir la síntesis de los enzimas de la ruta "upper", aunque el *p*-etiltolueno sea un efector débil.

Con objeto de localizar los posibles puntos de bloqueo en la ruta de oxidación de toluenos recalcitrantes hasta sus ácidos carboxílicos correspondientes a través de la ruta "upper" de TOL, se analizó el perfil de sustratos de los tres enzimas de la ruta: tolueno monooxigenasa (TO), alcohol bencílico deshidrogenasa (BADH) y benzaldehído deshidrogenasa (BZDH).

Las dos deshidrogenasas exhibían un amplio espectro de sustratos, siendo capaces de oxidar a alta velocidad todos los sustratos ensayados con sustituciones alquílicas y átomos de cloro en las posiciones 3 y 4. Sólo los derivados con sustitución por un grupo etilo en posición 2 eran oxidados a baja velocidad por ambos enzimas. Por otro lado, tanto la BADH como la BZDH presentaban alta afinidad por sus sustratos correspondientes, con valores de afinidad del orden de μM , lo cual sugiere que la oxidación de alcoholes bencílicos a benzoatos transcurre sin que se acumulen intermediarios de la ruta. Mientras que la BADH presentaba cinéticas de saturación del tipo de Michaelis-Menten, la cinética de actividad de la BZDH era más compleja, ya que la reducción de NAD^+ a NADH en presencia de derivados de benzaldehído presentaba una cinética con dos pendientes, sin alcanzar aparentemente la saturación del enzima (Fig. 21). Esto sugiere bien un mecanismo no convencional de actividad que requiere confirmación mediante purificación del enzima, o bien la presencia de más de un enzima con actividad benzaldehído deshidrogenasa en los extractos libres de células. Sin embargo, en células de *P.putida* 2440 sin el plásmido pWW0 cultivadas en medio mínimo con glucosa y tolueno no se detectó actividad BZDH (Abril *et al.*, 1989), lo cual sugiere que si hay más de una BZDH

son todas codificadas por el plásmido TOL pWW0. Este tipo de isoenzimas relacionadas con la actividad BZDH se han descrito también en la ruta del metabolismo de mandalato en *Pseudomonas* y *Aspergillus niger* (Fewson, 1988).

Del perfil de sustratos de la TO (Tabla 6) se dedujo que el primer enzima de la ruta "upper" actúa como paso limitante para la oxidación de *p*-etiltolueno, *o*-xileno y clorotoluenos hasta sus respectivos ácidos carboxílicos. Sin embargo, aunque estos compuestos fuesen metabolizados a través de la ruta "upper", los productos de su oxidación se verían bloqueados en otros puntos de la ruta de degradación hasta intermediarios del ciclo Krebs. En efecto, la ruta *meta* está bloqueada a nivel de síntesis de los enzimas por los derivados del ácido benzoico con un grupo etilo en posición 4, ya que el *p*-etilbenzoato no es efector de XylS (Ramos *et al.*, 1987b), y el *p*-etiltolueno es un efector débil de XylR, incapaz de activar la síntesis de la ruta *meta* a través del sistema en cascada (Tabla 3). Además, el *p*-etilcatecol, producto de la dioxigenación y descarboxilación del *p*-etilbenzoato, inactiva a la C 2,3-O de la ruta *meta* (Ramos *et al.*, 1987b). Es decir, que la degradación de *p*-etiltolueno a través de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0 está bloqueada en la TO, en la síntesis de los enzimas de la ruta *meta* y en la C 2,3-O.

Aunque los clorotoluenos son efectores potentes de XylR e inducen la síntesis de los enzimas de las rutas "upper" y *meta*, *P.putida* (pWW0) no puede utilizarlos como fuente de carbono y energía, ya que la degradación de los derivados clorados de tolueno también está bloqueada en la ruta *meta* debido a que el *m*-clorocatecol inactiva irreversiblemente a la C 2,3-O (Bartels *et al.*, 1984), y los enzimas sucesivos en la ruta no actúan sobre sustratos halogenados (A. Stolz, comunicación personal). Sin embargo, la TO codificada por el plásmido TOL pWW0 es capaz de oxidar lentamente *m*- y *p*-clorotolueno, observación confirmada por U. Brinkman (comunicación personal). Parece ser, por tanto, que la C 2,3-O actúa como punto principal de bloqueo en la ruta *meta* para la degradación de derivados recalcitrantes de benzoato, y su limitación para catalizar la fisión del anillo aromático del catecol se debe a la inactivación del enzima por los catecoles (Bartels *et al.*, 1984). La localización de los puntos que bloquean la degradación algunos derivados recalcitrantes de tolueno sugiere que existe una coevolución entre las rutas "upper" y *meta* para

conseguir la mineralización total de los sustratos que pueden metabolizar (Abril *et al.*, 1989; Ramos y Timmis, 1987).

En contraste con la coevolución de las rutas catabólicas del plásmido TOL *in vivo*, en el laboratorio es posible manipular las rutas independientemente y generar segmentos con perfiles de sustrato más amplios (expansión horizontal), y transferir los segmentos modificados entre hospedadores con distintas capacidades metabólicas, obteniéndose rutas expandidas por ensamblaje con otras vías metabólicas (expansión vertical) (Ramos y Timmis, 1987). El procedimiento de mutagénesis seguido de presión selectiva se ha utilizado con éxito para obtener microorganismos con nuevas capacidades metabólicas (Mortlock, 1982). Este tipo de aproximación experimental implica la introducción de mutaciones que alteran la especificidad de sustrato de un enzima o de una secuencia enzimática; uno de los casos mejor estudiados es el de la utilización de amidas alifáticas por *P.aeruginosa* (Clarke, 1982). Otro procedimiento utilizado con frecuencia para construir rutas para el catabolismo de compuestos aromáticos halogenados es el ensamblaje de nuevas actividades enzimáticas para complementar y extender una ruta preexistente; esta aproximación se ha utilizado en la construcción de cepas degradadoras de clorofenoles (Schwien y Schmidt, 1982), clorobenzoatos (Reineke y Knackmuss, 1979), clorosalicilatos (Lehrbach *et al.*, 1984) y cloronaftalenos (Weightman *et al.*, 1984). Una variante más compleja de este caso es la utilización de segmentos de distintas rutas para permitir el metabolismo de halo- y metilaromáticos descrito por Rojo *et al.* (1987), para obtener cepas que eliminan simultáneamente sustratos incompatibles, como *m*-clorobenzoato y *p*-metilbenzoato. Ambos tipos de estrategia se han utilizado en este estudio para conseguir la degradación de *p*-etiltolueno y *m*-clorotolueno por distintas cepas del género *Pseudomonas*.

Para obtener una cepa capaz de degradar *p*-etiltolueno se utilizó una ruta *meta* previamente modificada capaz de degradar *p*-etilbenzoato (Ramos *et al.*, 1987b). El plásmido TOL pWW0-EB61, derivado recombinante de pWW0 que codifica los enzimas necesarios para la degradación de *p*-etilbenzoato, contiene dos mutaciones: *xyIE106*, que codifica una C 2,3-O resistente a la inactivación por *p*-etilcatecol, y *xyIS4*, que contiene una mutación puntual y codifica un regulador mutante con un

cambio Arg(45)→Thr capaz de inducir la síntesis de la ruta *meta* en presencia de *p*-etilbenzoato incluso a concentraciones tan bajas como 5 μ M (Ramos *et al.*, 1990). Este plásmido no permite el crecimiento en *p*-etiltolueno. Después de mutagenizar células de *P.putida* (pWW0-EB61) con EMS se seleccionó una cepa portadora de una nueva mutación en el plásmido TOL, de manera que la TO de la ruta "upper" era capaz de oxidar *p*-etiltolueno a alcohol *p*-etilbencílico, sin perder la capacidad de oxidar otros hidrocarburos oxidados por la TO silvestre (Tabla 7). Este último plásmido se denominó pWW0-EB62.

Las tres mutaciones independientes del plásmido TOL pWW0-EB62 que permiten la degradación de *p*-etiltolueno se aislaron con una frecuencia de entre 10⁻⁸ y 10⁻⁹ por generación y por célula, lo cual supone una probabilidad muy baja (frecuencia 10⁻²⁵) de aislar un plásmido semejante a pWW0-EB62 de un sistema natural.

El metabolismo de clorotoluenos a clorocatecoles se ha observado en muchas bacterias, pero la degradación completa de estos compuestos sólo se lleva a cabo en un grupo mucho más reducido de microorganismos (Dorn y Knackmuss, 1978; Wigmore y Ribbons, 1980). La capacidad de estos últimos para la mineralización de cloroaromáticos radica en que poseen una ruta que cataliza eficientemente la fisión *orto* de los clorocatecoles. La clonación y caracterización de los genes implicados en la degradación de cloro- y diclorocatecoles por *Alcaligenes eutrophus* puso las bases para la construcción de cepas bacterianas capaces de degradar una gran variedad de compuestos aromáticos clorados (Don *et al.*, 1985). En este trabajo se obtuvo una cepa de *Pseudomonas* capaz de degradar *m*-clorotolueno mediante el ensamblaje de dos rutas metabólicas preexistentes: la ruta de degradación de *m*-clorobenzoato a través de una ruta *orto* modificada de *Pseudomonas* sp. B13 (Dorn *et al.*, 1974), y la ruta "upper" de TOL pWW0 que, aunque a baja velocidad, es capaz de oxidar *m*-clorotolueno a *m*-clorobenzoato (Fig. 23). La transferencia de plásmidos portadores de segmentos de rutas o rutas completas, manipuladas o no en el laboratorio, a *Pseudomonas* sp. B13 para la expansión vertical de la ruta de fisión *orto* de clorocatecoles se ha empleado con anterioridad. La transferencia de un plásmido TOL que codificaba una C 2,3-O inactiva para evitar la formación

de intermediarios que conducen a la acumulación de productos tóxicos, permitió el aislamiento de cepas de *Pseudomonas* sp. B13 capaces de degradar *p*-clorobenzoato (Reineke y Knackmuss, 1979), y la transferencia de los genes del plásmido pNAH7 de *P. putida* que codifican los enzimas para el catabolismo de naftaleno vía salicilato (Dagley, 1986; Yen y Gunsalus, 1982), permitió aislar cepas capaces de crecer en 3-, 4-, y 5-clorosalicilato (Lehrbach *et al.*, 1984). La ruta híbrida obtenida en este trabajo permite la mineralización de *m*-clorotolueno por *Pseudomonas* sp EEZ5.

Los resultados obtenidos indican que las rutas catabólicas de TOL constituyen un elemento versátil para el estudio y ensayo de evolución de rutas metabólicas en el laboratorio. Su codificación en un transposón contenido en un plásmido autotransferible (Benson y Shapiro, 1978; Jacoby *et al.*, 1978), facilita además la transferencia de la información genética a otras bacterias. En efecto, la conjugación es el sistema más eficiente de transferir información entre microorganismos (Trevors y Oddie, 1986), aunque otros mecanismos como la transformación y la transducción también pueden jugar un papel importante (Carlson *et al.*, 1983; Graham e Istock, 1978; Morrison *et al.*, 1978). Aunque la conjugación entre distintos géneros de bacterias se ha demostrado en distintas condiciones de laboratorio, hay pocos estudios sobre la transferencia de plásmidos en condiciones naturales. En microcosmos constituidos por suelos y sistemas acuáticos de ríos y lagos se ha observado conjugación intragenérica entre células de *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Streptomyces* sp. (Clelow *et al.*, 1990; Höfte *et al.*, 1990; McClure *et al.*, 1989; Morrison *et al.*, 1978; Trevors y Oddie, 1986; Weinberg y Stotzky, 1972), así como transferencia intergenérica (Murooka *et al.*, 1981). Los estudios de Ramos-González *et al.* (1991) demostraron que los plásmidos TOL recombinantes pWW0-EB62 y pWW0-EB62K se transferían con alta frecuencia entre cepas de *P. putida* y entre pseudomonadáceas del grupo de ARN-r I. Asimismo, observaron la transferencia intergenérica de ambos plásmidos a cepas de *E. coli* y *Erwinia chrysanthemi*. Hay que señalar que en el caso de *E. chrysanthemi*, al igual que en *Pseudomonas* sp. B13, los plásmidos transferidos sufrían deleciones en el nuevo hospedador (Jeenes *et al.*, 1982; Ramos-González *et al.*, 1991; Reineke *et al.*, 1982). Aunque no se conoce la razón de la inestabilidad

parcial de TOL en dichos hospedadores, podría deberse a la inestabilidad del transposón Tn4651 portador de los genes catabólicos en los mismos. A pesar de ello, el plásmido TOL se mantiene y expresa en *Pseudomonas* sp. B13 en condiciones de presión selectiva (Abril *et al.*, 1989; Reineke y Knackmuss, 1979). Los ensayos de Ramos-González *et al.* (1991) indicaban que TOL no se transfiere a otras bacterias del suelo como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes* sp. y *Rhizobium meliloti*, lo cual sugiere que el replicón IncP9 tiene un espectro de hospedador más restringido que otros grupos, como IncP1, IncQ e IncW (Frey y Bagdasarian, 1989; Thomas y Helinski, 1989; Valentine y Kado, 1989). Hay que señalar que se detectó transferencia intragenérica de TOL en microcosmos constituidos por suelos agrícolas, aunque no se detectó transferencia intergenérica. Estas observaciones son un ejemplo de los mecanismos de expansión de rutas catabólicas en la naturaleza.

4.2 Caracterización del promotor Pu: estructura y factores que intervienen en la regulación de su transcripción.

Los promotores Pu y Ps del plásmido TOL pWW0 pertenecen al grupo de promotores -12/-24 (Inouye *et al.*, 1984, 1987a; Ramos *et al.*, 1987a), y son dependientes del factor σ^{54} para su transcripción (Dixon, 1986; Inouye *et al.*, 1987a, 1989; Köhler *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1987a). La proteína XylR es un regulador positivo que induce la transcripción de ambos promotores en presencia de una amplia gama de derivados de tolueno, alcohol bencílico, y de *p*-clorobenzaldehído (Tablas 3 y 4).

La mayoría de los promotores -12/-24 que se han identificado hasta ahora contienen secuencias activadoras (UASs) situadas entre -100 y -200 con respecto al punto principal de iniciación de la transcripción, que son los sitios de unión de las proteínas activadoras (Kustu *et al.*, 1989). El modelo de activación remota de estos promotores (Buck *et al.*, 1987) propone que el activador unido a las UASs interactúa con el holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa unido a la región -12/-24 mediante el dobléz de la cadena de ADN, lo cual permite la aproximación de ambos factores (Fig. 9). Este dobléz parece estar facilitado en algunos casos por el factor de integración del hospedador (IHF) (Abril *et al.*, 1991; Claverie-Martín *et al.*, 1991; Santero *et al.*, 1989).

En este estudio se han identificado las secuencias activadoras remotas de Pu, y se ha demostrado la intervención de IHF en la estimulación de la transcripción del promotor Pu.

Mediante el alineamiento de las secuencias de Pu y Ps (Holtel *et al.*, 1990) se identificaron dos regiones homólogas, situadas a más de 100pb del punto de iniciación de la transcripción, que contenían secuencias conservadas inversamente repetidas (Fig. 6). La región distal con respecto al punto de iniciación de la transcripción se denominó UAS1, y la región proximal se denominó UAS2. Para demostrar el posible papel de estas secuencias en la transcripción de Pu se realizaron

deleciones que eliminaban uno o ambos motivos. La deleción de las dos UASs conducía a la pérdida total de activación de la transcripción de Pu, mientras que la deleción de sólo la región distal (UAS1) disminuía notablemente la capacidad de inducción, pero no la eliminaba totalmente. Holtel *et al.* (1992) realizaron ensayos análogos en Ps y obtuvieron resultados similares, lo cual sugiere que las dos regiones homólogas de Pu y Ps actúan como secuencias activadoras remotas (UASs) a las que se podría unir XylR para estimular la transcripción de ambos promotores.

La unión de XylR a las UASs se confirmó en Pu mediante ensayos de improntas *in vivo* (Figs. 28, 29, y 30) e *in vitro* (de Lorenzo *et al.*, 1991). Los ensayos *in vivo* mostraban un patrón de protección e hipermetilación de Gs dependiente de la presencia de XylR y efectores en los dos motivos UAS1 y UAS2, y además en una tercera región, localizada entre -50 y -90 (Fig. 28 y 29) y que no presentaba homología con las dos anteriores. Los ensayos *in vitro* con la proteína XylR parcialmente purificada indicaban que XylR sólo se unía a las regiones UAS1 y UAS2 (de Lorenzo *et al.*, 1991). La alteración en el patrón de protección de las Gs en la tercera zona se debe probablemente a la distorsión de esta región provocada por la formación de bucles de activación.

Los ensayos *in vivo* demostraron además que XylR se une a las UASs en ausencia de efectores, ya que se observó protección e hipermetilación de Gs en ausencia de los mismos. Sin embargo, los contactos de XylR se alteraban en presencia de efectores, ya que se modificaba el patrón de protección e hipermetilación. La interacción de reguladores, activados o no, con sus secuencias de reconocimiento se ha descrito en otros sistemas, como el del operón *ara* de *E.coli* y *Salmonella typhimurium*, implicado en el metabolismo de arabinosa y regulado por la proteína AraC, un regulador que estimula o inhibe la transcripción mediante la formación de bucles en el ADN (Brunelle y Schleif, 1989).

En Pu el patrón de interacción de XylR con el ADN en la región UAS1 mostraba que las Gs -160 de la cadena superior y -176 de la inferior estaban hipermetiladas en ausencia de efector y protegidas en su presencia; las Gs -144 y -146 de la cadena inferior sólo aparecían protegidas en presencia de alcohol *m*-metilbencílico, y la G -178 de la cadena inferior sólo aparecía hipermetilada en su ausencia. El resto de las

Gs, tanto en la UAS1 como en la UAS2, mostraban distinta intensidad de protección o hipermetilación en presencia y ausencia de efector. Estos resultados indican que en presencia de efector se produce una alteración apreciable del patrón de protección en la región UAS1 y, aunque menos evidente, también en la región UAS2. Hay que señalar que la región UAS2 es una zona pobre en Gs (Fig. 24), lo cual representa una limitación al estudio de las interacciones de XylR con esta región por el método de reactividad de las Gs a DMS. Sin embargo, los estudios *in vitro* de de Lorenzo *et al.* (1991) confirmaron nuestras observaciones. En cualquier caso, parece claro que en presencia de efector se debe inducir algún cambio conformacional en XylR que altera los contactos en las UASs, y que bien facilita la interacción con el complejo promotor- σ^{54} -ARN-polimerasa, o bien estabiliza la unión de XylR al ADN. Inouye *et al.* (1990) observaron que la hiperproducción de XylR inducía la expresión desde Pu en ausencia de efectores, y por tanto es posible que el papel del efector sea aumentar la afinidad de XylR por su secuencia de unión.

El mecanismo de interacción a nivel molecular de XylR con las secuencias UASs del ADN no se conoce aún en detalle; sin embargo, este estudio ha revelado ciertos aspectos del mismo mediante el análisis de los niveles de expresión de mutantes de Pu con transiciones G→A en las posiciones protegidas o hipermetiladas de la cadena superior (Gs -131, -139, -160 y -169). Los resultados de la Tabla 8 sugieren que la G-169 está implicada en la interacción y/o el reconocimiento de XylR, ya que la transición G→A implicaba una pérdida del 50% de la expresión de Pu. Puesto que el resto de las transiciones G→A no afectaban al nivel de expresión de Pu, se sugiere que o bien su interacción con XylR no es crítica, o bien que su alteración en el perfil de protección e hipermetilación sea consecuencia de ensombrecimiento no específico por el regulador en estas posiciones. La posición G-169 respecto a la secuencia inversamente repetida de la UAS1 es análoga a la de la G-131 en la UAS2 (Fig. 31), y sin embargo la transición G-131→A no afectaba a la expresión de Pu (Tabla 8). Esto sugiere que la interacción del activador con ambas UASs no es idéntica.

El incremento de la distancia entre las regiones UAS1 y UAS2 disminuía la expresión de Pu mediada por XylR (Tabla 8), tanto si se introducía medio giro

de hélice como si se introducía un giro completo; además, la delección de la secuencia activadora distal, UAS1, también disminuía notablemente la expresión de Pu mediada por XylR (Fig. 27). En el promotor Ps se han obtenido resultados análogos (Holtel *et al.*, 1992). El requerimiento de ambas regiones posicionadas en la misma cara de la hélice y a una distancia fija para la inducción completa de los promotores Pu y Ps, se ha interpretado como el requerimiento de interacciones cooperativas entre distintas moléculas del regulador unido al ADN, aunque no se conoce cuántas moléculas de XylR intervienen en la activación de la transcripción de Pu y Ps. Inouye *et al.* (1990) propusieron que el activador XylR actúa como un dímero basándose en la simetría de las UASs y en la interacción de otros reguladores con secuencias UASs que contienen motivos inversamente repetidos. Observaciones similares en otros promotores dependientes de σ^{54} apoyan la hipótesis de la unión cooperativa de los activadores a las secuencias activadoras remotas. Las repeticiones invertidas con doble simetría rotacional aparecen en los sitios de unión de NifA a los promotores *nif* de *K.pneumoniae* (Buck *et al.*, 1986), en los sitios de unión de NtrC a los promotores *gln* de *S.typhimurium* y *E.coli* y al promotor de *nifLA* de *K.pneumoniae* (Ames y Nikaido, 1985; Hawkes *et al.*, 1985; Reitzer *et al.*, 1989), en el promotor *dctA* de *R.meliloti* y *R.leguminosarum* (Jiang *et al.*, 1989), y en el de *fbgG* de *Caulobacter* (Mullin y Newton, 1989). El requerimiento de la posición estereoespecífica de las UASs para la activación máxima de la transcripción también se ha descrito en el caso del promotor de *nifH* (Buck *et al.*, 1987) y del promotor de *nifLA* de *K.pneumoniae* (Minchin *et al.*, 1989). En el caso del activador NtrC, incluso se ha demostrado la unión cooperativa de dímeros de NtrC a las secuencias activadoras en el promotor de *nifLA* de *K.pneumoniae* (Minchin *et al.*, 1988).

Aunque se desconozca con detalle la interacción de XylR con las regiones UASs de los promotores Pu y Ps, en este trabajo se han aportado ciertas evidencias de que las secuencias palindrómicas contenidas en las UASs están implicadas en la interacción y/o el reconocimiento del activador. La secuencia distal de la región UAS1 de Pu contiene dos nucleótidos no conservados que rompen el palíndromo (5'-CCTT-N₄AAAT-3'); los promotores con mutaciones que aumentan la homología de esta secuencia a un palíndromo perfecto [C(-172)→T, C(-173)→A, y CC(-173,-172) →AT]

mostraban mayor nivel de inducción mediada por XylR que el promotor silvestre (Tabla 8). Por otro lado, entre varios mutantes puntuales en las secuencias invertidas de Ps, sólo uno de ellos que contiene una mutación en un nucleótido conservado de la región UAS proximal [T(-145)→C] presenta niveles de inducción por XylR inferiores en un 50% a los del promotor silvestre (Holtel *et al.*, 1992). Como ya se ha indicado anteriormente, las secuencias invertidas de Ps son muy imperfectas, de modo que es probable que XylR interaccione más débilmente con Ps que con Pu. El significado fisiológico de estas secuencias imperfectas en Pu y, con más evidencia en Ps, más que un estado de evolución intermedio hacia unas secuencias perfectamente palindrómicas que permitan la unión fuerte de XylR, puede ser una etapa final de evolución hacia un sistema en el que la unión relativamente débil del activador a sus secuencias UASs facilite la regulación por efectores. A este respecto conviene señalar la observación de de Lorenzo *et al.* (1991) de que formas truncadas de XylR con deleciones en la región C-terminal, en la que se ha sugerido la localización del dominio de unión al promotor, pierden la capacidad de activar la transcripción. Esto diferencia a XylR de otros activadores de promotores -12/-24 que pueden interaccionar directamente con el complejo σ^{54} -ARN-polimerasa, como NifA de *K.pneumoniae* (Buck y Cannon, 1989; Morett *et al.*, 1988) y *R.meliloti* (Huala y Ausubel, 1989), o NtrC de *E.coli* (Keener *et al.*, 1987), y sugiere que la unión de XylR a sus secuencias activadoras remotas juega un papel crítico en la regulación de la transcripción, y no es meramente un mecanismo para aumentar la concentración local del activador para facilitar su interacción con el complejo promotor- σ^{54} -ARN-polimerasa unido a la región de -12/-24.

Como se ha mencionado anteriormente, los ensayos de improntas *in vivo* mostraban una región con el patrón de bandas alterado en presencia de XylR situada entre -45 y -92, y que no presentaba homología con las regiones UAS1 y UAS2. Las Gs -54 y -70 de la cadena superior estaban protegidas independientemente de la presencia del efector (Fig. 28), y la G-92 estaba protegida en ausencia de alcohol *m*-metilbencílico e hipermetilada en presencia del efector (Fig. 29); la posición -84 de la cadena superior mostraba protección con efector e hipermetilación sin él, y la posición -45 de la cadena inferior estaba hipermetilada en presencia de efector

y protegida en su ausencia. Las posiciones -84 de la cadena superior y -45 de la cadena inferior corresponden a Ts (Figs. 28 y 29), lo cual es sorprendente, ya que el ensayo de improntas *in vivo* se basa en la metilación de la posición N-7 de las Gs por DMS y la subsiguiente rotura de los enlaces desoxirribosa-G metilada con piperidina, de modo que en las autorradiografías sólo aparecen cadenas extendidas hasta las posiciones correspondientes a Gs. La reacción de las Ts con DMS en ensayos de improntas *in vivo* se ha descrito con anterioridad en interacciones de proteínas con ADN que conllevan la formación de complejos del tipo de los nucleosomas en procariotas (Minchin *et al.*, 1989; Sasse-Dwight *et al.*, 1988; Serrano *et al.*, 1990), y parece ser debida a la metilación de la posición N-3 de la T en condiciones de distorsión de la hélice de ADN, que dejan expuesta dicha posición (T'so, 1974). La reactividad de las Ts -45 y -84 con DMS sugiere que la formación del complejo de transcripción origina una gran distorsión de la estructura del ADN en la región situada entre las UASs y las secuencias -12/-24.

Holtel *et al.* (1990) identificaron en esta región una secuencia desde -55 a -67 que es 100% homóloga al consenso propuesto para la unión del factor IHF (Fig. 32) (Goodrich *et al.*, 1990; Hoover *et al.*, 1990;). Aunque los genes *himA* (Mechulam *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1981) y *hip* o *himD* (Flamm y Weisberg, 1985), que codifican respectivamente las subunidades α y β de IHF, no se han identificado en *Pseudomonas*, los ensayos de expresión del promotor Pu silvestre y varios promotores con mutaciones en la región homóloga al consenso de IHF en cepas de *E. coli* productoras y defectivas en IHF (Tabla 9) indicaban que IHF interviene en la transcripción de Pu mediada por XylR y sus efectores, ya que los niveles de expresión en cepas IHF⁻ eran del orden del 25% de los registrados en cepas IHF⁺. Además la desorganización del motivo de unión de IHF mediante inserciones de distinto número de nucleótidos en -64 conducía a una disminución notable de la expresión de Pu en cepas IHF⁺ e IHF⁻. Es decir, que tanto el defecto en la síntesis de IHF como la alteración en el promotor Pu de la región de unión de IHF provocaban una disminución del orden del 75% en los niveles de expresión de Pu inducida por XylR. La interacción de IHF con la región localizada entre -45 y -92 ha sido definitivamente comprobada mediante ensayos de improntas *in vitro* de Pu con la proteína

IHF purificada (de Lorenzo *et al.*, 1991).

El mutante de Pu portador de una delección interna desde -64 a -111 en pERD417 presenta unos niveles de expresión muy bajos respecto al promotor silvestre y los mutantes en la secuencia consensus de IHF (Tabla 9), tanto en la cepa IHF⁺ como en la IHF⁻. La notable disminución de los niveles de expresión de pERD417 sugiere que ésta no se debe sólo a la pérdida del sitio de unión de IHF, sino al tamaño de la delección, que produce un considerable acortamiento de la distancia entre las UASs y el consensus -12/-24. Los resultados de Inouye *et al.* (1990) con promotores portadores de una serie de delecciones internas progresivamente crecientes en dirección 3'→5' desde la posición -40, muestran que las delecciones de más de 40pb disminuyen los niveles de expresión de Pu hasta valores próximos a los obtenidos con pERD417, mientras que la delección de fragmentos menores de 40pb que eliminan total o parcialmente el sitio de unión de IHF alcanzan valores de expresión equivalentes a los mostrados en la Tabla 9 para el promotor silvestre en la cepa IHF⁻ y los mutantes pERD415 y pERD416 en ambas cepas.

El aumento de la distancia entre los sitios del promotor Pu que intervienen en la regulación de su transcripción también afectaba a la expresión dependiendo del tamaño de la inserción. Cuando se introducía media vuelta de hélice entre el sitio de unión de IHF y las secuencias UASs (en -106) se perdía la capacidad de inducción de Pu mediada por XylR (Tabla 10); este efecto también se observaba cuando se eliminaba media vuelta de hélice (Tabla 10). Sin embargo, la introducción de un giro completo de hélice en la misma posición no afectaba significativamente a la expresión desde Pu. Estos resultados concuerdan con observaciones similares en otros promotores dependientes de σ^{54} , como el de *nifH* y el de *nifLA* de *K.pneumoniae*, en los que la introducción de giros completos de hélice permiten la activación de la transcripción, pero no así los giros que inducen cambios de fase en la hélice (Buck *et al.*, 1987; Minchin *et al.*, 1989). En conjunto, estos resultados indican que en los promotores dependientes de σ^{54} la disposición de los elementos de unión del holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa y de los reguladores es crítica para establecer los contactos correctos y promover la transcripción.

Para analizar con mayor detalle el efecto del desplazamiento de las UASs con

respecto al sitio de IHF sobre la expresión de Pu se introdujeron vueltas completas de hélice de distinta flexibilidad (Fig. 35). La inserción de una o dos vueltas completas de hélice era totalmente permisiva, ya que no afectaba a la inducción de Pu por XylR. En contraste, la introducción de tres vueltas de hélice afectaba notablemente a la expresión del promotor Pu mediada por XylR, ya que los niveles disminuían al 15% de la actividad máxima. Inouye *et al.* (1990) realizaron un estudio complementario alterando la distancia entre el consenso -12/-24 y el sitio de unión de IHF; la introducción de medio giro o un giro y medio eliminaba la capacidad de inducción de Pu, mientras que la inserción de una o dos vueltas completas de la hélice de ADN apenas afectaba a la expresión del promotor. En conjunto, nuestros resultados y los de Inouye *et al.* (1990) sugieren que IHF interviene sólo físicamente en la regulación de Pu y no interacciona con XylR, y probablemente tampoco con el holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa. De Lorenzo *et al.* (1991) han observado además que XylR e IHF se unen a Pu independientemente, ya que la unión de cada factor al promotor no se ve afectada por las concentraciones del otro. Análogamente, Hoover *et al.* (1990) han demostrado que IHF no facilita tampoco la unión del complejo σ^{54} -ARN-polimerasa al consenso -12/-24 en el promotor de *nifH* de *K.pneumoniae*.

Claverie-Martín y Magasanik observaron que la modificación de la distancia entre el consenso -12/-24 y el sitio de unión de IHF en el promotor *glnHp2* implica que IHF se comporte como un represor de la transcripción en lugar de facilitar su activación. Por tanto, parece existir una relación entre la posición del sitio de unión de IHF y su función como activador o represor (Goodman y Nash, 1989; Huang *et al.*, 1990; Snyder *et al.*, 1989; Thompson y Mossig, 1988).

Sin embargo, estas observaciones sobre la rigidez del posicionamiento de los sitios de unión del holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa, de IHF y las secuencias activadoras remotas en inserciones y deleciones cortas, contrastan con la movilidad a larga distancia de la posición de las secuencias reguladoras UASs con respecto al elemento -12/-24 en estos promotores, que se ha descrito como una de las características distintivas de éstos frente a los promotores dependientes de σ^{70} (Collado-Vides *et al.*, 1991). En efecto, las secuencias UASs se caracterizan por mantener su capacidad de activar la transcripción de sus promotores cuando se trasladan a más de

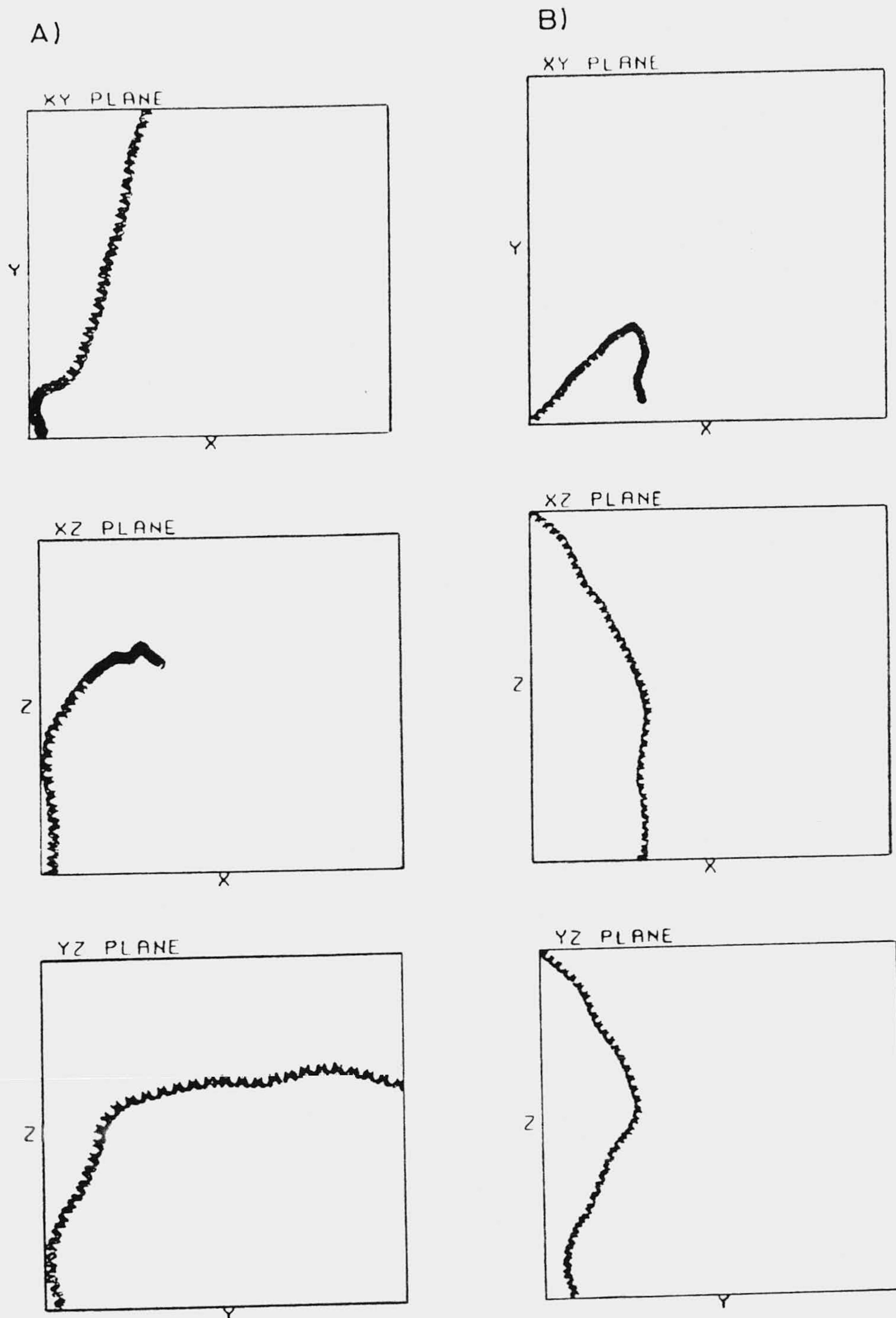


Figura 35: Distribución tridimensional de los dobleces en la secuencia de los promotores Pu y mutantes de Pu con inserciones de 32pb. A) Análisis de la estructura de la región de Pu comprendida entre +93 y -240. B) Análisis de la estructura de la región del promotor Pu(∇ 32pb, 75%GC) comprendida entre +93 y -272. Las proyecciones estereoscópicas de las secuencias en los tres planos indicados (XY, XZ, YZ) se realizaron con el programa DNASTAR (DNASTAR, Inc., UK). Los extremos inferiores en cada plano corresponden al extremo 5' en -240 y -272 de las secuencias respectivas.

1kb de su posición original; esta primera observación en el promotor de *nifH* de *K.pneumoniae* (Buck *et al.*, 1986) se extendió posteriormente al promotor *glnAp2* y otros promotores dependientes de σ^{54} (Birkman y Böck, 1989; Mullin y Newton, 1989; Reitzer y Magasanik, 1986). Inouye *et al.* (1990) también observaron que las secuencias UASs de Pu aún son capaces de activar la transcripción del promotor en presencia de XylR y sus efectores cuando se alejan entre 0,2kb y 1,2kb de su posición original, aunque manteniendo su posicionamiento específico respecto al sitio de IHF, y también cuando se invierte su orientación. Estos resultados junto con las observaciones de promotores con pequeñas deleciones e inserciones entre las UASs y el sitio de unión de IHF (Tabla 10), y entre éste y el consenso -12/-24 (Inouye *et al.*, 1990), sugieren que existe una escala de distancias, entre 20pb y 200pb, en que la separación relativa de las secuencias reguladoras (UASs, IHF y -12/-24) y su situación en las caras de la hélice es crítica para la transcripción de los promotores dependientes de σ^{54} , pero no así en distancias mayores.

Es de interés señalar que IHF no interviene en la estimulación de la transcripción de todos los promotores -12/-24. Collado-Vides *et al.* (1991) proponen que IHF actúa como un factor que refuerza la transcripción de promotores en los que el activador y/o el complejo σ^{54} -ARN-polimerasa se unen débilmente a sus respectivos sitios. En efecto, IHF participa en la activación de promotores con baja afinidad por el complejo σ^{54} -ARN-polimerasa, como el de *nifH* y *nifLA* (Buck y Cannon, 1989; Morett y Buck, 1989), o con baja afinidad por el activador, como *glnHp2* (Claverie-Martín y Magasanik, 1991). En el promotor débil *flbG* de *Caulobacter crescentus* (Newton *et al.*, 1989) parece ser que IHF interviene como un regulador temporal de la transcripción, ya que la concentración de IHF es máxima antes de la división celular (Gober y Shapiro, 1990).

El requerimiento de IHF viene determinado por la secuencia del promotor (Hoover *et al.*, 1990). Goodman y Nash (1989) han demostrado que IHF se puede sustituir funcionalmente por secuencias dobladas estructuralmente, y Claverie-Martín (comunicación personal) ha observado que los promotores ricos en Ts en la región entre -12 y -24 no requieren IHF para su activación. Este parece ser el caso de Ps, rico en Ts entre -10 y -20 (Holtel *et al.*, 1992), aunque en este promotor la función de

IHF se ve complicada por la presencia de dos promotores divergentes y solapados, uno dependiente de σ^{54} (Ps), y otro en tándem y dependiente de σ^{70} (Pr). Holtel *et al.* (1992) y de Lorenzo *et al.* (1991) han demostrado mediante ensayos de retardo en gel que IHF se une débilmente en dos sitios de Ps/Pr (Fig. 36), un sitio en la región de -40 con respecto al sitio de iniciación de la transcripción de Ps, y otro en la región de -160 de Ps, solapando con una de las UASs y con el promotor Pr₂ de *xyIR*, dependiente de σ^{70} . Se ha descrito la intervención de IHF en la transcripción de algunos promotores dependientes de σ^{70} . En unos casos funciona como represor, bloqueando el sitio de unión en -10/-35, como en *ilvGp1* (Pereira *et al.*, 1988) o en P_{cin} del fago λ (Griffo *et al.*, 1989); en otros casos funciona como activador transcripcional, como en algunos promotores del fago Mu (van Rijn *et al.*, 1988) y P_{LAC} de λ (Peacock *et al.*, 1984). Aunque la organización de los promotores Ps y Pr (Fig. 36) sugiere alguna función de IHF en la transcripción de Pr, Holtel *et al.* (1992) han observado que Pr tiene los mismos niveles de expresión en cepas de *E. coli* productoras y defectivas en IHF.

Por lo tanto, la interacción de IHF con Ps/Pr parece estar relacionada sólo con la expresión de Ps, pero de un modo muy diferente a como ocurre en Pu. La expresión de Ps en mutantes de *E. coli* IHF⁻ disminuye mucho menos que la de Pu; en contraste, en cepas IHF⁺ la expresión basal de Ps es muy baja en ausencia de efectores de XylR, pero en condiciones de inducción alcanza valores de expresión similares a los de Pu. Esto sugiere que IHF compite débilmente con XylR por sus sitios respectivos de unión en Ps, que están solapados (Fig. 36) (Holtel *et al.*, 1992). Es de interés señalar que tanto las UASs como los sitios de unión de IHF en Ps están muy poco conservados (Figs. 6 y 32), y por tanto es posible que ambos factores se unan débilmente al promotor. La activación de XylR por sus efectores podría aumentar la afinidad del activador por su sitio de unión frente a IHF.

Las diferencias en la posición de los sitios de unión de IHF en Pu y Ps también sugieren que la interacción del factor con ambos promotores tiene funciones diferentes. Su papel en la transcripción de Ps no está claro, pero la composición en bases de Ps, rica en Ts en -10, sugiere que el factor no es necesario para la activación de la transcripción mediada por XylR; más bien parece que IHF ejerce un control

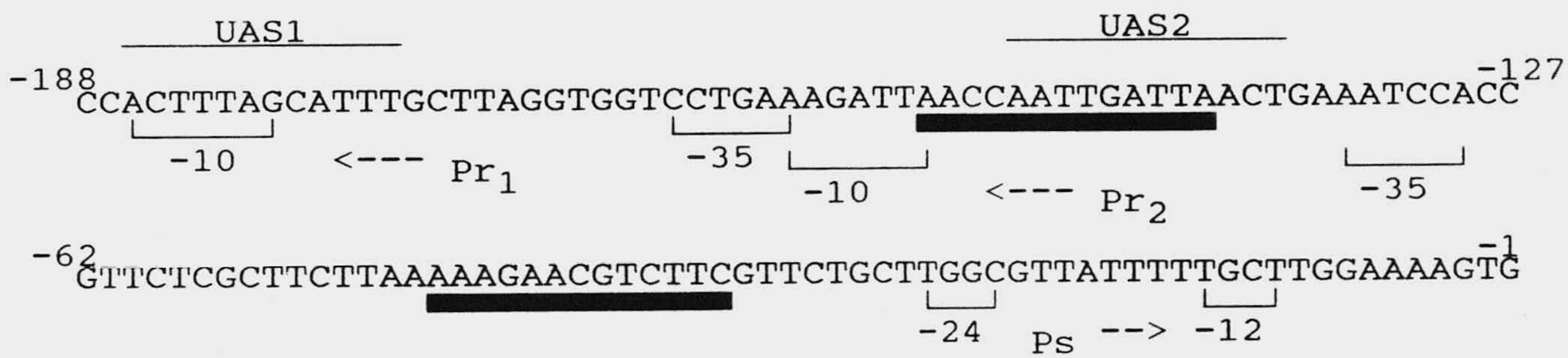


Figura 36: Organización estructural de los promotores Ps/Pr. La secuencia y la numeración de las bases con respecto a los puntos de iniciación de la transcripción son de Inouye *et al.* (1987a). Las regiones de unión de IHF se señalan mediante barras gruesas; las secuencias activadoras remotas de Ps se indican mediante líneas (UAS1 y UAS2); las secuencias consensus -10/-35 de Pr y -12/-24 de Ps están señaladas por cajas; las flechas indican el sentido de la transcripción.

indirecto compitiendo con XylR por el sitio de unión, favoreciendo el mecanismo de transcripción coordinadamente regulada de Ps y Pr.

En contraste con Ps, Pu contiene un solo sitio de unión de IHF. Las proyecciones cilíndricas de las caras de la hélice de Pu realizadas por de Lorenzo *et al.* (1991) muestran que IHF se une en la mitad del fragmento que separa las UASs y el consenso -12/-24, y en la cara opuesta de la hélice respecto a XylR y el holoenzima σ^{54} -ARN-polimerasa (Fig. 37). El doblar de la región central inducido por IHF pondría en contacto al activador XylR unido a las UASs con el complejo σ^{54} -ARN-polimerasa unido a -12/-24 catalizando la formación del complejo abierto para iniciar la transcripción de operón "upper".

Un elemento importante en el control transcripcional de los operones de TOL es la regulación de la síntesis del regulador primario del sistema, la proteína XylR. La regulación de la transcripción desde los promotores del gen *xylR*, Pr₁ y Pr₂, fue descrita por Inouye *et al.* (1987a) basándose en los análisis cuantitativos de expresión desde Pr en fusiones transcripcionales al gen de resistencia a ampicilina en presencia o ausencia de XylR. Asimismo, la cinética de expresión del promotor Pu en fusiones transcripcionales a *lacZ* con o sin *xylR* en *trans* (Fig. 18) sugería que la concentración intracelular de XylR no era constante. Los ensayos de expresión de Pr en fusiones transcripcionales a *lacZ* realizados en este trabajo, demostraron que XylR controla su propia síntesis mediante un mecanismo de represión de su promotor. Además este efecto se ve favorecido en presencia de efectores (Tabla 5), de manera que los mejores inductores de Pu tienen mayor efecto represor sobre Pr. Esto no es sorprendente teniendo en cuenta la estructura de los promotores de los genes reguladores, Pr y Ps (Fig. 36). Los dos promotores están solapados y se transcriben divergentemente, pero mientras Pr contiene dos puntos de iniciación de la transcripción precedidos por el consenso -10/-35 para reconocimiento por σ^{70} , Ps es un promotor -12/-24 dependiente de σ^{54} activado por XylR en presencia de sus efectores. El análisis de Ps mediante inserciones y deleciones (Holtel *et al.*, 1990, 1992) indica que las regiones distales centradas en -143 y -181 que presentan homología con las UASs de Pu (Fig. 6) son también secuencias en las que se une XylR para iniciar la transcripción de *xylS*. Estas regiones de Ps solapan con los dos

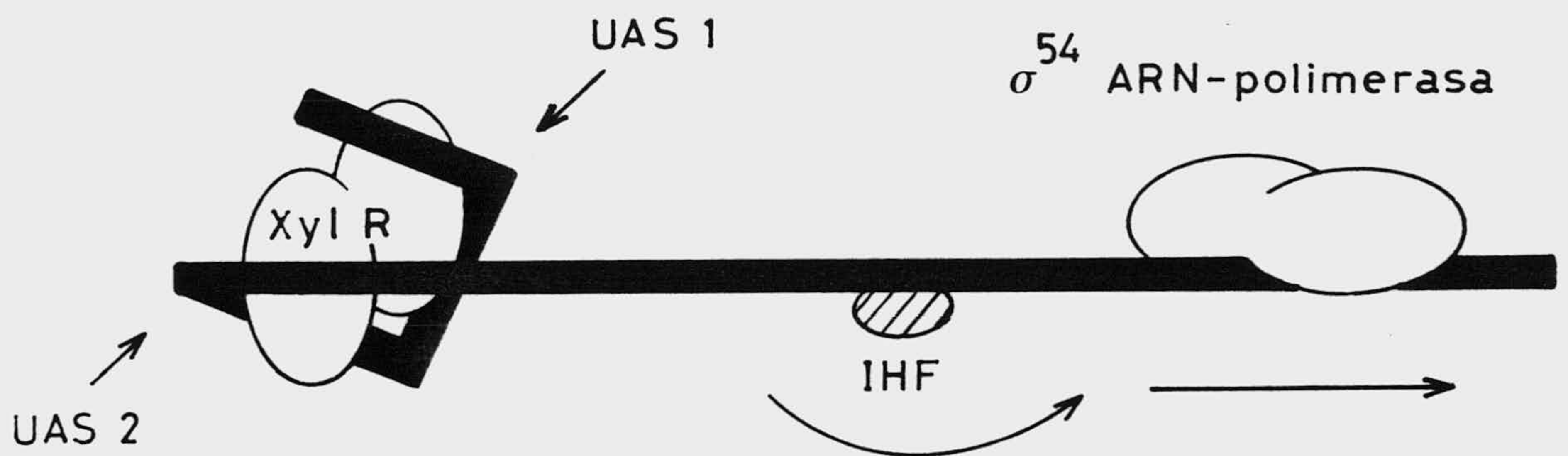


Figura 37: Representación del modelo de interacción de Pu con XylR e IHF. La distribución de los factores que intervienen en la transcripción de Pu a lo largo de la secuencia del promotor se basan en los datos de protección de ADN-asa *in vitro* y de proyecciones cilíndricas de las caras de la hélice (de Lorenzo *et al.*, 1991). La orientación del doblamiento inducido por IHF y el sentido de la transcripción se indican mediante flechas.

promotores en tándem de Pr, de manera que la unión de XylR a las UASs de Ps ocupa las secuencias en -10/-35 de los promotores de Pr, impidiendo la unión del holoenzima σ^{70} -ARN-polimerasa para iniciar la transcripción de *xyIR*. Puesto que las secuencias palindrómicas de Ps están muy poco conservadas respecto a las de Pu (Fig. 6), es probable que XylR no esté unido permanentemente a las UASs de Ps, como ocurre en Pu, o al menos lo haga con más baja afinidad. En presencia de efectores esta interacción podría verse favorecida, disparándose la transcripción de *xyIS* y desencadenando el efecto en cascada para la transcripción de Pm, y a su vez bloqueando la transcripción de Pr. Por tanto, si los mejores efectores de XylR favorecen más su unión a Ps, es posible pensar que tengan mayor efecto represor sobre Pr (Tabla 5).

4.3 Perpectivas de la manipulación genética de la ruta "upper" del plásmido TOL pWW0.

A pesar del amplio espectro de efectores de XylR y de la versatilidad de los enzimas de la ruta "upper" para metabolizar una amplia variedad de derivados sustituidos de tolueno, el grupo de los compuestos nitrosustituidos es resistente a la degradación a través de las rutas catabólicas de TOL. Este grupo de compuestos no sólo son muy recalcitrantes (Schmidt *et al.*, 1987), sino que muchos son además altamente tóxicos y algunos son potentes mutágenos. Este tipo de compuestos se encuentra en residuos industriales resultantes de la producción de explosivos, herbicidas, pinturas y poliuretano.

Delgado *et al.* (1992) demostraron que los enzimas de la ruta "upper" son capaces de oxidar *m*- y *p*-nitrotolueno, aunque no *o*-nitrotolueno ni 3,4-dinitrotolueno. En contraste, ninguno de los derivados de tolueno, alcohol bencílico o benzaldehído con sustituciones por grupos nitro fueron efectores de XylR en ensayos de expresión de Pu en fusiones de Pu a *lacZ*.

Puesto que el primer punto que bloquea la degradación de nitroaromáticos a través de las rutas catabólicas de TOL se encuentra a nivel de síntesis de los enzimas de la ruta, las primeras aproximaciones experimentales para obtener cepas de *Pseudomonas* capaces de mineralizar estos compuestos deberán centrarse en los acontecimientos relacionados con la regulación transcripcional de los genes catabólicos. La caracterización detallada del promotor Pu y de los factores que intervienen en la activación de su transcripción, en particular la interacción de XylR con las secuencias activadoras del promotor, será de utilidad en el diseño de las estrategias experimentales para obtener mutantes de XylR capaces de estimular la transcripción en presencia de nitroaromáticos.

Capítulo 5

Conclusiones.

Los estudios de la inducción y de la bioquímica de las rutas "upper" y *meta* para la degradación de tolueno y xilenos codificadas por el plásmido TOL pWW0 de *P.putida* han permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. El regulador primario de la transcripción de los operones "upper" y *meta* del plásmido TOL pWW0, la proteína XylR, reconoce como efectores una amplia gama de derivados de tolueno, alcohol bencílico y benzaldehído, entre ellos un buen número que son inductores gratuitos, ya que no son sustratos de los enzimas de las rutas catabólicas de TOL.
2. De los tres enzimas que componen la ruta "upper" para la oxidación de tolueno a benzoato, las dos deshidrogenasas -alcohol bencílico deshidrogenasa y benzaldehído deshidrogenasa- presentan un amplio perfil de sustratos, siendo el primer enzima de la ruta, la tolueno monooxigenasa, el paso limitante para la degradación de algunos derivados de tolueno, incluyendo *p*-etiltolueno y *m*- y *p*-clorotolueno.
3. La expansión del perfil de sustrato de la tolueno monooxigenasa mediante mutagénesis química para permitir la oxidación de *p*-etiltolueno y su ensamblaje a una ruta *meta* previamente manipulada en el laboratorio, permitió construir la cepa *P.putida* EEZ3 (pWW0-EB62), capaz de crecer a expensas de *p*-etiltolueno como fuente de carbono y energía.

4. El ensamblaje de la ruta "upper" del plásmido TOL pWW0 de *P.putida* a la ruta *orto* de *Pseudomonas* sp. B13 para el metabolismo de clorocatecoles, permitió el aislamiento de la cepa *Pseudomonas* sp. EEZ5 (pWW0), capaz de crecer a expensas de *m*-clorotolueno como fuente de carbono.

De los estudios de la regulación a nivel transcripcional del promotor de la ruta "upper", Pu, y de los promotores del gen *xylR*, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. El activador de la transcripción del promotor Pu, XylR, se une a secuencias activadoras remotas, UAS1 y UAS2, que contienen secuencias palindrómicas centradas en -130 y -168 respecto al punto principal de iniciación de la transcripción.
2. XylR se une a las UASs en ausencia de efectores, existiendo probablemente interacciones cooperativas en su unión. En el motivo UAS1 la G-169 parece jugar un papel crítico en el reconocimiento por XylR de dicha secuencia.
3. El perfil de interacciones de XylR con las UASs se altera en presencia de efectores, siendo probablemente estas modificaciones las responsables de la estimulación de la transcripción.
4. El factor de integración del hospedador (IHF) se requiere para la expresión máxima de Pu mediada por XylR y efectores, interaccionando con la región de -55 a -67 con respecto al punto de iniciación de la transcripción.
5. IHF desempeña un papel de tipo físico en la transcripción de Pu, probablemente induciendo el doblamiento de la región en la que se une para permitir la interacción de XylR con el complejo σ^{54} -ARN-polimerasa, ya que la posición en las caras de la hélice de ADN y la distancia relativa de las UASs, del sitio de reconocimiento de IHF y del consenso -12/-24 son críticas para la activación de la transcripción en presencia de IHF.
6. El activador XylR autoregula su síntesis, probablemente bloqueando el sitio de unión del complejo σ^{70} -ARN-polimerasa a los promotores Pr₁ y Pr₂, que

solapan con las secuencias UASs y con un sitio de unión de IHF del promotor divergente Ps.

Bibliografía

- [1] Abril, M.A., Michán, C., Timmis, K.N. y Ramos, J.L. 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.*, 171:6782–6790.
- [2] Abril, M.A., Buck, M. y Ramos, J.L. 1991. Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. *J. Biol. Chem.*, 266:15832–15838.
- [3] Adhya, S. y Garges, S. 1990. Positive control. *J. Biol. Chem.*, 265:10797–10800.
- [4] Alvarez-Morales, A., Betancourt-Alvarez, M., Kaluza, K. y Hennecke, H. 1986. Activation of the *Bradyrhizobium japonicum* *nifH* and *nifDK* operons is dependent on promoter upstream DNA sequences. *Nucl. Acids Res.*, 14:4207–4227.
- [5] Ames, G.F.L. y Nikaido, K. 1985. Nitrogen regulation in *Salmonella typhimurium*. Identification of a *ntnC* protein-binding site and definition of a consensus binding sequence. *EMBO J.*, 4:539–547.
- [6] Arnosti, D.N. y Chamberlin, M.J. 1989. Secondary σ factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86:830–834.
- [7] Atlung, T., Nielsen, A. y Hansen, F.G. 1989. Isolation, characterization and nucleotide sequence of *appY*, a regulatory gene for growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 171:1683–1691.

- [8] Austin, S., Henderson, N. y Dixon, R. 1987. Requirements for transcriptional activation *in vitro* of the nitrogen regulated *glnA* and *nifLA* promoters from *Klebsiella pneumoniae*: dependence on activator concentration. *Mol. Microbiol.*, 1:92-100.
- [9] F.M. Ausubel. 1984. Regulation of nitrogen fixation genes. *Cell*, 37:5-6.
- [10] Bartels, I., Knackmuss, H.J. y Reineke, W. 1984. Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:500-505.
- [11] Bennet, L.T., Cannon, F. y Dean, D. 1988. Nucleotide sequence and mutagenesis of the *nifA* gene from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.*, 2:315-321.
- [12] Benson, S. y Shapiro, J. 1978. TOL is a broad-host-range plasmid. *J. Bacteriol.*, 135:278-280.
- [13] Beynon, J., Cannon, M., Buchanan-Wollaston, V. y Cannon, F. 1983. The *nif* promoters of *Klebsiella pneumoniae* have a characteristic primary structure. *Cell*, 34:665-671.
- [14] Biek, D.P. y Cohen, S.N. 1986. Identification and characterization of *recD*, a gene affecting plasmid maintenance and recombination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 167:594-603.
- [15] Birkman, A., Sawers, R.G. y Böck, A. 1987. Involvement of the *ntrA* gene product in the anaerobic metabolism of *E.coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 210:535-542.
- [16] Birkman, A. y Böck, A. 1989. Characterization of a *cis* regulatory DNA element necessary for formate induction of the formate dehydrogenase gene (*fdhF*) of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 3:187-195.
- [17] Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. y Falkow, S. 1977. Construction and

- characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2:95–113.
- [18] M.M. Bradford. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254.
- [19] Bradley, D.E. y Williams, P.A. 1982. The TOL plasmid is naturally derepressed for transfer. *J. Gen. Microbiol.*, 128:3019–3024.
- [20] Braun, V. y Schmitz, G. 1980. Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.*, 124:55–61.
- [21] de Bruijn, F.J. y Ausubel, F.M. 1983. The cloning and characterization of the *glnF* (*ntrA*) gene of *Klebsiella pneumoniae*: role of *glnF* (*ntrA*) in the regulation of nitrogen fixation (*nif*) and other nitrogen assimilation genes. *Mol. Gen. Genet.*, 192:342–353.
- [22] Brunelle, A. y Schleif, R. 1989. Determining residue-base interactions between AraC protein and *araI* DNA. *J. Mol. Biol.*, 209:607–622.
- [23] Buck, M., Miller, S., Drummond, M. y Dixon, R. 1986. Upstream activators are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature*, 320:374–378.
- [24] Buck, M., Cannon, W. y Woodcock, J. 1987. Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter may involve DNA loop formation. *Mol. Microbiol.*, 1:243–249.
- [25] Buck, M. y Cannon, W. 1989. Mutations in the RNA polymerase recognition sequence of the *Klebsiella pneumoniae nifH* promoter permitting transcriptional activation in the absence of NifA binding to upstream activator sequences. *Nucl. Acids Res.*, 17:2597–2612.
- [26] Cannon, W.V., Kreutzer, R., Kent, H.M., Morett, E. y Buck, M. 1990. Activation of the *Klebsiella pneumoniae nifU* promoter: identification of multiple and overlapping upstream NifA binding sites. *Nucl. Acids Res.*, 18:1693–1701.

- [27] Carlson, C.A., Pierson, L.S., Rosen, J.J. y Ingraham, J.L. 1983. *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *J. Bacteriol.*, 153:93-99.
- [28] Casadaban, M.J., Chou, J. y Cohen, S.N. 1980. *In vitro* gene fusions that join an enzymatically active β -galactosidase segment to aminoterminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J. Bacteriol.*, 143:971-980.
- [29] Castaño, I. y Bastarrachea, F. 1984. *glnF-lacZ* fusions in *Escherichia coli*: studies on *glnF* expression and its chromosomal orientation. *Mol. Gen. Genet.*, 195:228-233.
- [30] P.H. Clarke. 1982. The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie van Leeuwenhoek*, 48:105-130.
- [31] P.H. Clarke. 1984. The evolution of degradative pathways. En: Microbial degradation of organic compounds. D.T. Gibson (Ed.), Marcel Dekker Inc., pp. 11-29.
- [32] Claverie-Martín, F. y Magasanik, B. 1991. Role of integration host factor in the regulation of the *glnHp2* promoter of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88:1631-1635.
- [33] Clelow, L.J., Cresswell, N. y Wellington, E.M.H. 1990. Mathematical model of plasmid transfer between strains of streptomycetes in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:3139-3145.
- [34] Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. y Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69:2110-2117.
- [35] Collado-Vides, J., Magasanik, B. y Gralla, J.D. 1991. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 55:371-394.

- [36] Connell, N., Han, Z., Moreno, F. y Kolter, R. 1987. An *E.coli* promoter induced by the cessation of growth. *Mol. Microbiol.*, 1:195–201.
- [37] Contreras, A. y Drummond, M. 1988. The effect on the function of the transcriptional activator NtrC from *Klebsiella pneumoniae* of mutations in the DNA-recognition helix. *Nucl. Acids Res.*, 16:4025–4039.
- [38] S. Dagley. 1986. Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in *Pseudomonas*. En: The Bacteria. A treatise on structure and function. Vol. X: The biology of *Pseudomonas*. J.R. Sokatch (Ed.), Academic Press Inc., pp. 527–556.
- [39] Dassa, E., Cahu, M., Desjoyaux-Cherel, B. y Bocquet, P.L. 1982. The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 257:6669–6676.
- [40] Delgado, A., Wubbolts, M.G., Abril, M.A. y Ramos, J.L. 1992. Nitroaromatics are substrates for the TOL plasmid upper pathway enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:en prensa.
- [41] R. Dixon. 1984. The genetic complexity of nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.*, 130:2745–2755.
- [42] R. Dixon. 1986. The *xylABC* promoter from the *Pseudomonas* TOL plasmid is activated by nitrogen regulatory genes in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 206:129–136.
- [43] Don, R.H., Weightman, A.J., Knackmuss, H.J. y Timmis, K.N. 1985. Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.*, 161:85–90.
- [44] Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W. y Knackmuss, H.J. . 1974. Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. *Arch. Microbiol.*, 99:61–70.

- [45] Dorn, E. y Knackmuss, H.J. 1978. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown pseudomonad. *Biochem. J.*, 174:73–84.
- [46] Drlica, K. y Rouvière-Yaniv, J. 1987. Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.*, 51:301–319.
- [47] Drummond, M., Clements, J., Merrick, M. y Dixon, R. 1983. Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, 301:302–307.
- [48] Drummond, M., Whitty, P. y Wootton, J. 1986. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. *EMBO J.*, 5:441–447.
- [49] Englesberg, E., Irr, J., Power, J. y Lee, N. 1965. Positive control of enzyme synthesis by the gene C in the L-arabinose system. *J. Bacteriol.*, 90:946–957.
- [50] C.A. Fewson. 1988. Microbial metabolism of mandalate: a microcosm of diversity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 54:85–110.
- [51] Fischer, H.M., Alvarez-Morales, A. y Hennecke, H. 1986. The pleiotropic nature of symbiotic regulatory mutants: *Bradyrhizobium japonicum nifA* gene is involved in control of *nif* gene expression and formation of determinate symbiosis. *EMBO J.*, 5:1165–1173.
- [52] Fischer, H.M., Bruderer, T. y Hennecke, H. 1988. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. *Nucl. Acids Res.*, 16:2207–2224.
- [53] Flamm, E.L. y Weisberg, R.A. 1985. Primary structure of the *hip* gene of *Escherichia coli* and of its product, the β -subunit of integration host factor. *J. Mol. Biol.*, 183:117–128.

- [54] Franklin, F.C.H. y Williams, P.A. 1980. Construction of a partial diploid for the degradative pathway encoded by the TOL plasmid (pWW0) from *Pseudomonas putida* mt-2: evidence for the positive nature of the regulation of *xylR* gene. *Mol. Gen. Genet.*, 177:321–328.
- [55] Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M. y Timmis, K.N. 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of the genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78:7458–7462.
- [56] Franklin, F.C.H., Lehrbach, P.R., Lurz, R., Rückert, B., Bagdasarian, M. y Timmis, K.N. 1983. Localization and functional analysis of transposon mutations in regulatory genes of the TOL catabolic pathway. *J. Bacteriol.*, 154:676–685.
- [57] Frey, J. y Bagdasarian, M. 1989. The molecular biology of IncQ plasmids of gram-negative bacteria. En: Promiscuous plasmids of gram-negative bacteria. C.M. Thomas (Ed.), Academic Press Inc., pp. 79–94.
- [58] D.I. Friedman. 1988. Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell*, 55:545–554.
- [59] Fry, D.C., Kuby, S.A. y Mildvan, A.S. 1986. ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with *ras*-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:907–911.
- [60] Gamas, P., Galas, D., y Chandler, M. 1985. DNA sequence at the end of IS1 required for transposition. *Nature*, 317:458–460.
- [61] García, E., Bancroft, S., Rhee, S.G. y Kustu, S. 1977. The product of a newly identified gene *glnF*, is required for synthesis of glutamine synthetase in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74:1662–1666.

- [62] Gibson, D.T. y Subramanian, V. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. En: Microbial degradation of organic compounds. D.T. Gibson (Ed.), Marcel Dekker Inc., pp. 181–252.
- [63] Giniger, E. y Ptashne, M. 1987. Transcription in yeast activated by a putative amphipathic alpha helix linked to a DNA binding unit. *Nature*, 330:670–672.
- [64] Givshov, M., Olsen, L. y Molin, S. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for extracellular phospholipase A1 from *Serratia liquefaciens*. *J. Bacteriol.*, 170:5855–5962.
- [65] Gober, J.W. y Shapiro, L. 1990. Integration host factor is required for the activation of developmentally regulated genes in *Caulobacter*. *Genes Dev.*, 4:1494–1504.
- [66] Goldie, A. y Sanwal, B. 1980. Genetic and physiological characterization of *Escherichia coli* mutants deficient in phosphoenolpyruvate carboxykinase activity. *J. Bacteriol.*, 141:1115–1121.
- [67] Goodman, S.D. y Nash, H.A. 1989. Functional replacement of a protein induced bend in a DNA recombination site. *Nature*, 341:251–254.
- [68] Goodrich, J.A., Schwartz, M.L. y McClure, W.R. 1990. Searching for and predicting the activity of sites for DNA binding proteins: compilation and analysis of the binding sites for *Escherichia coli* integration host factor (IHF). *Nucl. Acids Res.*, 18:4993–5000.
- [69] Graham, J.B. y Istock, C.A. 1978. Genetic exchange of *Bacillus subtilis* in soil. *Mol. Gen. Genet.*, 166:287–290.
- [70] J.D. Gralla. 1991. Transcriptional control: lessons from an *E.coli* promoter data base. *Cell*, 66:415–418.

- [71] Greenstein, D., Zinder, N.D. y Horiuchi, K. 1988. Integration host factor interacts with the DNA replication enhancer of filamentous phage F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:6262–6266.
- [72] Griffo, G., Oppenheim, A.B. y Gottesman, M.E. 1989. Reppresion of the Lambda P_{cin} promoter by integrative host factor. *J. Mol. Biol.*, 209:55–64.
- [73] Grossman, A.D., Erickson, J.E. y Gross, C.A. 1984. The *htpR* gene product of *E.coli* is a sigma factor for heat shock promoters. *Cell*, 38:383–390.
- [74] Gronger, P., Manian, S.S., Reilinder, H., O'Connell, M., Priefer, U.B. y Pühler, A. 1987. Organization and partial sequence of a DNA region of the *Rhizobium leguminosarum* symbiotic plasmid pRLJ6I containing the genes *fixABC*, *nifA*, *nifB* and a novel open reading frame. *Nucl. Acids Res.*, 15:31–49.
- [75] Gussin, G.N., Ronson, C.W. y Ausubel, F.M. 1986. Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu. Rev. Genet.*, 20:567–591.
- [76] Harayama, S., Lehrbach, P.R. y Timmis, K.N. 1984. Transposon mutagenesis analysis of *meta*-cleavage pathway operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.*, 160:251–255.
- [77] Harayama, S., Leppik, R.A., Rekik, M., Mermod, N., Lehrbach, P.R., Reineke, W. y Timmis, K.N. 1986. Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the *xylA* product. *J. Bacteriol.*, 167:455–461.
- [78] Harayama, S., Rekik, M., Wubbolts, M., Rose, K., Leppik, R.A. y Timmis, K.N. 1989. Characterization of five genes in the "upper"-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. *J. Bacteriol.*, 171:5048–5055.
- [79] Harayama, S. y Rekik, M. 1990. The *meta*-cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes. *Mol. Gen. Genet.*, 221:113–120.

- [80] Hattori, M. y Sakaki, Y. 1986. Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.*, 152:232–238.
- [81] Hawkes, T., Merrick, M. y Dixon, R. 1985. Interaction of purified NtrC protein with nitrogen regulated promoters from *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.*, 201:492–498.
- [82] Hellman, J.D., Marquez, L.M. y Chamberlin, M.J. 1988. Cloning, sequencing and disruption of the *Bacillus subtilis* σ^{28} gene. *J. Bacteriol.*, 170:1568–1574.
- [83] Hill, S., Kennedy, C., Kavanagh, E., Goldberg, R.B. y Hanau, R. 1981. Nitrogen fixation gene (*nifL*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, 290:424–426.
- [84] Höfte, M., Mergeay, M. y Verstraete, W. 1990. Marking the *Rhizopseudomonas* strain 7NSK2 with a Mud(lac) element for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:1046–1052.
- [85] Hogrefe, C., Romermann, D. y Friedrich, B. 1984. *Alcaligenes eutrophus* hydrogenase genes (*hox*). *J. Bacteriol.*, 158:43–48.
- [86] Holtel, A., Abril, M.A., Marques, S., Timmis, K.N. y Ramos, J.L. 1990. Promoter-upstream activator sequences are required for expression of the *xylS* gene and upper-pathway operon on the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Mol. Microbiol.*, 4:1551–1556.
- [87] Holtel, A., Timmis, K.N. y Ramos, J.L. 1992. Upstream binding sequences of the XylR activator protein and integration host factor in the *xylS* gene promoter region of the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Nucl. Acids Res.*, sometido a publicación.
- [88] Hoover, T.R., Santero, E., Porter, S. y Kustu, S. 1990. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NifA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell*, 63:11–22.

- [89] Hope, I.A., Mahadevan, S. y Struhl, K. 1988. Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein. *Nature*, 333:635–640.
- [90] Huala, E. y Ausubel, F.M. 1989. The central domain of *Rhizobium meliloti* NifA is sufficient to activate transcription from the *R.meliloti nifH* promoter. *J. Bacteriol.*, 171:3354–3365.
- [91] Huang, L., Tsui, P. y Freundlich, M. 1990. Integration host factor is a negative effector of in vivo and in vitro expression of *ompC* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 172:5293–5298.
- [92] Hugovieux-Cotte-Pattat, N., Reverchon, S., Condemine, G. y Robert-Baudoux, J. 1986. Regulatory mutations affecting the synthesis of pectate lyase in *Erwinia chrysantemi*. *J. Gen. Microbiol.*, 132:2099–2106.
- [93] Hugovieux-Cotte-Pattat, N., Köhler, T., Rekik, M. y Harayama, S. 1990. Growth-phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0 catabolic genes. *J. Bacteriol.*, 172:6651–6660.
- [94] Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. 1981. Molecular cloning of gene *xylS* of the TOL plasmid: evidence for positive regulation of of the *xylDEGF* operon by *xylS*. *J. Bacteriol.*, 148:413–418.
- [95] Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. 1983. Molecular cloning of regulatory gene *xylR* and operator promoter regions of the *xylABC* and *xylDEGF* operons of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.*, 155:1192–1199.
- [96] Inouye, S., Ebina, Y., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. 1984. Nucleotide sequence surrounding transcription initiation site of *xylABC* operon on TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:1688–1691.
- [97] Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, A. 1985. Determination of the transcription initiation site and identification of the protein product of the regulatory gene *xylR* for *xyl* operons on the TOL plasmid. *J. Bacteriol.*, 163:863–869.

- [98] Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. 1986. Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylS* on the *Pseudomonas putida* TOL plasmid and identification of the protein product. *Gene*, 44:235–242.
- [99] Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. 1987a. Expression of the regulatory gene *xylS* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xylR* product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84:5182–5186.
- [100] Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. 1987b. Overproduction of the *xylS* gene product and activation of the *xyiDLEG* operon of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.*, 169:3587–3592.
- [101] Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. 1988. Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylR* of the TOL plasmid from *Pseudomonas putida*. *Gene*, 66:301–306.
- [102] Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. 1989. Cloning and sequence analysis of the *ntrA* (*rpoN*) gene of *Pseudomonas putida*. *Gene*, 85:145–152.
- [103] Inouye, S., Gomada, M., Sangodkar, U.M.X. y Nakazawa, A. 1990. Upstream regulatory sequence for transcriptional activator XylR in the first operon of xylene metabolism on the TOL plasmid. *J. Mol. Biol.*, 216:251–260.
- [104] Ish-Horowicz, D. y Burk, J.F. 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucl. Acids Res.*, 9:2989–2998.
- [105] Jacoby, G.A., Rogers, J.E., Jacob, A.E. y Hedges, R.W. 1978. Transposition of *Pseudomonas* toluene-degrading genes and expression in *Escherichia coli*. *Nature*, 274:179–180.
- [106] Jeenes, D.J., Reineke, W., Knackmuss, H.J. y Williams, P.A. 1982. TOL plasmid pWW0 in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: enzyme regulation and DNA structure. *J. Bacteriol.*, 150:180–187.

- [107] Jiang, J., Gu, B., Albright, L.A. y Nixon, B.T. 1989. Conservation between coding and regulatory elements of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* *dct* genes. *J. Bacteriol.*, 171:5244–5253.
- [108] Johnson, K., Parker, M.L. y Lory, S. 1986. Nucleotide sequence and transcriptional initiation site of two *Pseudomonas aeruginosa* pilin genes. *J. Biol. Chem.*, 261:15703–15708.
- [109] Johnston, A.W.B. y Downie, J.A. 1984. What is a *nif* promoter? *Trends Biochem. Sci.*, 9:367–368.
- [110] Jones, R. y Haselkorn, R. 1989. The DNA sequence of the *Rhodobacter capsulatus* *ntrA*, *ntrB* and *ntrC* gene analogues required for nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.*, 215:507–516.
- [111] N. Jones. 1990. Transcriptional activation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell*, 61:9–11.
- [112] Jouanin, L., de la Judie, P., Bagztoux, S. y Huguet, T. 1981. DNA sequence homology in *Rhizobium meliloti* plasmids. *Mol. Gen. Genet.*, 182:189–195.
- [113] Joyce, C.M. y Grindley, N.D.F. 1984. Method for determining whether a gene of *Escherichia coli* is essential: application to the *polA* gene. *J. Bacteriol.*, 158:636–643.
- [114] Keener, J., Wong, P., Popham, D., Wallis, J. y Kustu, S. 1987. A sigma factor and auxiliary proteins required for nitrogen regulated transcription in enteric bacteria. En: RNA polymerase and the regulation of transcription. W.S. Reznikoff (Ed.), Elsevier Science Publishing Co., pp. 159–175.
- [115] Kell, H., Saint, C.M. y Williams, P.A. 1987. Gene organisation of the first catabolic operon of the TOL plasmid pWW53: production of indigo by the *xylA* gene product. *J. Bacteriol.*, 169:764–770.
- [116] Kennedy, M., Chandler, M. y Lane, D. 1988. Mapping and regulation of the *pifC* promoter of the F plasmid. *Biochim. Biophys. Acta*, 950:75–80.

- [117] Kikuchi, Y. y Nash, H.A. 1978. The bacteriophage Lambda *int* gene product. *J. Biol. Chem.*, 253:7149–7157.
- [118] Köhler, T., Harayama, S., Ramos, J.L. y Timmis, K.N. 1989. Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN σ factor in regulation of various metabolic functions. *J. Bacteriol.*, 171:4326–4333.
- [119] Kosturko, L.D., Daub, E. y Murialdo, H. 1989. The interaction of *E.coli* integration host factor and Lambda *cos* DNA: multiple complex formation and protein-induced bending. *Nucl. Acids Res.*, 17:317–334.
- [120] Kroos, L., Kunkel, B. y Losick, R. 1989. Switch protein alters specificity of RNA polymerase containing a compartment-specific sigma factor. *Science*, 243:526–528.
- [121] Kunkel, T.A., Roberts, J.D. y Zakour, R.A. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Meth. Enzymol.*, 154:367–382.
- [122] Kunz, D.A. y Chapman, P.J. 1981. Catabolism of pseudocumene and 3-ethyltoluene by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for new functions of the TOL (pWW0) plasmid. *J. Bacteriol.*, 146:179–191.
- [123] Kustu, E., Santero, E., Keener, J., Popham, D. y Weiss, D. 1989. Expression of σ^{54} (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.*, 53:367–376.
- [124] Landshulz, W.H., Johnson, P.F. y McNight, S.L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240:1759–1764.
- [125] Lebens, M.R. y Williams, P. 1985. Complementation of deletion and insertion mutants of TOL plasmid pWW0: regulatory implications and location of *xylC* gene. *J. Gen. Microbiol.*, 131:3261–3269.

- [126] Lehrbach, P.R., Zeyer, J., Reineke, W., Knackmuss, H.J. y Timmis, K.N. 1984. Enzyme recruitment *in vitro*: use of cloned genes to extend the range of haloaromatics degraded by *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.*, 158:1025–1032.
- [127] Leonardo, J.M. y Goldberg, R.B. 1980. Regulation of nitrogen metabolism in glutamine auxotrophs of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 142:99–110.
- [128] Leong, J.M., Nunes-Duby, S., Lesser, C.F., Youderian, P., Susskind, M.M. y Landy, A. 1985. The $\phi 80$ and P22 attachment sites: primary structure and interaction with *Escherichia coli* integration host factor. *J. Biol. Chem.*, 260:4468–4477.
- [129] Lessie, T.G. y Graffney, T. 1986. Catabolic potential of *Pseudomonas cepacia*. En: The Bacteria. A treatise on structure and function. Vol. X: The biology of *Pseudomonas*. J.R. Sokatch (Ed.), Academic Press Inc., pp. 439–482.
- [130] Lindquist, S. y Craig, E.A. 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22:631–677.
- [131] de Lorenzo, V., Herrero, M., Metzke, M. y Timmis, K.N. 1991. An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the σ^{54} -dependent Pu promoter of TOL plasmid. *EMBO J.*, 10:1159–1167.
- [132] Losick, R., Youngman, P. y Piggot, P.J. 1986. Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.*, 20:625–670.
- [133] Løve-Larsen, J.E., Gerdes, K., Light, J. y Molin, S. 1984. Low-copy number plasmid-cloning vectors amplifiable by derepression of an inserted foreign promoter. *Gene*, 28:45–54.
- [134] B. Magasanik. 1988. Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. *Trends Biochem. Sci.*, 13:475–479.

- [135] Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press. New York.
- [136] McClure, N.C., Weightman, A.J. y Fry, J.C. 1989. Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated-sludge unit. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:2627–2634.
- [137] McNeil, T., Roberts, G.P., McNeil, D. y Tyler, B. 1982. The products of *glnL* and *glnG* are bifunctional regulatory proteins. *Mol. Gen. Genet.*, 188:325–333.
- [138] Mechulam, Y., Fayat, G. y Blanquet, S. 1985. Sequence of the *Escherichia coli pheST* operon and identification of the *himA* gene. *J. Bacteriol.*, 163:787–791.
- [139] Mermod, N., Lehrbach, P.R., Reineke, W. y Timmis, K.N. 1984. Transcription of the TOL plasmid toluate catabolic pathway operon of *Pseudomonas putida* is determined by a pair of co-ordinately and positively regulated overlapping promoters. *EMBO J.*, 3:2361–2466.
- [140] Mermod, N., Ramos, J.L., Lehrbach, P.R. y Timmis, K.N. 1986. Vector for regulated expression of cloned genes in a wide range of Gram negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 167:447–457.
- [141] Mermod, N., Ramos, J.L., Bairoch, A. y Timmis, K.N. 1987. The *xylS* gene positive regulator of TOL plasmid pWW0: identification, sequence analysis and overproduction leading to constitutive expression of *meta*-cleavage operon. *Mol. Gen. Genet.*, 207:349–354.
- [142] Merrick, M., Hill, S., Hennecke, H., Hahn, M., Dixon, R. y Kennedy, C. 1982. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.*, 185:75–81.
- [143] M. Merrick. 1983. Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. *EMBO J.*, 2:29–44.

- [144] Merrick, M. y Gibbins, J.R. 1985. The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntrA* of *Klebsiella pneumoniae* and comparison with conserved features in bacterial RNA polymerase sigma factors. *Nucl. Acids Res.*, 13:7607–7620.
- [145] Merrick, M. y Stewart, W.D.P. 1985. Studies on the regulation and function of the *Klebsiella pneumoniae ntrA* gene. *Gene*, 35:297–303.
- [146] Merrick, M., Gibbins, J. y Toukdarian, A. 1987. The nucleotide sequence of the sigma factor gene *ntrA* (*rpoN*) of *Azotobacter vinelandii*: analysis of conserved sequences in NtrA proteins. *Mol. Gen. Genet.*, 210:323–330.
- [147] Messing, J., Gronengorn, B., Muller-Hill, B. y Hofschneider, P.H. 1977. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a *HindIII* fragment of the *lac* regulatory region in M13 replicative form *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74:3642–3646.
- [148] J. Messing. 1979. A multipurpose cloning system based on single stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.*, 2:43–48.
- [149] J. Messing. 1983. New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.*, 101:20–78.
- [150] Meyer, T.F., Billyard, E., Haas, R., Storzbach, S. y So, M. 1984. Pilus genes of *Neisseria gonorrhoeae*: chromosomal organization and DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:6110–6114.
- [151] C. Michán. 1991. Manipulación genética de rutas metabólicas de bacterias del género *Pseudomonas* para la eliminación de compuestos orgánicos tóxicos presentes en el medio ambiente. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- [152] J.H. Miller. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor. New York.
- [153] Miller, H.I., Kirk, M. y Echols, H. 1981. SOS induction and autorregulation of the *himA* gene for site specific recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77:6754–6758.

- [154] Minchin, S.D., Austin, S. y Dixon, R. 1988. The role of activator binding sites in transcriptional control of the divergently transcribed *nifF* and *nifLA* promoters from *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 2:433–442.
- [155] Minchin, S.D., Austin, S. y Dixon, R. 1989. Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae nifLA* promoter by NtrC is face of the helix dependent and the activator stabilizes the interaction of sigma-54-RNA polymerase with the promoter. *EMBO J.*, 8:3491–3499.
- [156] Minnich, S.A. y Newton, A. 1987. Promoter mapping and cell cycle regulation of flagellin gene transcription in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84:1142–1146.
- [157] Minton, N.P. y Clarke, L.E. 1985. Identification of the promoter of the *Pseudomonas* gene coding for carboxypeptidase G2. *J. Mol. Appl. Genet.*, 3:26–35.
- [158] Monod, J., Pappenheimer, A.M. y Cohen-Bazire, G. 1952. La cinétique de la biosintese de la β -galactosidase (lactase) chez *E.coli*. La spécificité de l'induction. *Biochim. Biophys. Acta*, 9:648–652.
- [159] Morett, E. y Buck, M. 1988. NifA-dependent *in vivo* protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:9401–9405.
- [160] Morett, E., Cannon, W. y Buck, M. 1988. The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognises the upstream activator sequences of *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. *Nucl. Acids Res.*, 16:11469–11488.
- [161] Morett, E. y Buck, M. 1989. *In vivo* studies on the interaction of RNA polymerase sigma-54 with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters. The role of NifA in the formation of an open promoter complex. *J. Mol. Biol.*, 210:65–77.

- [162] Morisato, D. y Kleckner, N. 1987. Tn10 transposition and circle formation *in vitro*. *Cell*, 51:101-111.
- [163] Morrison, W.D., Miller, R.V. y Sayler, G.S. 1978. Frequency of F116-mediated transduction of *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:1395-1403.
- [164] R.P. Mortlock. 1982. Metabolic acquisitions through laboratory selection. *Annu. Rev. Microbiol.*, 36:259-284.
- [165] Mullin, D., Minnich, S., Chen, L.S. y Newton, A. 1987. A set of positively regulated flagellar gene promoters in *Caulobacter crescentus* with sequence homology to the *nif* gene promoters of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.*, 195:939-943.
- [166] Mullin, D.A. y Newton, A. 1989. *Ntr*-like promoters and upstream regulatory sequence *ptr* are required for transcription of a developmentally regulated *Caulobacter crescentus* flagellar gene. *J. Bacteriol.*, 171:3218-3227.
- [167] Murooka, Y., Takizawa, N. y Harada, T. 1981. Introduction of bacteriophage Mu into bacteria of various genera and intergeneric gene transfer by RP4-Mu. *J. Bacteriol.*, 145:358-368.
- [168] Nakazawa, T. y Yokota, T. 1973. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: demonstration of two benzoate pathways. *J. Bacteriol.*, 115:262-267.
- [169] Nakazawa, T., Inouye, S. y Nakazawa, A. 1980. Physical and functional mapping of RP4-TOL recombinants: analysis of insertion and deletion mutants. *J. Bacteriol.*, 144:222-231.
- [170] Nees, D.W., Stein, P.A. y Ludwig, R.A. 1988. The *Azorhizobium caulinodans nifA* gene: identification of upstream activator sequences including a new element, the 'anaerobox'. *Nucl. Acids Res.*, 16:9838-9853.

- [171] Newton, A., Ohta, N., Ramakrishnan, G., Mullin, D. y Raymond, G. 1989. Genetic switching in the flagellar gene hierarchy of *Caulobacter* requires negative as well as positive regulation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86:6651–6655.
- [172] Ninfa, A.J. y Magasanik, B. 1986. Covalent modification of the *glnG* product NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:5909–5913.
- [173] Ninfa, A.J., Reitzer, L.J. y Magasanik, B. 1987. Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E.coli* components is facilitated by enhancers. *Cell*, 50:1039–1046.
- [174] Nixon, B.T., Ronson, C.W. y Ausubel, F.M. 1986. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:7850–7854.
- [175] Okita, T., Rodriguez, R. y Preiss, J. 1981. Biosynthesis of bacterial glycogen. *J. Biol. Chem.*, 256:6944–6952.
- [176] Ow, D. y Ausubel, F.M. 1983. Regulation of nitrogen metabolism genes by *nifA* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, 301:307–313.
- [177] N.J. Palleroni. 1986. Taxonomy of the Pseudomonads. En: The Bacteria. A treatise on structure and function. Vol. X: The biology of *Pseudomonas*. J.R. Sokatch (Ed.), Academic Press Inc., pp. 3–26.
- [178] Peacock, S., Weissbach, H. y Nash, H.A. 1984. *In vitro* regulation of phage Lambda cII gene expression by *Escherichia coli* integration host factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:6009–6013.
- [179] Pederosa, F.O. y Yates, M.G. 1984. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. *FEMS Microbiol. Lett.*, 23:95–101.

- [180] Pereira, R.F., Ortuno, M.J. y Lawther, M.P. 1988. Binding of integration host factor (IHF) to the *ilvGp1* promoter of the *ilvGMEDA* operon of *Escherichia coli* K12. *Nucl. Acids Res.*, 16:5973–5989.
- [181] Popham, D., Szeto, D., Keener, J. y Kustu, S. 1989. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science*, 243:629–635.
- [182] Prentki, P. y Krisch, H.M. 1984. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, 29:303–313.
- [183] Ramos, J.L., Stolz, A., Reineke, W. y Timmis, K.N. 1986. Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:8467–8471.
- [184] Ramos, J.L., Mermoud, N. y Timmis, K.N. 1987a. Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding *meta*-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.*, 1:293–300.
- [185] Ramos, J.L., Wasserfallen, A., Rose, K. y Timmis, K.N. 1987b. Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science*, 235:593–596.
- [186] Ramos, J.L. y Timmis, K.N. 1987. Experimental evolution of catabolic pathways of bacteria. *Microbiol. Sci.*, 4:228–237.
- [187] Ramos, J.L., Michán, C., Rojo, F., Dwyer, D. y Timmis, K.N. 1990. Signal-regulator interactions. Genetic analysis of the effector binding site of *xylS*, the benzoate-activated positive regulator of *Pseudomonas* TOL plasmid *meta*-cleavage pathway operon. *J. Mol. Biol.*, 211:373–382.
- [188] Ramos-González, M.I., Duque, E. y Ramos, J.L. 1991. Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:3020–3027.

- [189] Reineke, W. y Knackmuss, H.J. 1979. Construction of haloaromatics utilizing bacteria. *Nature*, 277:385–386.
- [190] Reineke, W., Jeenes, D.J., Williams, P.A. y Knackmuss, H.J. 1982. TOL plasmid pWW0 in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: prevention of *meta* pathway. *J. Bacteriol.*, 150:195–201.
- [191] Reitzer, L.J. y Magasanik, B. 1986. Transcription of *glnA* in *E.coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell*, 45:785–792.
- [192] Reitzer, L.J., Movsas, B. y Magasanik, B. 1989. Activation of *glnA* transcription by nitrogen regulator I (NR1)-phosphate in *Escherichia coli*: evidence for a long range physical interaction between NR1-phosphate and RNA polymerase. *J. Bacteriol.*, 171:5512–5522.
- [193] van Rijn, P.A., Goosen, N. y van de Putte, P. 1988. Integration host factor of *Escherichia coli* regulates early- and repressor transcription of bacteriophage Mu by two different mechanisms. *Nucl. Acids Res.*, 16:4595–4605.
- [194] Rojo, F., Pieper, D.H., Engesser, K.H., Knackmuss, H.J. y Timmis, K.N. 1987. Assemblage of *orto* cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science*, 238:1395–1397.
- [195] Römermann, D., Lohmeyer, M., Friedrich, G. y Friedrich, B. 1988. Pleiotropic mutants from *Alcaligenes eutrophus* defective in the metabolism of hydrogen, nitrate, urea and fumarate. *Arch. Microbiol.*, 149:471–475.
- [196] Römermann, D., Warrelman, J., Bender, A. y Friedrich, B. 1989. An *rpoN*-like gene of *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas facilis* controls expression of diverse metabolic pathways. *J. Bacteriol.*, 171:1093–1099.
- [197] Ronson, C.W., Nixon, B.T., Albright, L.M. y Ausubel, F.M. 1987a. *Rhizobium meliloti ntrA (rpoN)* gene is required for diverse metabolic functions. *J. Bacteriol.*, 169:2424–2430.

- [198] Ronson, C.W., Nixon, B.T. y Ausubel, F.M. 1987b. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell*, 49:579–581.
- [199] Ronson, C.W., Astwood, P.M., Nixon, B.T. y Ausubel, F.M. 1987c. Deduced products of C4-dicarboxylate transport regulatory genes of *Rhizobium leguminosarum* are homologous to nitrogen regulatory gene products. *Nucl. Acids Res.*, 15:7921–7934.
- [200] Rouvière-Yaniv, J., Bonnefoy, E., Huisman, O. y Almeida, A. 1990. The bacterial chromosome. American Society of Microbiology.
- [201] Sala-Trepat, J.M. y Evans, W.C. 1971. The *meta* cleavage of catechol by *Azotobacter* species: 4-oxocrotonate pathway. *Eur. J. Biochem.*, 20:400–413.
- [202] Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74:5463–5467.
- [203] Santero, E., Luque, F., Medina, J.R. y Tortolero, M. 1986. Isolation of *ntr*-like mutants of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 166:541–544.
- [204] Santero, E., Hoover, T., Keener, J. y Kustu, S. 1989. *In vitro* activity of the nitrogen fixation regulatory protein *ntrA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86:7346–7350.
- [205] Sasse-Dwight, S y Gralla, J.D. 1988. Probing the *Escherichia coli* *glnALG* upstream activation mechanism *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:8934–8938.
- [206] Sasse-Dwight, S. y Gralla, J.D. 1990. Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor σ^{54} . *Cell*, 62:945–954.
- [207] R.F. Schleif. 1989. The L-arabinose operon. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. F.C. Neidhart (Ed.), AMS, Washington D.C., pp. 1473–1481.

- [208] Schmidt, S.K., Scow, K.M. y Alexander, M. 1987. Kinetics of *p*-nitrophenol mineralization by a *Pseudomonas* sp.: effects of second substrates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:2617–2623.
- [209] Schmitz, G., Nikaido, K. y Ames, F.L. 1988. Regulation of a transport operon promoter in *Salmonella typhimurium*: Identification of sites essential for nitrogen regulation. *Mol. Gen. Genet.*, 215:107–117.
- [210] Schwien, U. y Schmidt, E. 1982. Improved degradation of monochlorophenols by a constructed strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:33–39.
- [211] Serrano, M., Salas, M. y Hermoso, J.M. 1990. A novel nucleoprotein complex at a replication origin. *Science*, 248:1012–1016.
- [212] Shaw, J.P. y Harayama, S. 1990. Purification and characterization of TOL plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Eur. J. Biochem.*, 191:705–714.
- [213] Snyder, U.K., Thompson, J.F. y Landy, A. 1989. Phasing of protein induced DNA bends in a recombination complex. *Nature*, 341:255–257.
- [214] Spooner, R.A., Lindsay, K. y Franklin, F.C.H. 1986. Genetic, functional and sequence analysis of the *xyIR* and *xyIS* regulatory genes of the TOL plasmid pWW0. *J. Gen. Microbiol.*, 132:1347–1358.
- [215] Spooner, R.A., Bagdasarian, M. y Franklin, F.C.H. 1987. Activation of the *xyIDLEGF* promoter of the TOL toluene-xylene degradation pathway by overproduction of the *xyIS* regulatory gene product. *J. Bacteriol.*, 169:3581–3586.
- [216] Stenzel, T.T., Patel, P. y Bastia, D. 1987. The integration host factor of *E.coli* binds to bent DNA at the origin of replication of the plasmid pSC101. *Cell*, 49:709–717.
- [217] Su, W., Porter, S., Kustu, S. y Echols, H. 1990. DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA

- polymerase at the bacterial *glnA* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87:5504–5508.
- [218] Szeto, W.W., Nixon, B.T., Ronson, C.W. y Ausubel, F.M. 1987. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *J. Bacteriol.*, 169:1423–1432.
- [219] Thomas, C.R. y Helinski, D.R. 1989. Vegetative replication and stable inheritance of IncP plasmids. En: Promiscuous plasmids of gram-negative bacteria. C.M. Thomas (Ed.), Academic Press Inc., pp. 1–26.
- [220] Thompson, R.J. y Mosig, G. 1988. Integration host factor (IHF) represses a *Chlamydomonas* chloroplast promoter in *E. coli*. *Nucl. Acids Res.*, 16:3313–3326.
- [221] Thöny, B. y Hennecke, H. 1989. The -12/-24 promoter comes of age. *FEMS Microbiol. Rev.*, 63:341–358.
- [222] Toukdarian, A. y Kennedy, C. 1986. Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntr* and *glnA* genes and construction of *ntr* mutants. *EMBO J.*, 5:399–407.
- [223] Trevors, J.T. y Oddie, K.M. 1986. R-plasmid transfer in soil and water. *Can. J. Microbiol.*, 32:1610–1613.
- [224] P.O.P. Ts'O. 1974. Basic principles in nucleic acid chemistry. Academic Press Inc.
- [225] Tsuda, M., Mianegishi, K.I. e Ino, T. 1989. Toluene transposons Tn4651 and Tn4653 are class II transposons. *J. Bacteriol.*, 171:1386–1393.
- [226] Valentine, C.R.I. y Kado, C.I. 1989. Molecular genetics of IncW plasmids. En: Promiscuous plasmids of gram-negative bacteria. C.M. Thomas (Ed.), Academic Press Inc., pp. 125–164.

- [227] Vieira, J. y Messing, J. 1982. The pUC plasmid: an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19:259–268.
- [228] Vinson, C.R., Sigler, P.B. y McNight, S.L. 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*, 246:911–916.
- [229] A. Wasserfallen. 1989. Etude biochimique et génétique de la spécificité de la catéchol 2,3-dioxygenase chez *Pseudomonas putida*. Tesis Doctoral, Universidad de Ginebra (Suiza).
- [230] Wei, G.R. y Kustu, S. 1981. Glutamine auxotrophs with mutations in a nitrogen regulatory gene, *ntrC*, that is near *glnA*. *Mol. Gen. Genet.*, 183:757–764.
- [231] Weightman, A.J., Don, R.H., Lehrbach, P.R. y Timmis, K.N. 1984. The identification and cloning of genes encoding haloaromatic catabolic enzymes and the construction of hybrid pathways for substrate mineralization. En: Genetic control of environmental pollutants. G.S. Ommen y A. Hollaender (Ed.), Plenum, New York., pp. 47–80.
- [232] Weinberg, S.R. y Stotzky, G. 1972. Conjugation and genetic recombination of *Escherichia coli* in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 4:171–180.
- [233] Wigmore, G.J. y Ribbons, D.W. 1980. p-cymene pathway in *Pseudomonas putida*: selective enrichment of defective mutants by using halogenated substrate analog. *J. Bacteriol.*, 143:816–824.
- [234] Williams, P.A. y Murray, K. 1974. Metabolism of benzoate and methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of TOL plasmid. *J. Bacteriol.*, 120:416–423.
- [235] Wong, P.K., Popham, D., Keener, J. y Kustu, S. 1987. *In vitro* transcription of the nitrogen fixation regulatory operon *nifLA* of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 169:2876–2880.

- [236] Worsey, M.J. y Williams, P.A. 1975. Metabolism of toluene and the xilenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.*, 124:7-13.
- [237] Worsey, M.J., Franklin, F.C.H. y Williams, P.A. 1978. Regulation of the degradative pathway enzymes encoded by the TOL plasmid (pWW0) from *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.*, 134:757-764.
- [238] Wu, H.M. y Crothers, D.M. 1984. The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature*, 308:509-513.
- [239] M.G. Wubbolts. 1987. The TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. Establishing the role of the *xylM* and *xylA* genes in the formation of the xylene oxidase enzyme. Tesis Doctoral, Universidad de Groningen (Holanda).
- [240] Yang, C.C. y Nash, H.A. 1989. The interaction of *E.coli* IHF protein with its specific binding sites. *Cell*, 57:869-880.
- [241] Yen, K.M. y Gunsalus, I.C. 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79:874-878.
- [242] Zoller, M.J. y Smith, M. 1983. Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Meth. Enzymol.*, 100:468-500.