

~~T. Incon 98/99~~

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN *oprL* DE
Pseudomonas putida

TESIS DOCTORAL

JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ HERVA

1999

José Juan Rodríguez Herva

98/99

UNIVERSIDAD DE GRANADA
COMISION DE DOCTORADO
15 JUN. 1999

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 25/6/99
ENTRADA NUM. 2130

4/67

Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE GRANADA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	613384454
Nº Copia	15496991

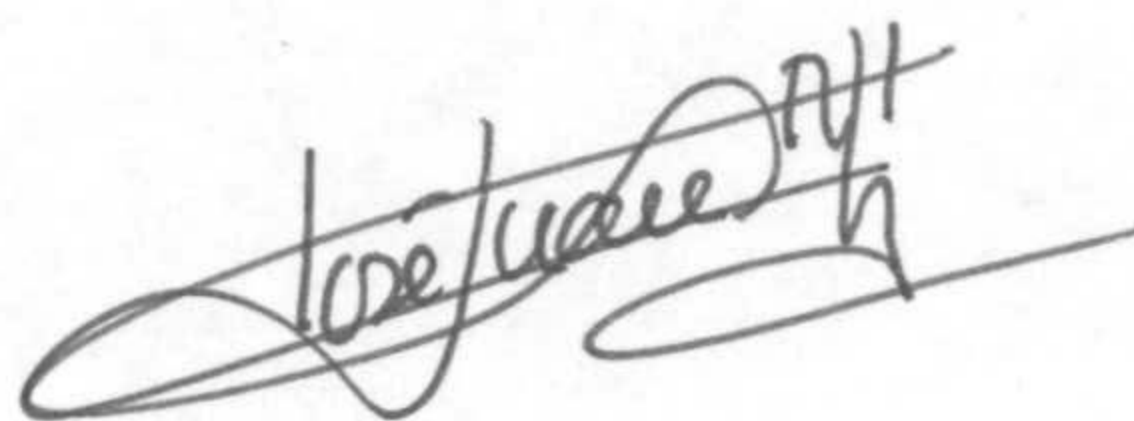
**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN *oprL*
DE *Pseudomonas putida***

José Juan Rodríguez Herva

1999

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN *oprL*
DE *Pseudomonas putida*

Memoria que presenta el licenciado en
Biología, José Juan Rodríguez Herva,
para aspirar al Título de Doctor



Fdo.: José Juan Rodríguez Herva

V° B°

El director



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

Universidad de Granada

1999

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

INDICE

INTRODUCCIÓN

1. LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

1.1. Estructura y composición de la membrana externa

1.1.1. Fosfolípidos

1.1.2. Lipopolisacárido (LPS)

1.1.3. Proteínas

(i) Porinas de difusión general o canales no específicos

(ii) Canales de difusión específicos

(iii) Receptores de alta afinidad

(iv) Lipoproteínas

(v) Otras proteínas destacadas

1.2. Funciones de la membrana externa

1.2.1. La membrana externa como barrera de exclusión y de permeabilidad selectiva

1.3. Ensamblaje de los componentes de la membrana externa

1.3.1. Fosfolípidos

1.3.2. LPS

1.3.3. Proteínas

2. EL SISTEMA Tol-PAL

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS Y SU CONSERVACIÓN

2. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Medios de cultivo

2.2. Condiciones de cultivo

2.3. Antibióticos

3. PLÁSMIDOS

4. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

5. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL

6. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS POR CONJUGACIÓN

7. TÉCNICAS COMUNES DE MANIPULACIÓN DE ADN

- 7.1. Electroforesis de ADN
- 7.2. Recuperación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa
- 7.3. Transformación de células de *E. coli*
- 7.4. Secuenciación de ADN
- 7.5. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente ("PCR")
- 7.6. Transferencia de ADN a membrana e hibridación ("Southern blotting")
- 7.7. Otras técnicas de manipulación de ADN

8. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

- 8.1. Microscopía de células vivas
- 8.2. Microscopía electrónica de transmisión
- 8.3. Microscopía electrónica de barrido

9. TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN *IN VITRO*

10. MUTAGÉNESIS

- 10.1. Mutagénesis por transposición
- 10.2. Mutagénesis dirigida *in vitro*

11. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES POR INTERCAMBIO ALÉLICO

12. ENSAYOS DE MOVILIDAD BACTERIANA

13. ENSAYOS DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD

- 13.1. Ensayos de resistencia/sensibilidad a antibióticos
- 13.2. Ensayos de tolerancia/sensibilidad a colicinas con cepas de *E. coli*
- 13.3. Ensayos de resistencia/sensibilidad a otros compuestos

14. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA E INMUNODETECCIÓN ("WESTERN BLOTTING")

- 14.1. Preparación de lisado celular total
- 14.2. Separación de proteínas por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (EGPA-SDS)
- 14.3. Transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección

15. ENSAYOS DE TRATAMIENTO CON GLOBOMICINA

16. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL PEPTIDOGLICANO

17. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PERIPLÁSMICAS EN EL MEDIO EXTRACELULAR
18. ANÁLISIS DE LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)
 - 18.1. Preparación de LPS y electroforesis
 - 18.2. Tinción de plata específica para LPS
19. TÉCNICA ELISA ("ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY")
20. ENSAYOS DE INCORPORACIÓN DE 1,2,4-[¹⁴C]TRICLORO-BENCENO
21. EXPERIMENTOS EN MICROCOSMOS EDÁFICOS
22. ENSAYOS DE ADHESIÓN A SEMILLA
23. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

RESULTADOS

Capítulo I: ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE UN MUTANTE DE *Pseudomonas putida* ALTERADO EN UNA PROTEÍNA DE MEMBRANA

RESUMEN

1. CARACTERIZACIÓN DE *P. putida* 14G3
 - 1.1. Crecimiento en medio rico con distintas concentraciones de NaCl
 - 1.2. Ensayos de resistencia/sensibilidad a diferentes compuestos
 - 1.3. Observación de *P. putida* 14G3 al microscopio óptico y al electrónico
2. CLONACIÓN DEL GEN DE *P. putida* 14G3 INTERRUMPIDO POR EL MINITRANSPOSÓN, Y RECUPERACIÓN DEL GEN SILVESTRE
3. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN DE *P. putida* 14G3 POR EL CÓSMIDO QUE PORTA EL GEN SILVESTRE
4. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL FRAGMENTO CLONADO
5. COMPARACIÓN DE Orf1 y Orf2 CON LAS SECUENCIAS DISPONIBLES EN LAS BASES DE DATOS
 - 5.1. Comparación de Orf1 con secuencias de las distintas bases de datos
 - 5.2. Comparación de Orf2 con secuencias de las bases de datos
6. CONSERVACIÓN DEL GEN *orf1* ENTRE DISTINTOS MIEMBROS DE LA FAMILIA *Pseudomonadaceae*

Capítulo II: CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE DE *Pseudomonas putida* QUE NO EXPRESA LA PROTEÍNA OprL

RESUMEN

1. CONSTRUCCIÓN DE UN MUTANTE *oprL* NULO DE LA CEPA *P. putida* KT2440
2. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL PEPTIDOGLICANO
3. TRATAMIENTO DE *P. putida* KT2440 CON GLOBOMICINA
4. ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL MUTANTE *oprL* NULO *P. putida* PX
 - 4.1. Crecimiento en medio rico con distintas concentraciones de NaCl
 - 4.2. Ensayos de resistencia/sensibilidad a diversos compuestos
 - 4.3. Observación de *P. putida* PX al microscopio óptico y al electrónico
 - 4.4. Liberación de enzimas periplásmicos al medio extracelular
5. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DEL MUTANTE *P. putida* PX CON EL GEN *oprL* SILVESTRE
6. CONSTRUCCIÓN Y ESTUDIO DE LA TOLERANCIA A TOLUENO DE UN MUTANTE *oprL* DE LA CEPA *P. putida* DOT-T1
 - 6.1. Construcción de un mutante *oprL* nulo de la cepa *P. putida* DOT-T1
 - 6.2. Observación de *P. putida* T1PX al microscopio óptico
 - 6.3. Comportamiento de *P. putida* T1PX frente al tolueno

Capítulo III: CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LAS REGIONES DE ADN QUE FLANQUEAN A LOS GENES *oprL*, *orf2*

RESUMEN

1. CLONACIÓN Y ANÁLISIS DE LA REGIÓN DE ADN EN 5' CON RESPECTO AL GEN *oprL*
 - 1.1. Clonación de la región en 5' con respecto al gen *oprL*
 - 1.2. Análisis de la secuencia de ADN corriente arriba de *oprL* y comparación con las secuencias existentes en las distintas bases de datos
2. CLONACIÓN Y ANÁLISIS DE LA REGIÓN DE ADN CORRIENTE ABAJO DEL GEN *orf2*
3. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN CON MUTANTES *tol* DE *E. coli*
 - 3.1. Reconstrucción de los genes del sistema *tol-oprL* de *P. putida* en un mismo plásmido
 - 3.2. Ensayos de complementación

Capítulo IV: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE *wzy* DE *P. putida*. CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA MUTANTE DOBLE *wzy oprL* Y ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA EN SUELO DE LOS MUTANTES

RESUMEN

1. AISLAMIENTO DE UN MUTANTE LPS Y CONSTRUCCIÓN UN MUTANTE *oprL* ISOGÉNICO DE ÉSTE
 - 1.1. Aislamiento de un mutante de *P. putida* KT2442 afectado en el LPS
 - 1.2. Construcción de un mutante *oprL* de *P. putida* DOT-OX3
2. CLONACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL GEN MUTADO EN LA CEPA *P. putida* DOT-OX3
3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES *P. putida* DOT-OX3 y *P. putida* DOT-OX5
 - 3.1. Caracterización fisiológica
 - 3.2. Observación de la cepa silvestre y de las cepas mutantes DOT-OX3 y DOT-OX5 al microscopio electrónico de transmisión
4. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DEL MUTANTE *P. putida* DOT-OX3 CON EL GEN *wzy* SILVESTRE
5. SUPERVIVENCIA DE LAS DISTINTAS CEPAS MUTANTES EN SUELOS AGRÍCOLAS
6. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA SUPERVIVENCIA EN SUELO DE LAS DISTINTAS CEPAS MUTANTES
7. ENSAYOS DE ADHESIÓN A SEMILLAS DE MAÍZ

DISCUSIÓN

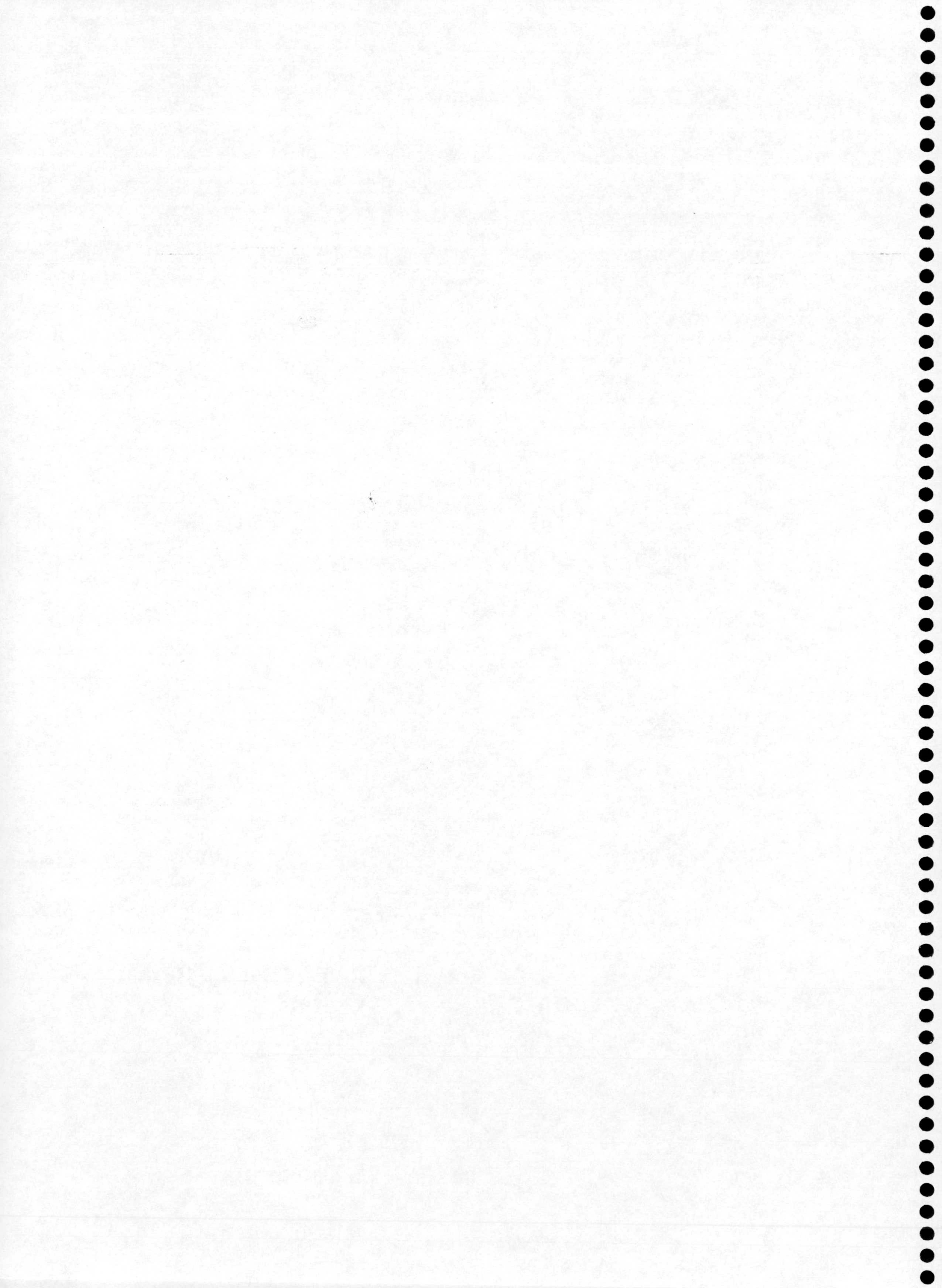
- I. EL GEN MUTADO EN LA CEPA 14G3 CODIFICA LA LIPOPROTEÍNA ASOCIADA AL PEPTIDOGLICANO (*OprL*) DE *P. putida*
- II. EL GEN *oprL* DE *P. putida* SE ENCUENTRA FORMANDO PARTE DE LA DENOMINADA AGRUPACIÓN DE GENES DEL "SISTEMA *tol-oprL*"
- III. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES *tol* DE *E. coli* CON LOS GENES *tol* DE *P. putida*
- IV. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS DISTINTOS SISTEMAS *tol* EXISTENTES
- V. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES *oprL* DE *P. putida*
- VI. POSIBLES FUNCIONES DEL SISTEMA Tol-PAL
- VII. LA CEPA *P. putida* DOT-OX3 ESTÁ MUTADA EN EL GEN *wzy*, QUE CODIFICA LA POLIMERASA DEL ANTÍGENO O
- VIII. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES *wzy* y *wzy oprL* DE *P. putida*

IX. SUPERVIVENCIA EN SUELO Y ADHESIÓN A SEMILLAS DE MAÍZ DE LOS
MUTANTES *wzy*, *oprL* y *wzy oprL* DE *P. putida*

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

La envoltura celular que rodea al citoplasma de las células bacterianas está formada por la membrana interna o citoplásmica y por la pared celular. Las bacterias gram positivas y gram negativas difieren considerablemente en la estructura y composición de dicha pared. Así, en las bacterias gram negativas la pared celular se compone de una membrana externa que rodea a una monocapa de peptidoglicano (Fig. 1). De esta forma, la membrana externa de las bacterias gram negativas constituye la interfase entre el medio ambiente y el interior celular, y como tal, juega un papel crucial al determinar que sustancias penetran en la célula y cuales se exportan al exterior celular, además de ser la superficie a través de la cual se produce la interacción con las moléculas, superficies u otras células del medio circundante, por ejemplo durante los procesos de simbiosis o patogénesis (Nikaido, 1999). En las tres últimas décadas la membrana externa bacteriana se ha estudiado con bastante profundidad, y en consecuencia, su visión ha variado considerablemente desde el primitivo modelo de cubierta tipo cápsula, hasta su imagen actual de membrana dinámica y multifuncional implicada en muchos procesos celulares importantes. *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sv. typhimurium y *Pseudomonas aeruginosa* constituyen tres de las especies bacterianas más estudiadas a nivel de membrana externa.

1. LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

1.1. Estructura y composición de la membrana externa

La membrana externa posee dos tipos de lípidos (fosfolípidos y lipopolisacárido), así como diversas proteínas características.

1.1.1. Fosfolípidos

Los fosfolípidos de la membrana externa se localizan únicamente en su monocapa interna y son similares a los de la membrana interna, con un ligero predominio de fosfatidiletanolamina.

1.1.2. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es un glicolípido anfipático, componente esencial de las bacterias gram negativas, que se localiza exclusivamente en la monocapa externa de la membrana externa. El LPS consta de una región hidrofóbica de anclaje a la membrana, el lípido A, altamente conservada (incluso a nivel de género); de una región central conservada a nivel de

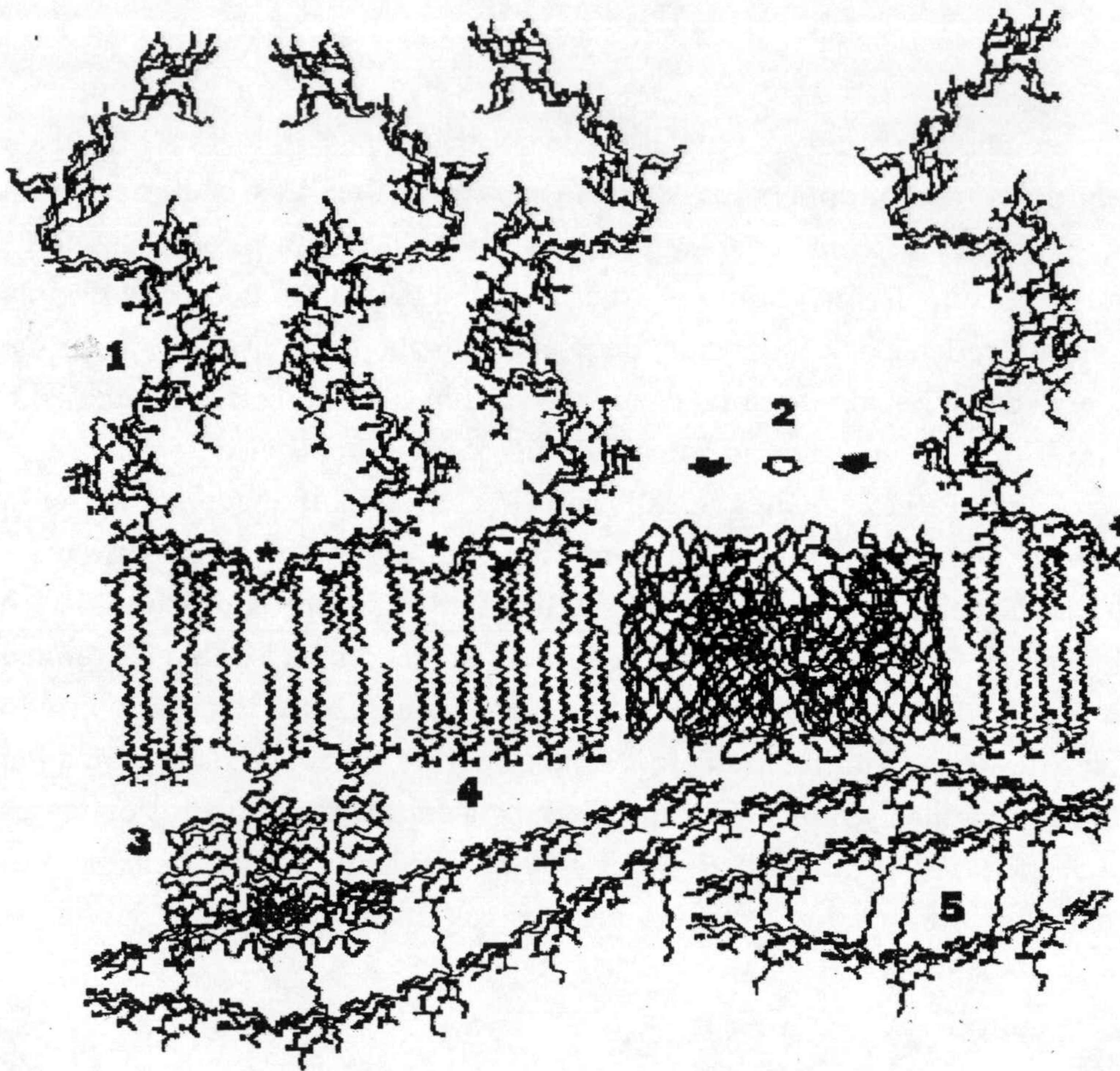
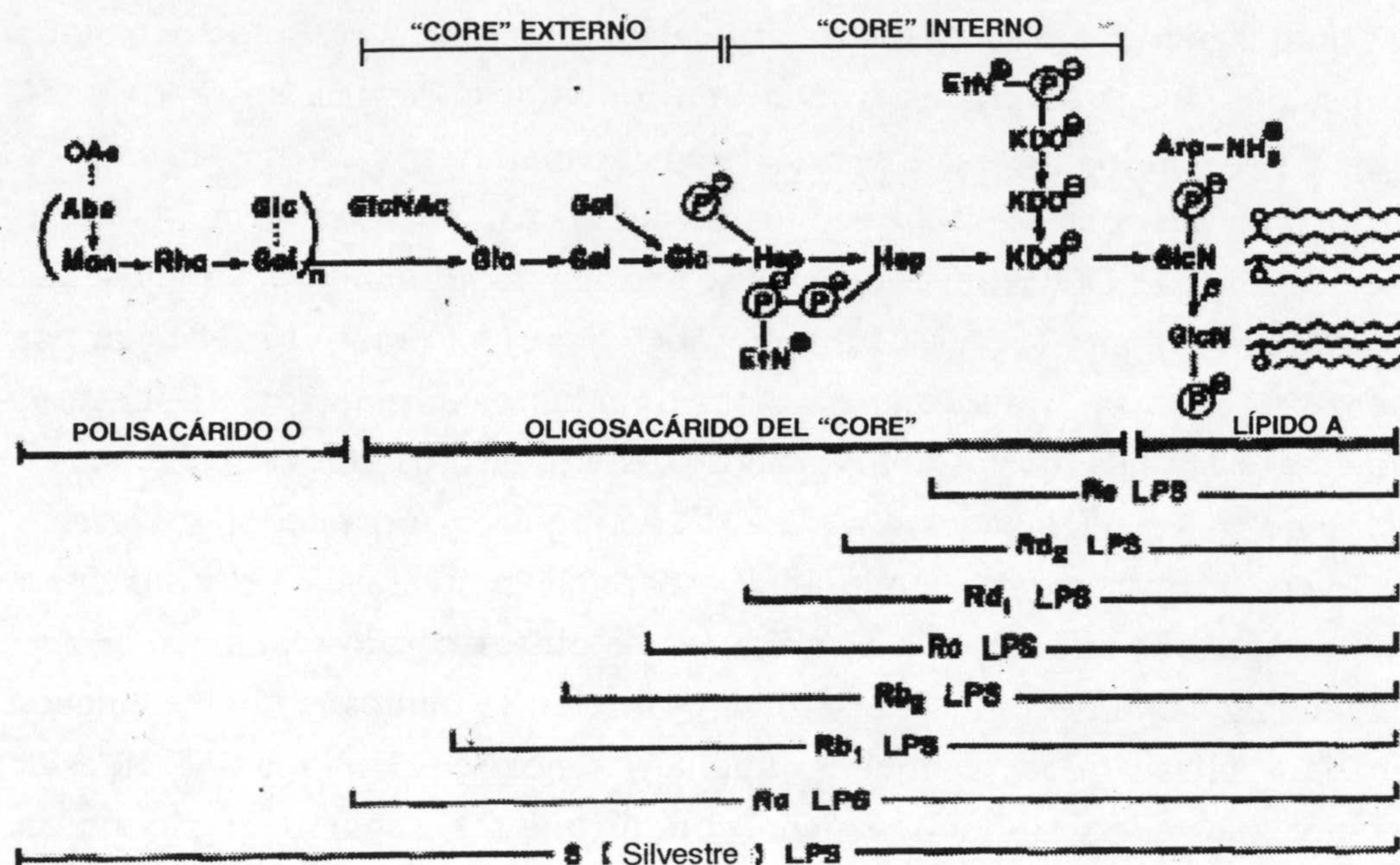


FIGURA 1. Membrana externa. Vista lateral de un modelo químico de una sección de la membrana externa de *E. coli*. Se indican las moléculas de LPS (1), un trímero de la porina OmpF (2), varias moléculas de lipoproteína (3), los fosfolípidos (4), el peptidoglicano (5) y los sitios de unión para cationes divalentes propuestos como estabilizadores de la membrana (*). Para simplificar, el antígeno O del LPS se muestra con sólo dos unidades de oligosacárido (aunque puede contener más de 40 unidades). En el esquema de la sección del trímero de OmpF se indica la posición de los canales hidrofílicos, dos de ellos en el frente (flechas negras) y un tercero en la parte posterior (flecha blanca). El extremo C-terminal de las lipoproteínas está unido (covalente o no covalentemente) a la capa de peptidoglicano. Para mayor claridad, en el caso de OmpF, de las lipoproteínas y de las cadenas peptídicas del peptidoglicano, sólo se indica el esqueleto principal de los aminoácidos (Obtenido de Hancock *et al.*, 1994).

especie, el denominado oligosacárido del "core", que se divide a su vez en dos partes, el "core" interno (que se une al lípido A) y el "core" externo; y de una región hidrofílica altamente variable de naturaleza polisacáridica, denominada antígeno O, cadena lateral O, o polisacárido O (Fig. 2). Ésta última es la fracción inmunodominante de la molécula y, en base a la misma, una especie bacteriana dada se puede clasificar en distintos serotipos

A: *S. enterica* sv. typhimurium LT2



B: *E. coli* K-12



C: *E. coli* B



FIGURA 2. Estructura de una molécula de LPS. (A) LPS de *S. enterica* sv. typhimurium LT2. Ra, Rb₁, etc. representan los distintos tipos químicos de los LPS mutantes producidos. (B) LPS de *E. coli* K-12. Las cepas de laboratorio derivadas de *E. coli* K-12 carecen del antígeno O, debido a una mutación por inserción en el último gen del operón *rfb*, que codifica una ramnosiltransferasa (Stevenson *et al.*, 1994). (C) LPS de *E. coli* B. Esta cepa y sus derivadas tampoco poseen antígeno O y carecen además de parte del "core". En B y C, las regiones representadas por los rectángulos rallados poseen una estructura prácticamente idéntica a la región correspondiente del LPS de *S. enterica* sv. typhimurium (si bien existen pequeñas diferencias). Abreviaturas: Abe, abeciosa; Man, D-manosa; Rha, L-ramnosa; Gal, D-galactosa; OAc, O-acetilo; GlcNAc, N-acetil-D-glucosamina; Hep, L-glicero-D-mano-heptosa; KDO, ácido 2-ceto-3-desoxioctónico; EtN, etanolamina; P, fosfato; GlcN, D-glucosamina; Ara-NH₃⁺, 4 aminoarabinosa. Todos los residuos de heptosa y hexosa de la región del "core" están unidos a través de enlaces α , a menos que se indique de otro modo. Las líneas onduladas representan los residuos de ácidos grasos. (Obtenido de Nikaido, 1996a).

(por ej., en *Salmonella enterica* existen más de 600 serotipos agrupados de acuerdo a las reacciones serológicas cruzadas) o en tipos químicos (según su composición de azúcares). Por su parte, la región correspondiente al lípido A posee propiedades de endotoxina (siendo la responsable del choque séptico en el hombre y otros animales).

En enterobacterias, el lípido A está constituido por un esqueleto de dos glucosaminas unidas por un enlace $\beta(1\rightarrow6)$, al cual se unen 6 ó 7 residuos de ácidos grasos poco usuales, todos saturados, y con una longitud que varía entre 10 y 21 carbonos (Fig. 2) (Nikaido, 1996a; Reeves, 1994; Schnaitman y Klena, 1993). La región del "core" interno contiene 2-3 residuos de una octosa poco frecuente, el ácido 2-ceto-3-desoxioctónico (KDO) a través del cual se une al lípido A, unidos a su vez a dos residuos de L-glicero-D-mano-heptosa. La región del "core" externo está formada por hexosas (por ej., glucosa, ramnosa, galactosa, galactosamina, son típicas en enterobacteriáceas) sustituidas con distintos grupos (fosfato, pirofosfato, etc.) y unidas a la heptosa del "core" interno (Hancock *et al.*, 1994). La región externa del oligosacárido del "core" varía considerablemente entre especies sobretodo a nivel de los sustituyentes. Por último, el antígeno O se compone de unidades de oligosacárido repetidas. Dichas unidades contienen generalmente de 3 a 5 azúcares diferentes unidos mediante enlaces específicos (heteropolisacáridos), aunque las unidades repetitivas también pueden estar constituidas por un único tipo de azúcar con diferentes secuencias de unión (homopolisacáridos). En este sentido, una de las diferencias más destacadas que existe entre el polisacárido O de las pseudomonadáceas y el de las bacterias entéricas es el elevado contenido en aminoazúcares del primero. Por otro lado, el peso molecular de cada molécula individual de LPS puede variar entre 8 y más de 54 kDa dependiendo de si posee o no antígeno O, y en este último caso según el número de unidades de oligosacárido repetidas por las que esté compuesto. También existen especies bacterianas (como *Neisseria* sp., *Haemophilus influenzae* o *Bordetella pertussis*) que no producen polisacáridos O largos, poseyendo en su lugar una corta región de oligosacárido (de unos 10 monosacáridos) unida al lípido A. Dichas moléculas se denominan lipooligosacáridos (LOS). Incluso en una misma célula bacteriana, las moléculas de LPS muestran una gran heterogeneidad: la mayoría carecen de la cadena lateral O, denominándose R-LPS (del inglés *rough* LPS), estando el resto sustituidas por un número variable de unidades de oligosacárido, responsables del típico patrón de bandas escalonado que se observa al separar una preparación de LPS mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Se sabe por ejemplo, que en una célula dada de *P. aeruginosa*, las moléculas de LPS que poseen antígeno O, denominadas S-LPS (del inglés *smooth* LPS), constituyen menos del 10% del LPS total, pero aún así son suficientes para crear una cubierta de polisacárido que se extiende a más de 40 nm de la superficie celular. Además, una misma especie puede poseer más de un tipo de LPS, como ocurre en el caso de *Klebsiella*, *P. aeruginosa* y *Bordetella pertussis*. *P. aeruginosa*, por ejemplo, expresa simultáneamente dos formas distintas de LPS: un homopolímero neutro conservado antigénicamente, conocido como banda A, cuyo polisacárido O está formado por repeticiones de un trisacárido compuesto por unidades de D-ramnosa unidas por enlaces $\alpha 1\rightarrow 2$, $\alpha 1\rightarrow 3$ y $\alpha 1\rightarrow 3$, y un

heteropolímero conocido como banda B en base al cual *P. aeruginosa* se clasifica en 20 serotipos diferentes.

Entre sus diversas funciones las moléculas de LPS estabilizan, anclan y/o orientan las proteínas de la membrana externa.

1.1.3. Proteínas

La membrana externa contiene un número limitado (generalmente de 3 a 8) proteínas mayoritarias, presentes en cantidades muy elevadas (de 50.000 a 200.000 copias por célula) lo que las sitúa entre las proteínas más abundantes de la célula. Además de éstas proteínas principales, también existen un gran número de proteínas minoritarias (entre 50 y 100). A continuación se describen los principales grupos de proteínas de la membrana externa:

(i) Porinas de difusión general o canales no específicos: son proteínas que forman canales inespecíficos llenos de agua (aunque algunas son ligeramente selectivas a iones), que permiten la penetración pasiva a través de la membrana externa de moléculas hidrofílicas menores de un cierto tamaño. El límite de exclusión de estas proteínas viene determinado por el tamaño mínimo del poro que forman. Además, el tamaño de los solutos que penetran por estos poros, aún estando por debajo de dicho límite, también ejerce gran influencia sobre su tasa de difusión a través de los mismos (por ejemplo, la velocidad de difusión de una pentosa de 150 Da a través de OmpF de *E. coli* es unas 100 veces superior a la de un disacárido de 342 Da). Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las denominadas porinas triméricas "clásicas" (como OmpF, OmpC o PhoE de *E. coli* y *S. enterica* sv. typhimurium) y las porinas monoméricas, que confieren menor permeabilidad que las primeras (como OmpA de *E. coli* u OprF de *P. aeruginosa*) y que se tratarán en otro apartado de esta *Introducción*. Convendría destacar que se ha propuesto la nomenclatura "Opr" (del inglés *outer membrane protein*) para designar a las proteínas de la membrana externa de *Pseudomonas*, para evitar así posibles confusiones con las de *E. coli*, designadas "Omp" (del inglés *outer membrane protein*) (Hancock *et al.*, 1990). El peso molecular de la forma monomérica de este tipo de proteínas oscila generalmente entre 28 y 48 kDa. Las porinas no son proteínas hidrofóbicas en lo que a composición de aminoácidos se refiere y no poseen los largos segmentos de aminoácidos hidrofóbicos característicos de las proteínas integrales de la membrana interna. Además, para disociar por completo los trímeros de proteína en sus subunidades monoméricas correspondientes y lograr su desnaturalización, es preciso calentarlas en presencia de SDS a temperaturas superiores a los 70°C. Estas propiedades se explicaron cuando se determinó la

estructura tridimensional por cristalografía de rayos X de algunas de estas proteínas, como la porina trimérica de *Rhodobacter capsulatus* (Weiss y Schulz, 1992), OmpF y PhoE de *E. coli* (Cowan *et al.*, 1992) o una porina de *Rhodopseudomonas blastica* (Kreusch *et al.*, 1994). Aunque las porinas de *E. coli* y *R. capsulatus* se pliegan formando estructuras muy similares, presentan poca similitud a nivel de estructura primaria. Se ha determinado que cada subunidad de OmpF atraviesa la membrana 16 veces a través de cadenas β antiparalelas que forman la denominada estructura en barril β , en cuyo interior se sitúa el canal hidrofílico (Fig. 3A). Estas cadenas β poseen carácter anfipático, con residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en posiciones alternadas, de manera que los primeros se sitúan en contacto con el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica y los segundos entran a formar parte del canal hidrofílico. El trímero, por tanto, está formado por tres canales (Fig. 3B). Los segmentos en forma de lazo que conectan los distintos segmentos β transmembrana son bastante cortos (de 1 a 4 aminoácidos) en el lado periplásmico de la proteína y considerablemente mayores en la cara externa. Estos últimos, aunque muestran mucha variabilidad a nivel de secuencia, suelen ser ricos en aminoácidos con carga negativa que se supuestamente interaccionan con los grupos cargados negativamente de los LPS, a través de puentes de cationes divalentes. El tercer "lazo" externo (L3) de estas proteínas posee una especial relevancia ya que se pliega hacia el interior del canal, dentro del barril β , produciendo un poro cuyas entrada y salida son "amplias" pero que posee un estrechamiento central responsable último del límite de exclusión de cada canal (Fig. 3). Este diseño es muy efectivo para la exclusión de solutos de gran tamaño, a la vez que minimiza posibles fricciones entre los solutos y las paredes del poro, lo que implica que las moléculas pequeñas puedan atravesar la membrana a velocidades cercanas a la máxima. Además, la zona del estrechamiento del canal contiene en una de sus caras una serie de residuos cargados positivamente y en la cara opuesta varios residuos con carga negativa. Esta disposición de cargas provocaría un estiramiento de las cadenas laterales de dichos aminoácidos que tendría como consecuencia la formación de una estructura rígida bien definida, necesaria para la exclusión eficiente de solutos grandes. Además, el elevado campo eléctrico así formado, explicaría la capacidad de las porinas para excluir solutos hidrofóbicos. La entrada de los mismos estaría energéticamente desfavorecida, debido probablemente a que para tal fin, éstos tendrían que desplazar a las moléculas de agua que estarían situadas siguiendo un supuesto ordenamiento dipolar (Schulz, 1993). Por otra parte, la porina PhoE de *E. coli*, que se sintetiza en respuesta a condiciones de hambre de fosfato, muestra cierta preferencia por los aniones, en contraste con la preferencia por los cationes de las porinas OmpF y OmpC. Mediante mutagénesis dirigida se determinó que la

lisina 125 de PhoE, que reemplaza a la glicina 131 de OmpF, era el residuo responsable de dicha preferencia de cargas (Bauer *et al.*, 1989). Posteriormente, al resolverse la estructura tridimensional de ambas porinas se obtendría la explicación para esta propiedad, al localizarse los residuos mencionados en la región donde se estrechaba el poro (Cowan *et al.*, 1992).

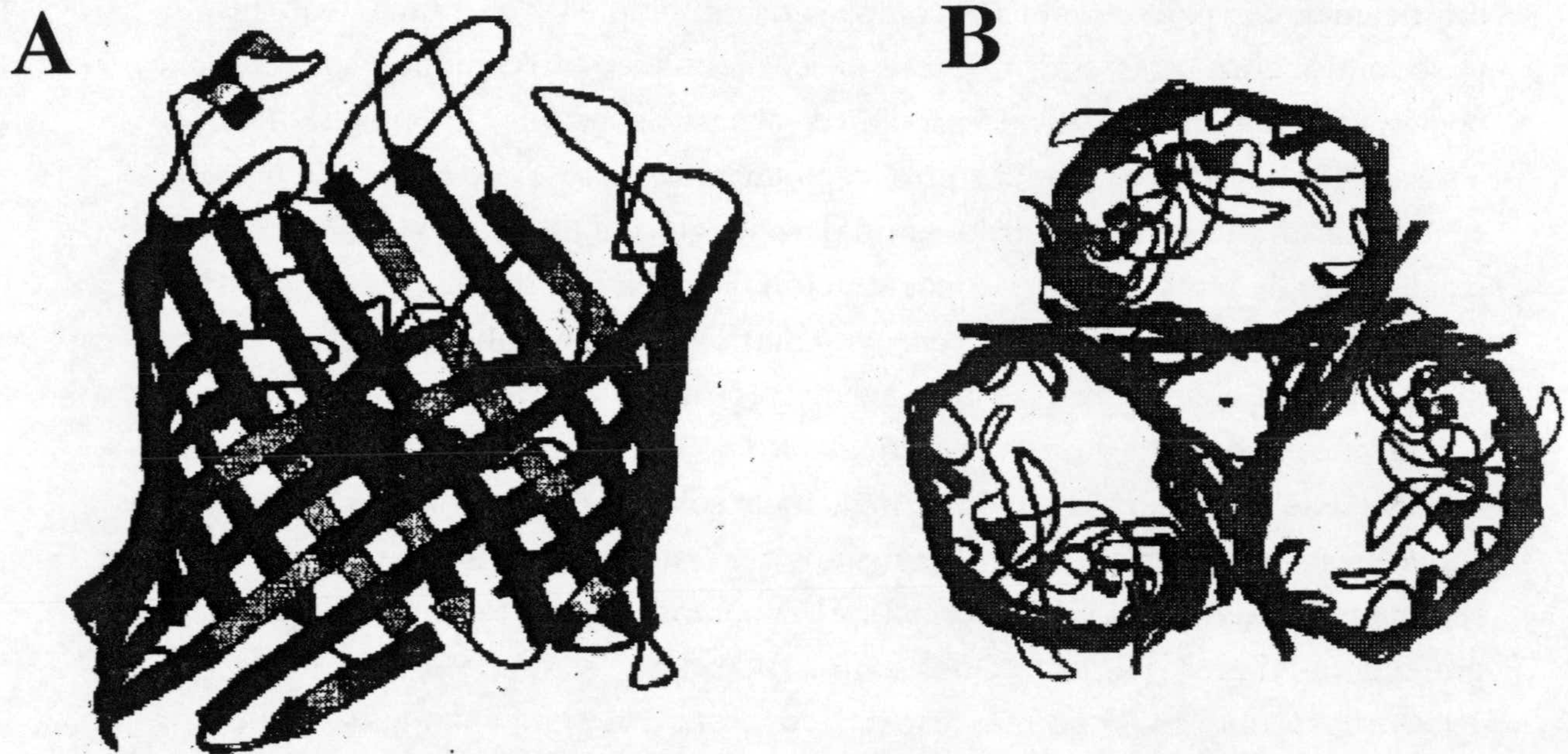


FIGURA 3. Patrón de plegamiento de la porina OmpF. (A) Esquema de un monómero de OmpF. Las 16 cadenas β transmembrana se representan mediante flechas y las 2 hélices α mediante "rizos". También se indican los extremos N- y C-. El "lazo" (L3) que se extiende hacia el interior del canal hidrofílico se indica en color negro. En este esquema el espacio periplásmico estaría situado en la parte inferior de la figura. (B) Esquema de un trímero de OmpF visto desde la parte inferior del eje de simetría triple (indicado por un triángulo). Los tres canales se estrechan debido al del "lazo" L3 (indicado en negro). (Obtenido de Cowan y Schirmer, 1994).

En cuanto a la regulación de la síntesis de las porinas, ésta se ha estudiado con bastante detalle en el caso de OmpF y OmpC de *E. coli*. Se ha calculado en base a los estudios por cristalografía de rayos X, que el diámetro del estrechamiento del canal que forma OmpF es de 1,1 x 0,7 nm, y se ha estimado que el de OmpC es un 10% menor (Cowan *et al.*, 1992; Nikaido y Rosenberg, 1983). Esta variación aparentemente pequeña tiene importantes consecuencias sobre la tasa de difusión de determinadas sustancias inhibitoras como los ácidos grasos libres o detergentes como las sales biliares, presentes normalmente en el hábitat natural de las

enterobacterias. De esta forma, la síntesis de OmpF, que posee el poro de mayor tamaño, se reprime en condiciones de osmolaridad alta o de temperatura elevada (por ej., 150 mM de NaCl o 37°C) además de por pH ácido, en condiciones de estrés de oxígeno o en presencia de ciertos antibióticos, en este último caso a través del regulador global MarA (Ariza *et al.*, 1994; Nikaido, 1996b). Así, mediante la expresión únicamente del canal más estrecho, OmpC, la bacteria sólo pierde un 50% de permeabilidad frente a nutrientes pequeños como la glucosa, a la vez que reduce drásticamente el paso de muchos compuestos inhibidores, generalmente de mayor peso molecular, más hidrofóbicos o cargados negativamente (o con una combinación de estas propiedades, como en el caso de las sales biliares) (Nikaido y Vaara, 1985). Por otro lado, la síntesis de OmpF se desreprime cuando la bacteria se encuentra fuera del cuerpo animal (en aguas naturales, etc.) donde las condiciones de temperatura y concentración de sales son mucho más bajas. Esta estrategia le permite a la bacteria conseguir nutrientes en un ambiente muy diluído de manera más eficiente. Otras señales que desreprimen la síntesis de OmpF son las condiciones de hambre de ciertos nutrientes como la glucosa. Con respecto a la base molecular de la regulación osmótica, mencionar solamente que es bastante compleja, y que en ella intervienen desde mecanismos generales cuyas bases moleculares aún se conocen poco, como por ejemplo, el superenrollamiento local del ADN, la proteína H-NS, etc. (Graeme-Cook *et al.*, 1989; Pratt *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996), hasta mecanismos más específicos como el sistema regulador de dos componentes EnvZ/OmpR (Pratt y Silhavy, 1995; Pratt *et al.*, 1996).

En lo que se refiere a la existencia de una posible regulación de la apertura o el cierre del canal de las porinas, es una de las áreas pendiente de exploración. Aunque observaciones *in vitro* han demostrado que los canales de ciertas porinas se pueden abrir y cerrar en respuesta a diversas condiciones (voltaje, pH) queda por comprobar si dicha transición se produce realmente en células intactas (Delcour, 1997; Todt *et al.*, 1992).

En base a todas las características mencionadas anteriormente, se podría explicar la razón del elevado número de moléculas de porina que existen en la membrana externa (más de 10^5 copias/célula). La penetración de solutos a través de las porinas ocurre por procesos de difusión simple según describe la ley de Fick, y por tanto, es proporcional a la diferencia de concentración existente entre el medio externo y el periplasma. Aunque dicha tasa sea alta en medios de laboratorio (que a menudo contienen fuentes de carbono a concentraciones de 5-10 mM), ésta disminuye más de 3 órdenes de magnitud cuando la concentración de nutrientes se sitúa en el intervalo micromolar (que es el tipo de ambiente para el cual la mayoría de los

sistemas de transporte activo de *E. coli* parecen haber sido diseñados). Se ha calculado que en tales condiciones realmente sería necesario esa enorme cantidad de porinas para transportar una fuente de carbono de tamaño medio (por ej., glucosa) a una tasa suficiente como para permitir un crecimiento rápido. Si se trata de nutrientes de mayor peso molecular (como disacáridos), ni siquiera tal cantidad de porinas es suficiente para mantener dicho crecimiento, por lo que se necesitan otros sistemas de difusión más específicos.

(ii) Canales de difusión específicos: son proteínas que también forman canales llenos de agua, y que contienen sitios de unión saturables específicos de sustrato. También se denominan porinas específicas o proteínas tipo porinas, aunque se ha recomendado la restricción del uso del término "porina" únicamente para aquellas proteínas que forman canales inespecíficos (Nikaido, 1992). La difusión facilitada de solutos a través de este tipo de proteínas sigue una cinética de saturación muy similar a la cinética enzimática de Michaelis-Menten. Dentro de este tipo de proteínas la mejor estudiada es LamB de *E. coli* (el receptor del fago λ), una proteína que forma trímeros y que se pliega en una estructura en barril β (formada por 18 cadenas β) como se ha demostrado al determinarse su estructura tridimensional (Schirmer, 1995). LamB facilita el paso de maltosa, glucosa y maltodextrinas. Aunque su síntesis se induce en presencia de maltosa también se ha demostrado que su expresión se desreprime en condiciones de hambre de carbono, en las cuales se convierte en la principal ruta de entrada de glucosa, que también es capaz de unirse a LamB aunque con menor afinidad que la maltosa (Death *et al.*, 1993). También se han encontrado otras proteínas que forman canales específicos en *E. coli*, como la proteína Tsx implicada en la difusión facilitada de nucleósidos (Bremer *et al.*, 1990), o la proteína de codificación plasmídica ScrY que produce canales específicos para la glucosa (Forst *et al.*, 1993). *P. aeruginosa* carece de las porinas triméricas "clásicas" presentes en otras bacterias gram negativas, por lo que la tasa de difusión inespecífica a través de su membrana externa es muy baja, lo cual confiere una especial significación a los canales específicos en este organismo. Por ejemplo, la proteína OprD (proteína D2) de *P. aeruginosa* forma un canal específico para la entrada de aminoácidos y péptidos básicos a través del cual puede penetrar también el antibiótico β -lactámico imipenem (Trias y Nikaido, 1990). De hecho, la selección de cepas resistentes a dicho antibiótico resulta en la aparición de mutantes deficientes en esta proteína (Quinn *et al.*, 1986). Otro de los canales específicos en *P. aeruginosa* es OprB (proteína D1), que también se encuentra en *P. putida* y otras pseudomonadáceas (Wylie y Worobec, 1994), y cuya síntesis se induce en presencia de glucosa. Esta proteína muestra preferencia por glucosa y xilosa sobre otros azúcares de tamaño similar, y se ha demostrado la presencia de un sitio de

unión específico para glucosa y otros carbohidratos (Trias *et al.*, 1988; Wylie *et al.*, 1993). OprP (proteína P) de *P. aeruginosa* es otra proteína que forma un canal específico, que se induce en condiciones de hambre de fosfato (Hancock *et al.*, 1982), y que también parece estar presente en otros miembros de las pseudomonadáceas, incluyendo *P. putida* (Hancock *et al.*, 1990). Esta proteína es bastante diferente de la porina inespecífica PhoE de *E. coli* que se induce en condiciones similares. OprP es una proteína específica de aniones pero con una preferencia 100 veces mayor hacia aniones fosfato, debido a que posee un sitio de unión específico para el mismo (Hancock y Benz, 1986). También se ha identificado un canal específico de pirofosfato, OprO, en *P. aeruginosa* (Hancock *et al.*, 1992). En la membrana externa de *P. aeruginosa* también se encuentran otras proteínas, como OprC y OprE, aunque no han sido muy estudiadas. OprC es una proteína minoritaria de aproximadamente 70 kDa que forma pequeños canales en la membrana externa y que parece presentar especificidad por Cu^{2+} . Además, su expresión se reprime en presencia de Cu^{2+} exógeno (Yoneyama y Nakae, 1996). OprE es una proteína de aproximadamente 43 kDa que se induce en condiciones de anaerobiosis y que presenta cierta similitud con OprD a nivel de estructura primaria (Yamano *et al.*, 1993).

(iii) Receptores de alta afinidad: son proteínas que median el transporte de ligandos a través de la membrana externa con mucha mayor afinidad que en el caso de los canales específicos, y se suelen denominar "receptores". Así, sus constantes de disociación (K_d) se suelen situar en el intervalo μM e incluso nM (frente a las K_d de orden mM de los canales específicos). Además, para poder transportar sus ligandos, los receptores requieren la intervención de TonB, una proteína que se ancla a la membrana interna y se supone que interacciona físicamente con dichos receptores para transmitirles la energía almacenada en la membrana interna, fundamental para el proceso de translocación (la proteína TonB se tratará específicamente en un apartado posterior [ver Fig. 9] de esta *Introducción*). Este proceso conlleva la acumulación de los ligandos transportados en el periplasma (mientras que en el caso de los canales específicos sólo se podría conseguir un equilibrio pasivo de los solutos a través de la membrana). Esta vía de entrada específica también se conoce como ruta dependiente de TonB (Nikaido, 1994a), y está diseñada para la toma de nutrientes, generalmente de gran tamaño, que se encuentran en el medio ambiente extracelular a concentraciones muy bajas, como es el caso de la vitamina B_{12} o de los complejos quelantes de Fe^{3+} . Así, por ejemplo, el sistema BtuB-TonB es capaz de acumular su ligando (la vitamina B_{12}) en el periplasma a concentraciones 1.000 veces superiores a las del medio externo, usando como fuente de energía la fuerza protomotriz acumulada a través de la

membrana citoplásmica (Bradbeer, 1993). Muchos de los receptores estudiados están implicados en la entrada de complejos de alto peso molecular del tipo Fe^{3+} -sideróforo (moléculas quelantes de hierro producidas generalmente por los microorganismos, para capturar el Fe^{3+} ambiental), FhuA, por ejemplo, una ferricromo, FepA una enterobactina, FecA un complejo de citrato férrico, etc. (Nikaido, 1996a). La presencia de un exceso de Fe^{3+} en el medio reprime la producción de estos receptores. *Pseudomonas* spp. puede producir al menos dos clases de sideróforos, las piochelinas y las pioverdinas, así como varios supuestos receptores de membrana externa (Hancock *et al.*, 1990), algunos de los cuales se han identificado, como la proteína FBP de *P. aeruginosa* que une ferripiochelina (Sokol y Woods, 1986). Recientemente, se han determinado las estructuras tridimensionales de los receptores FepA (Buchanan *et al.*, 1999) y FhuA (Locher *et al.*, 1998).

(iv) Lipoproteínas: bajo esta denominación se agrupan un conjunto de proteínas con funciones muy diversas, caracterizadas por compartir la misma ruta biosintética y por poseer una región lipídica. La lipoproteína más estudiada de *E. coli* es la denominada lipoproteína de la mureína o de Braun (Braun y Rehn, 1969). Esta proteína codificada por el gen *lpp*, posee un peso molecular de 7,2 kDa y su número de copias es muy elevado, unas 7×10^5 /célula (Nakamura e Inoue, 1979). Un tercio de la misma está unida covalentemente al peptidoglicano (mediante un enlace peptídico entre el grupo carboxilo del ácido *m*-diaminopimélico del peptidoglicano y el grupo ϵ - NH_2 de la lisina carboxilo terminal de la proteína) (Fig. 4) mientras que los dos tercios restantes se encuentran en forma libre, aunque continúan interaccionando débilmente con el peptidoglicano (Choi *et al.*, 1987). Por otro lado, la parte lipídica de la lipoproteína está formada por una glicerilcisteína amino terminal a la cual se unen dos ácidos grasos mediante enlaces éster y un ácido graso (generalmente palmitato) mediante un enlace amida. Se piensa que la proteína se inserta en la cara interna de la membrana externa a través de esta región lipídica y que el resto de la proteína, hidrofílica y organizada en forma de hélice α se sitúa en el periplasma. Se ha demostrado que la parte proteica puede asociarse formando trímeros (Choi *et al.*, 1987). No es una proteína esencial, aunque se ha demostrado que es importante para mantener la integridad estructural de la pared celular, ya que los mutantes *lpp* liberan enzimas periplásmicos al medio externo, son más sensibles a diversos detergentes y otros agentes, y muestran evaginaciones a modo de burbujas en su membrana externa, a nivel del tabique de división (Fung *et al.*, 1978). Se ha sugerido que podría actuar en el mantenimiento del espacio periplásmico, a través de la unión de la membrana externa con el peptidoglicano. Además de Lpp se han encontrado otras cinco lipoproteínas en la membrana externa

de *E. coli* (Wu, 1996; Matsuyama *et al.*, 1997), entre las que destaca la lipoproteína PAL, que se tratará más adelante. Además, existen otras de codificación plasmídica como, por ejemplo, TraT, codificada por el plásmido F e implicada en mecanismos

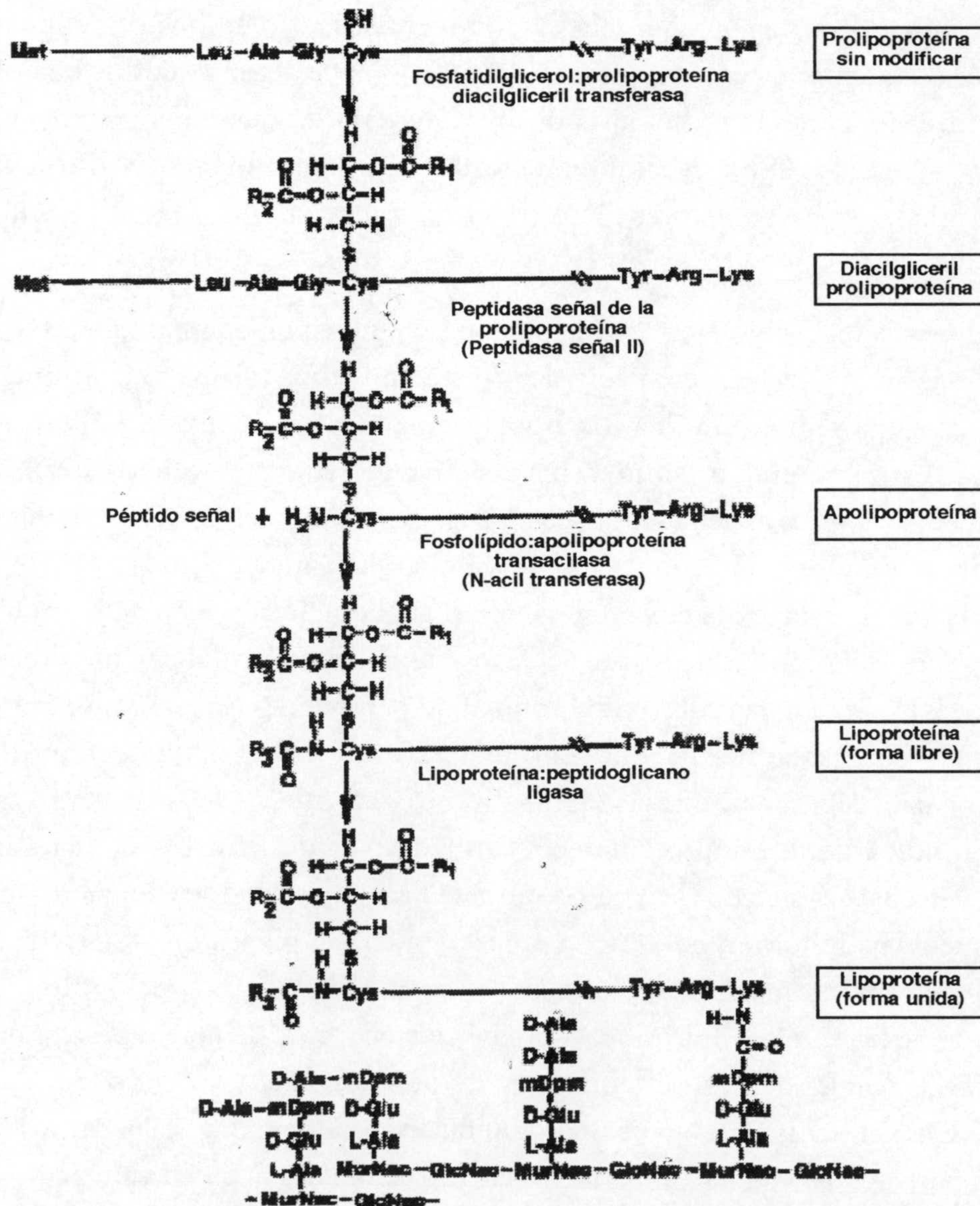


FIGURA 4. Ruta propuesta para la biosíntesis de la lipoproteína de Braun (Lpp). mDpm, ácido *meso*-diaminopimélico; MurNac, ácido *N*-acetilmurámico; GlcNac, *N*-acetilglucosamina. (Obtenido de Wu, 1996).

de exclusión superficial en las células que portan dicho plásmido (Sukupolvi y O'Connor, 1990). Sorprendentemente, resultados obtenidos en experimentos de entrecruzamiento con reactivos bifuncionales sugieren que en *E. coli*, la mayoría de las lipoproteínas de la envoltura celular interaccionan de algún modo con el peptidoglicano (Leduc *et al.*, 1992).

En *P. aeruginosa* destaca la lipoproteína OprI (proteína I), una proteína de 9 kDa, análoga a Lpp de *E. coli*, que también se encuentra en la célula en un número de copias muy elevado (Cornelis *et al.*, 1989). Con respecto al modo de asociación con el peptidoglicano, éste parece variar según las cepas, algunas poseen aparentemente formas tanto unidas covalentemente como libres, como en *E. coli*, mientras que otras como PAO1 poseen tan sólo la forma libre (Hancock *et al.*, 1990). *P. aeruginosa* posee además otra lipoproteína abundante, OprL (proteína H2), secuenciada recientemente y equivalente a la lipoproteína PAL de *E. coli* (Lim *et al.*, 1997).

(v) Otras proteínas destacadas: una de las proteínas más estudiada de la membrana externa de *E. coli* es la porina monomérica OmpA (35 kDa), de la que existen aproximadamente unas 10^5 copias/célula. Los 170 residuos amino terminales de esta proteína, cuya estructura tridimensional aún no ha sido resuelta, se supone que se ensamblan en la membrana externa formando un dominio en barril β compuesto por 8 cadenas β antiparalelas (cantidad que probablemente constituya el número mínimo necesario para formar un barril β), mientras que el resto de la proteína se localiza en el periplasma donde interacciona fuertemente con el peptidoglicano de forma no covalente. Ambos dominios están separados por una región (aminoácidos 176-187) rica en alanina y prolina que se asemeja a la región "en bisagra" de las inmunoglobulinas. Una de las principales funciones de esta proteína multifuncional parece ser la de estabilizar la estructura de la membrana externa (Nikaido y Vaara, 1985). OmpA también está implicada en la estabilización de los agregados de conjugación con células donadoras F^+ , además de servir de receptor para varios fagos y colicinas (Lugtenberg y van Alphen, 1983). En cuanto a su papel como porina, se ha visto que la proteína purificada forma canales de difusión inespecíficos con un tamaño similar a los de OmpF (Sugawara y Nikaido, 1992). Sin embargo, la tasa de penetración de solutos a través de este canal es aproximadamente dos órdenes de magnitud inferior que en el caso de OmpF, por lo que su contribución a la permeabilidad de la membrana no parece ser demasiado significativa.

P. aeruginosa produce también unas 2×10^5 copias/célula de una porina monomérica inespecífica de 35 kDa, denominada OprF (proteína F), similar a

OmpA de *E. coli*. OprF posee, como OmpA, una importante función estructural, ya que su deficiencia produce células redondeadas, que crecen con dificultad en medio con baja osmolaridad, que presentan evaginaciones en su membrana externa y que además liberan de enzimas periplásmicos (Gotoh *et al.*, 1989). OprF también desempeña funciones en procesos de conjugación (Woodruff y Hancock, 1989). Su similitud con OmpA se demuestra por el hecho de que complementa en parte la falta de OmpA en mutantes *ompA lpp* de *E. coli* (Woodruff y Hancock, 1989). Se ha propuesto que OprF se estructura en tres dominios, un dominio N-terminal (primeros 160 aminoácidos), que formaría una estructura de barril β en la membrana de forma análoga a OmpA; una región central (161-209) rica en prolina y alanina que contiene dos puentes disulfuro; y un dominio C-terminal (210-326) muy conservado con respecto a otras proteínas de la familia OmpA, que también interacciona con el peptidoglicano (Rawling *et al.*, 1998). A pesar de estas similitudes, existe una gran controversia sobre la estructura del dominio C-terminal. En contra del modelo admitido para OmpA, que sugiere que este dominio globular es exclusivamente periplásmico, en el caso de OprF se ha propuesto un modelo según el cual esta región estaría asociada a la membrana a través de una considerable proporción de hoja β antiparalela (Rawling *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1993).

El motivo por el cual las porinas monoméricas OmpA y OprF producen unas tasas de penetración tan bajas, aún está por resolver. En el caso de OmpA existen evidencias experimentales que indican que sólo una pequeña fracción (del 2 al 3%) de la población total de proteína, se pliega de manera que forma canales funcionales (Sugawara y Nikaido, 1994). Con respecto a OprF, aunque su función como porina se ha llegado a poner en duda (ver Hancock *et al.*, 1990; Nikaido *et al.*, 1991), se ha estimado que una pequeña proporción de moléculas de OprF por célula (menos del 1%) estaría formando poros grandes (de unos 2 nm), mientras que el resto formarían poros considerablemente menores, lo que explicaría la baja permeabilidad que presenta la membrana externa de *P. aeruginosa* (Woodruff *et al.*, 1986).

Diversas evidencias junto con la existencia de reacciones cruzadas entre OmpA de *E. coli* y proteínas de otros microorganismos, sugieren que en las bacterias gram negativas existe una familia de proteínas tipo OmpA que, además de poseer funciones de receptor y/o de porina, juegan un papel clave en el mantenimiento de la estabilidad de la membrana externa a través de sus interacciones con la capa subyacente de peptidoglicano (Hancock *et al.*, 1994).

1.2. Funciones de la membrana externa

La presencia de una envoltura adicional en las bacterias gram negativas, la membrana externa, les confiere numerosas ventajas en comparación con los microorganismos gram positivos. La membrana externa juega un papel esencial como barrera de exclusión de compuestos potencialmente nocivos como detergentes, antibióticos hidrofóbicos, enzimas hidrolíticos, etc., a la vez que funciona de barrera de permeabilidad selectiva para otros solutos. Además de éstas, la membrana externa también desempeña otras muchas funciones: interviene en la secreción de numerosas moléculas al exterior celular a través de rutas específicas (metabolitos secundarios, sideróforos, enzimas, toxinas, moléculas para la construcción de cápsulas celulares, etc.); posee receptores tanto para nutrientes (como las proteínas receptoras de alta afinidad que unen complejos hierro-sideróforos, vitamina B₁₂, etc.), como los implicados en la unión de pili conjugativos (por ej., OmpA o el LPS) cuyo aspecto negativo es que también son parasitados para la unión de bacteriófagos o bacteriocinas (por ej., LamB, LPS, etc.); también participa en otros procesos de interacción con el medio ambiente (por ej., confiere protección contra la acción bactericida del suero, interviene en la unión bacteriana a superficies tanto celulares como de otro tipo, etc.); además sirve de anclaje a otras estructuras externas (flagelos, capas S, cápsulas, etc.); y posee incluso un cierto papel estructural, influyendo en la forma celular (por ej., a través de proteínas como OmpA o Lpp).

1.2.1. La membrana externa como barrera de exclusión y de permeabilidad selectiva

Puesto que la función de barrera selectiva de la membrana externa es una de sus propiedades más importantes, las bases moleculares de la misma se han estudiado con bastante profundidad. Aunque se considera que la membrana externa es "impermeable" a la mayoría de sustancias hidrofóbicas, incluyendo detergentes, antibióticos hidrofóbicos y numerosos enzimas, es importante destacar que este concepto de "exclusión" ha de ser entendido en términos fisiológicos, y que refleja la probabilidad de que dichos compuestos no atraviesen la membrana a una tasa lo suficientemente elevada como para producir efectos negativos sobre la célula (por ej., la solubilización, inhibición de la función o modificación de alguna macromolécula bacteriana). La propiedad de barrera de permeabilidad de una membrana dada está inversamente relacionada con su fluidez. La baja permeabilidad de la membrana externa se debe fundamentalmente a la estructura asimétrica de su bicapa lipídica, y en concreto a las características propias de las moléculas de LPS, localizadas en su monocapa externa. Los LPS contienen 6 ó 7 moléculas de ácidos grasos, todos saturados, unidas a un único grupo de cabeza, en contraste con los dos ácidos grasos que posee cada molécula de fosfoglicérido. Esto hace que el interior

lipídico de la monocapa de LPS sea muy poco fluído, lo que disminuye la permeabilidad de la membrana externa a moléculas hidrofóbicas entre 50 y 100 veces, con respecto a las clásicas membranas formadas por fosfoglicéridos (como la membrana citoplásmica) (Nikaido, 1994b). Por otro lado, las moléculas de LPS interaccionan entre sí a través de cationes divalentes, generalmente Mg^{2+} y Ca^{2+} , que neutralizan parcialmente las carga negativa de las mismas (debida a la presencia de numerosos grupos cargados en la región del lípido A y del "core" interno) (Nikaido, 1996a). Estas fuertes asociaciones de los LPS entre sí y con moléculas de proteína vecinas son de gran importancia para el mantenimiento de una barrera de permeabilidad eficaz. De hecho, la presencia de cationes divalentes es esencial para la existencia de la membrana, ya que disminuyen la fuerte repulsión electrostática existente entre moléculas de LPS adyacentes. Habría que resaltar que a pH neutro, la carga neta de la superficie celular de un gran número de bacterias es negativa (Bayer y Sloyer, 1990). En especies que poseen cápsula aniónica, ésta es la principal contribuyente a la carga final, pero en especies sin cápsula, el LPS es el contribuyente más importante. Este hecho indica que la neutralización de los LPS es incompleta con lo que la superficie de las células bacterianas se podría describir como una capa con un potencial electrostático altamente negativo con cationes divalentes y monovalentes fluyendo rápidamente a través de su superficie (Hancock *et al.*, 1994). De esta manera, la baja permeabilidad que presenta la membrana externa hacia las moléculas hidrofóbicas refleja la dificultad de las mismas para atravesar dicho área de potencial electrostático negativo.

El importante papel que desempeñan los LPS en la membrana se pone de manifiesto cuando se estudian mutantes alterados en los mismos. La permeabilidad de la membrana externa no varía demasiado cuando falta la cadena lateral O o incluso la porción distal del "core", sin embargo, los mutantes que pierden los azúcares de la región proximal del "core", el "core" interno ("quimiotipos" Rd₁, Rd₂ y Re [Fig. 2], denominados *deep rough*), se vuelven enormemente sensibles a compuestos como detergentes, ácidos grasos, fenol, hidrocarburos policíclicos, colorantes y antibióticos hidrofóbicos, etc. (Nikaido y Vaara, 1985). La razón de este aumento de permeabilidad parece deberse a que la membrana de dichos mutantes contiene un número reducido de porinas (que además tienen problemas para ensamblarse en forma de trímeros [Sen y Nikaido, 1991]), lo que conlleva un aumento compensatorio en la cantidad de fosfolípidos, que se incorporan incluso a nivel de la monocapa externa, creando pequeñas zonas de bicapa fosfolipídica a través de las cuales se produce la rápida difusión de los compuestos hidrofóbicos (Kamio y Nikaido, 1976; Nikaido, 1996a).

Como se ha mencionado, la membrana externa es una barrera bastante efectiva contra una gran número de sustancias nocivas (antibióticos, detergentes aniónicos y

neutros, etc.), que atraviesan la membrana con extrema dificultad debido a que suelen ser compuestos hidrofóbicos o compuestos hidrofílicos relativamente grandes (Nikaido y Vaara, 1985; Vaara, 1992). Sin embargo, la bicapa de la membrana externa no es una barrera perfecta para compuestos hidrofóbicos, sobretodo si éstos poseen una fracción significativa de formas no cargadas (como ocurre por ejemplo con algunas tetraciclinas hidrofóbicas) (Nikaido y Thanassi, 1993; Nikaido, 1994a). Es entonces cuando los procesos de inactivación o de extrusión activa juegan un papel esencial (Nikaido, 1994b). La membrana, en cambio, es una barrera casi perfecta contra moléculas anfipáticas, ya que a pH fisiológico, sólo una fracción insignificante de las mismas existe en forma protonada, sin carga, capaz de acceder al interior lipídico (Nikaido, 1994a; Plesiat y Nikaido, 1992). Aunque, como se mencionó anteriormente, los sitios de unión para cationes en los LPS son esenciales para mantener la integridad de la membrana, estos también son al mismo tiempo su "talón de Aquiles". Así, existen una serie de moléculas que, mediante interacciones con los mencionados sitios de unión para cationes, permeabilizan la membrana promoviendo su propia entrada y la de otros compuestos. Entre dichas sustancias destacan agentes quelantes como el EDTA, y compuestos catiónicos como las polimixinas, los polímeros de lisina, ciertos péptidos catiónicos, algunos detergentes catiónicos, Tris e incluso cationes (Mg^{++} , Ca^{++} y Na^+) (Vaara, 1992). El mecanismo de acción del agente quelante EDTA se basa en la eliminación de los cationes divalentes que estabilizan los LPS, lo que provoca la extracción de cantidades considerables de LPS de la membrana externa (Marvin *et al.*, 1989), y supuestamente conduce a una situación análoga a la de los mutantes *deep rough*. El EDTA y el Tris actúan de forma sinérgica sobre la liberación de LPS (Vaara, 1992). En el caso de los agentes catiónicos, entre los que las polimixinas constituyen los compuestos más estudiados, el mecanismo molecular de permeabilización no está claro, aunque se sabe que algunos de estos compuestos desplazan competitivamente a los cationes divalentes de los LPS, y que su interacción con los LPS es cooperativa, de manera que la unión de una molécula de polication a la membrana externa facilita la interacción de posteriores moléculas (Hancock *et al.*, 1994; Vaara, 1992).

Además de las sustancias inhibitoras que difunden a través de la bicapa lipídica, también existen otras que atraviesan la membrana externa por la ruta de las porinas inespecíficas, como muchos compuestos β -lactámicos (cuyo tamaño suele ser pequeño), aminoglicósidos (que son muy hidrofílicos), cloramfenicol (pequeño y sin carga), etc. Asimismo, la entrada por la vía de los canales específicos es importante en algunos casos, como ocurre por ejemplo con el antibiótico β -lactámico imipenem, que en *P. aeruginosa*, cuya permeabilidad inespecífica es extremadamente baja, penetra por OprD (aunque en enterobacteriáceas lo hace a través de la ruta de las porinas no específicas).

Finalmente, conviene destacar que en conjunción con la barrera de permeabilidad que representa la membrana externa, los microorganismos han desarrollado a lo largo de la evolución estrategias adicionales para protegerse de los compuestos inhibidores del medio circundante, como los mecanismos de resistencia activa (por ej., degradando el inhibidor o inactivándolo por modificación enzimática) o más importantes aún los sistemas de extrusión activa de drogas. Entre estos últimos, destacan los que actúan sobre una amplia gama de compuestos (por ej., AcrAB). Los sistemas de extrusión suelen constar de tres componentes: un transportador de membrana interna, un canal de membrana externa y una proteína accesoria que conecta ambas estructuras a través del periplasma, posibilitando así la salida de la droga directamente al exterior celular (Nikaido, 1996b). Entre las proteínas canal destaca TolC (Wandersman y Delepelaire, 1990; Aono *et al.*, 1998), lo que podría explicar el fenotipo de hipersensibilidad a detergentes y antibióticos hidrofóbicos que muestran los mutantes *tolC* en base a defectos en los sistemas de extrusión activa más que a causa de alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa.

Todos los mecanismos hasta ahora mencionados actúan de forma sinérgica confiriendo en muchas ocasiones unos niveles de resistencia muy significativos (Nikaido, 1994b).

1.3. Ensamblaje de los componentes de la membrana externa

1.3.1. Fosfolípidos

Existe un rápido intercambio de fosfolípidos entre las membranas externa e interna, aunque no se ha podido identificar ninguna proteína que catalice este proceso por lo que se supone que podría ocurrir a través de las zonas de fusión entre membranas (uniones de Bayer) (Nikaido, 1996a).

1.3.2. LPS

El LPS se sintetiza en la membrana citoplásmica. La biosíntesis de la región del lípido A-oligosacárido del "core" tiene lugar en la cara interna de la membrana citoplásmica a través de una serie de reacciones en las que se transfieren sucesivamente los distintos azúcares que componen esta parte de la molécula (Heinrichs *et al.*, 1998; Raetz, 1996; Reeves, 1994; Schnaitman y Klena, 1993). El polisacárido O se sintetiza de manera independiente sobre un lípido transportador anclado a la membrana, el undecaprenol pirofosfato. Hasta la fecha se conocen tres posibles rutas para el ensamblaje del antígeno O. Los homopolímeros (por ej., el LPS de la banda A de *P. aeruginosa*) siguen una ruta independiente de la proteína Wzy (Rfc) ensamblándose de forma procesiva en la cara interna de la membrana citoplásmica gracias a la actividad de glicosiltransferasas específicas. Después un sistema de transporte tipo ABC facilita la

transferencia de la cadena O polimerizada desde la cara citoplásmica a la periplásmica donde se une a la región del lípido A-"core" (Whitfield *et al.*, 1997). Otra ruta independiente de Wzy pero distinta a la anterior es la usada para el ensamblaje del antígeno O (factor 54) de *S. enterica* sv. Borreze, en la que el polisacárido es polimerizado y translocado a través de la membrana interna por medio de una única glicosiltransferasa (sintasa), WbbF (RfbB) (Whitfield *et al.*, 1997). Por último, los heteropolímeros (por ej., el LPS de la banda B de *P. aeruginosa*) siguen la ruta clásica dependiente de Wzy, en la cual las unidades de oligosacárido repetidas se sintetizan en la cara interna de la membrana citoplásmica y posteriormente son translocadas al periplasma de forma individual por Wzx (RfbX), donde son polimerizadas por Wzy (Rfc) a la vez que la proteína Wzz (Rol) controla la longitud de la cadena polimerizada (Fig. 5) (Raetz, 1996; Whitfield *et al.*, 1997). Independientemente de la ruta seguida, el polisacárido O se une a la región del lípido A-"core" por la acción de la ligasa WaaL (RfaL) (Whitfield *et al.*, 1997). Los pasos posteriores en la exportación de LPS (a través del periplasma y

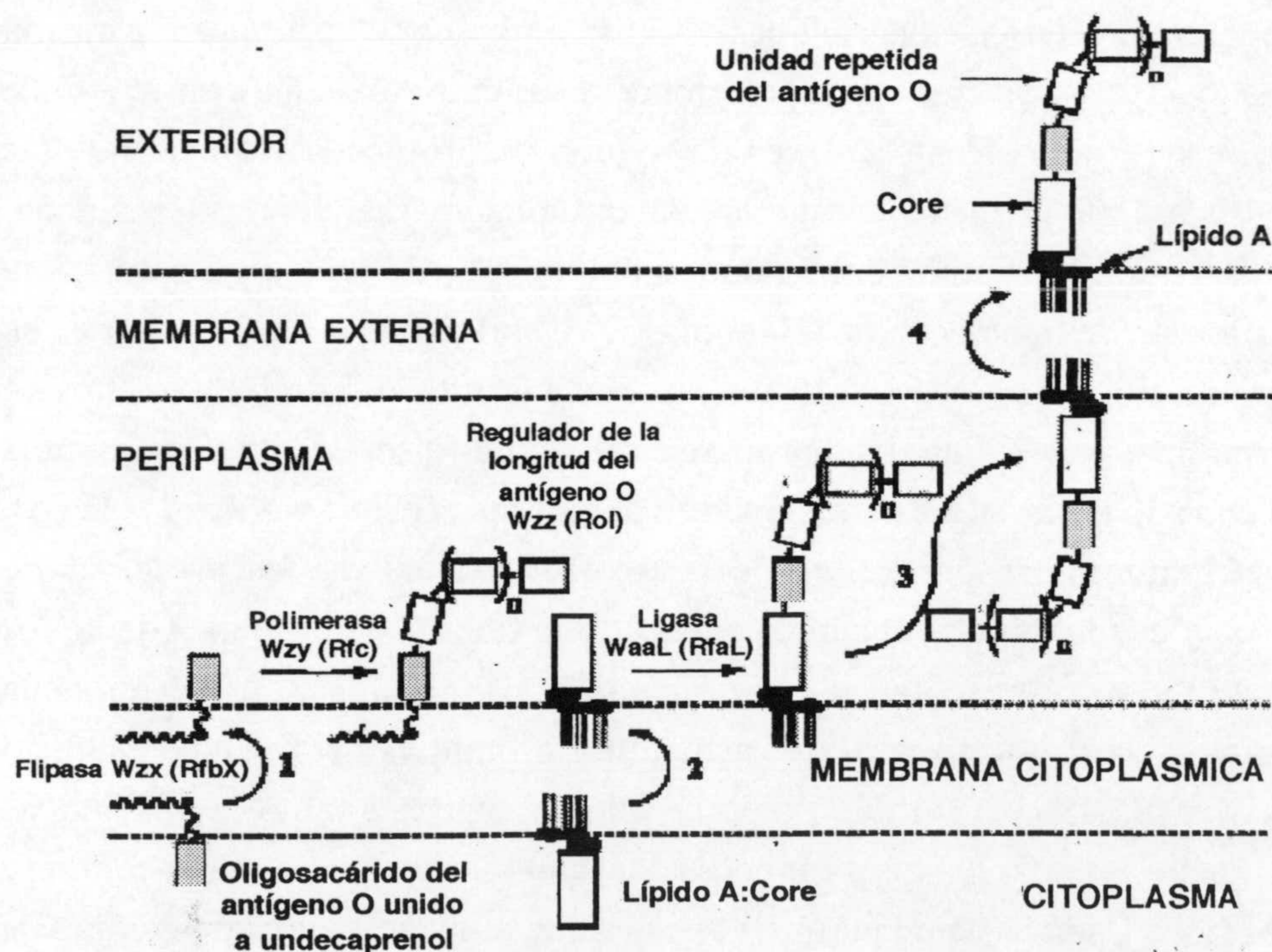


FIGURA 5. Posible esquema de ensamblaje y secreción de LPS. Los pasos 1-4 representan los eventos de translocación que podrían requerir la participación de proteínas específicas y/o suministro de energía. (Adaptado de Raetz, 1996).

hacia la cara externa de la membrana externa) se desconocen por completo (Reeves, 1994; Raetz, 1996). Las moléculas de LPS recién sintetizadas parecen emerger sobre las regiones de membrana correspondientes las supuestas uniones de Bayer (Mühlradt *et al.*, 1973).

1.3.3. Proteínas

Las proteínas de la membrana externa se suelen sintetizar como precursores provistos de un péptido señal y se exportan a través de la ruta de secreción dependiente de las proteínas Sec (Pugsley, 1993). Diversas evidencias experimentales obtenidas en su mayoría con estudios de la proteína OmpA de *E. coli* apoyan la idea de que las proteínas de membrana externa se exportan transitoriamente al periplasma donde parecen existir en forma soluble gracias a sus propiedades hidrofílicas (Nikaido, 1996a). Dada la naturaleza anfipática de las cadenas β de dichas proteínas, éstas no pueden penetrar en el interior de la membrana externa hasta haberse ensamblado en forma de barril β . De hecho, se han llegado a detectar en el periplasma intermediarios de OmpA plegados en una conformación inmadura, menos estable (Freud *et al.*, 1986). Se supone que éstos adquieren su conformación madura al entrar en la membrana externa, a menudo gracias a interacciones con las moléculas de LPS. Esta forma de ensamblaje contrasta con la de las proteínas integrales de la membrana interna, cuyas hélices α transmembrana se insertan en la misma una por una (Pugsley, 1993). Se cree que la diferencia estructural existente entre ambos tipos de proteínas (estructura α frente a β), es un requerimiento necesario para que las proteínas de membrana externa puedan atravesar la membrana interna, donde un segmento demasiado hidrófobo podría actuar como una señal de parada de la transferencia inhibiendo así el proceso de translocación (Henning y Koebnik, 1994). Por otra parte, en *S. enterica* sv. typhimurium se ha observado mediante estudios de microscopía electrónica que las porinas triméricas recién sintetizadas aparecen en zonas discretas de la membrana correspondiendo con supuestos sitios de fusión entre membranas (Smit y Nikaido, 1978). En cuanto a los elementos responsables de la topología final de las proteínas de membrana, no se conoce mucho. Se sabe que dentro de una familia de proteínas dada, los segmentos transmembrana representan las regiones más conservadas, en particular la cadena β C-terminal, cuyo último residuo, a menudo aromático, posee una especial relevancia (Struyvé *et al.*, 1991). También se sabe que las regiones tanto periplásmicas como expuestas en la superficie, que conectan las cadenas β no parecen contener información topogénica y son bastante permisivas en lo que a inserciones o deleciones se refiere. Además, se ha determinado mediante estudios con OmpA, que las cadenas β toleran mal los residuos de prolina y las cadenas laterales demasiado voluminosas en residuos que miren hacia el interior del barril β (Koebnik, 1999).

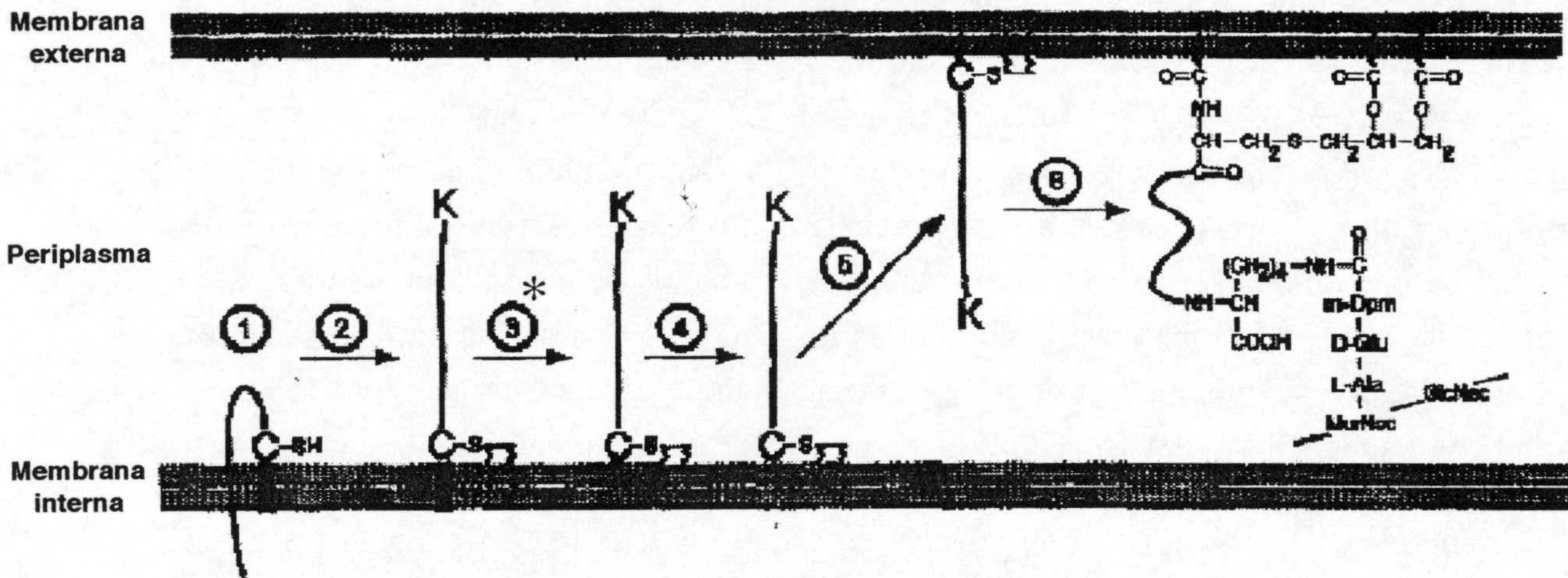
Con respecto a las lipoproteínas, al igual que el resto de las proteínas de la membrana externa también se sintetizan como precursores provistos de un péptido señal y se exportan a través de la ruta Sec (Pugsley, 1993). La ruta biosintética de las lipoproteínas se ha establecido en base a los estudios realizados con la proteína Lpp de *E. coli* (Wu, 1996). De manera resumida, las modificaciones lipídicas y el procesamiento hasta su forma madura ocurren en la membrana interna. En esta membrana, una peptidasa específica para lipoproteínas (la peptidasa señal II), que se inhibe específicamente por globomicina, corta el péptido señal después de que el residuo de cisteína (conservado en todas las lipoproteínas) haya sido modificado con un diglicérido, donado por una molécula de fosfatidilglicerol. Posteriormente, el procesamiento se completa con la adición de un ácido graso (generalmente palmitato) al residuo de cisteína (Fig. 4 y 6A) (Braun y Wu, 1994; Hayashi y Wu, 1990; Wu, 1996). Se ha demostrado que, al menos en Lpp de *E. coli*, los nueve primeros aminoácidos de la proteína madura contienen toda la información necesaria para su correcto procesamiento y localización (Ghrayeb e Inoue, 1984). Además, se ha propuesto que el segundo aminoácido de la proteína madura juega un papel decisivo en la localización final de la misma. Así, una serina en esta posición conlleva una localización en la membrana externa y un aspártico (carga negativa) en la interna (Yamaguchi *et al.*, 1988). También se ha comprobado que aún inhibiendo el corte del péptido señal de las proteínas PAL y Lpp de *E. coli*, el resto de la cadena es capaz de atravesar la membrana interna e incluso de interactuar con el peptidoglicano, aunque permanece retenida en dicha membrana (Ichihara *et al.*, 1982; Yakushi *et al.*, 1997). Recientemente se han descubierto dos proteínas, LolA y LolB implicadas en la localización de las lipoproteínas de membrana externa (Fig. 6B). LolA es un transportador periplásmico capaz de reconocer la señal de localización para membrana externa de las lipoproteínas, las cuales son liberadas de la membrana interna mediante la formación un complejo soluble con dicha proteína, aparentemente en proporción 1:1 (Matsuyama *et al.*, 1995; Tajima *et al.*, 1998). LolB es una lipoproteína esencial, de la membrana externa, que funciona como receptora del complejo LolA-lipoproteína e interviene en la incorporación de la lipoproteína en dicha membrana (Matsuyama *et al.*, 1997).

2. EL SISTEMA Tol-PAL

Como se ha mencionado anteriormente, la membrana externa de las bacterias gram negativas constituye una eficiente barrera de permeabilidad contra un gran número de sustancias tóxicas. También se ha mencionado la importancia de algunas proteínas estructurales como OmpA o Lpp en *E. coli* y OprF en *P. aeruginosa*, en el mantenimiento de dicha barrera. En *E. coli*, en el minuto 16,8 de su mapa genético, se han localizado también otra serie de genes de gran importancia para el mantenimiento de la integridad

estructural y funcional de la membrana externa, son los genes del denominado sistema Tol-PAL (*orf1*, *tolQ*, *tolR*, *tolA*, *tolB*, *pal* y *orf2*). La mutación de cualquiera de estos genes (exceptuando *orf1* y *orf2*) convierte a la bacteria en sensible a detergentes y otros

A



B

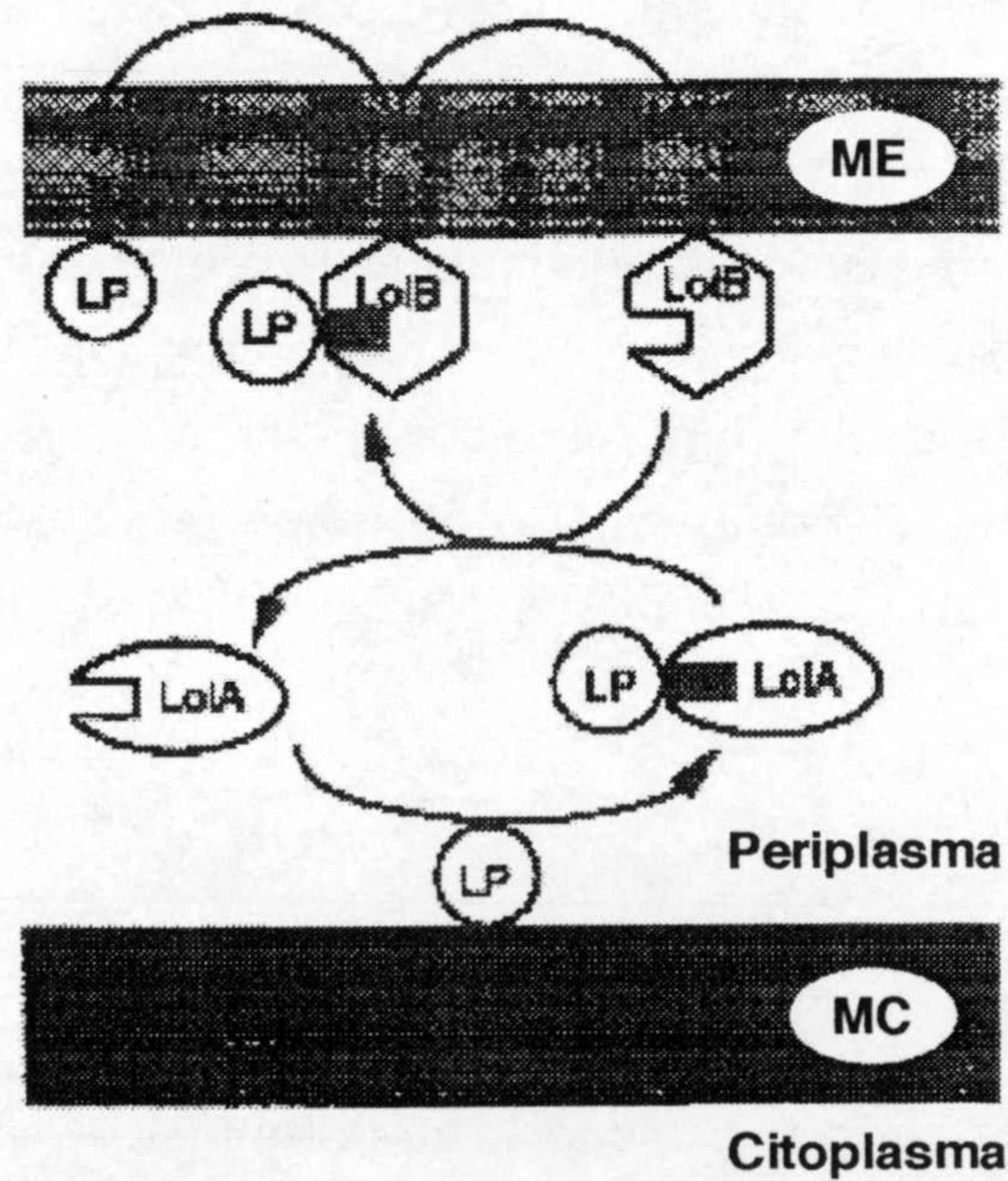


FIGURA 6. Esquema propuesto para la exportación y el ensamblaje de la lipoproteína de Braun (Lpp) en la membrana externa. (A) ①, la proteína se exporta a través de la membrana externa gracias a su péptido señal. ②-④, la proteína se procesa como se indicó en la figura 4. (*) El antibiótico globomicina inhibe específicamente el procesamiento a nivel del paso ③, y se ha demostrado que la molécula intermediaria resultante (diacilgliceril prolipoproteína) es capaz de unirse covalentemente al peptidoglicano por lo que el paso ⑥ podría ocurrir antes de lo indicado (Ichihara *et al.*, 1982; Yakushi *et al.*, 1997). El paso ⑤ requiere la participación de las proteínas LolA y LolB, y se detalla en la figura de la parte inferior. m-Dpm, ácido *meso*-diaminopimélico; MurNac, ácido *N*-acetilmurámico; GlcNac, *N*-acetilglucosamina. (Adaptado de Navarre y Schneewind, 1999). (B) Mecanismo propuesto para la translocación de las lipoproteínas de membrana externa (ME), desde la membrana citoplásmica (CM). LP, lipoproteína que se dirige a la membrana externa. (Obtenido de Matsuyama *et al.*, 1997).

compuestos inhibidores, además de provocar la liberación de enzimas periplásmicos al medio extracelular, y la formación de vesículas de membrana externa (Bernadac *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1989; Webster, 1991).

El sistema Tol-PAL de *E. coli* es un complejo multiproteico localizado en la envoltura celular y formado por tres proteínas de membrana interna (TolQ, TolR y TolA), dos proteínas periplásmicas (TolB y Orf2) y una lipoproteína de membrana externa (PAL), además de una proteína citoplásmica (Orf1). Los genes que codifican estas proteínas se agrupan formando dos operones. El primer operón está formado por los genes *orf1*, *tolQ*, *tolR* y *tolA*, y el segundo por los genes *tolB*, *pal* y *orf2* (en el orden indicado) (Vianney *et al.*, 1996). Una serie de experimentos, que incluyen entrecruzamientos con formaldehído, co-inmunoprecipitaciones y análisis de supresión de mutantes, han demostrado que el sistema Tol-PAL está organizado en dos complejos proteicos. Un complejo de membrana interna, formado por las proteínas TolQ, TolR y TolA, que interaccionan entre sí a través de sus dominios transmembrana (Derouiche *et al.*, 1995; Germon *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1995); y un complejo asociado a la membrana externa, formado por TolB, PAL y otras dos proteínas de la membrana externa, Lpp y OmpA (Fig. 7A) (Bouveret *et al.*, 1995; Clavel *et al.*, 1998). Aunque aún no se ha demostrado de forma concluyente, el Dr. J. C. Lazzaroni ha sugerido que la proteína Orf2 también formaría parte de este complejo (comunicación personal).

Las proteínas TolA y TolR constan de tres dominios. Ambas se anclan en la membrana interna a través de un dominio transmembrana amino terminal, localizándose el resto de la proteína en el periplasma (Levengood *et al.*, 1991; Levengood y Webster, 1989; Müller *et al.*, 1993). TolA posee un dominio central largo que atraviesa el periplasma en forma de hélice α (Levengood *et al.*, 1991) y que interacciona con ciertas porinas triméricas de la membrana externa (OmpF, OmpC, PhoE y LamB) pero no con la porina monomérica OmpA (Derouiche *et al.*, 1996). La región periplásmica de TolR se

divide a su vez en dos dominios, un dominio central de unos 100 aminoácidos implicado al parecer en la dimerización de la proteína (Lazdunski *et al.*, 1998) y un corto dominio C-terminal que supuestamente se pliega formando una hélice α anfipática capaz de asociarse con la membrana interna (Lazzaroni *et al.*, 1995). TolQ, por su parte, es una proteína integral de membrana con tres segmentos transmembrana (Vianney *et al.*, 1994). Se sabe que el segmento transmembrana de TolA interacciona con el dominio transmembrana amino terminal de TolQ (QI) (Derouiche *et al.*, 1995; Germon *et al.*, 1998) y con el segmento transmembrana de TolR (Derouiche *et al.*, 1995), mientras que el tercer dominio transmembrana de TolQ (QIII) interacciona con el segmento transmembrana de TolR (Lazzaroni *et al.*, 1995) (Fig. 7B). Supuestamente, el dominio C-terminal de TolR también intervendría en la interacción entre TolQ y TolR (Lazzaroni *et al.*, 1995). Además, el primer y el tercer dominio de TolQ (QI y QIII) también parecen estar en contacto (Fig. 7B) (Lazzaroni *et al.*, 1995). También se han encontrado, por experimentos de entrecruzamiento con formaldehído, complejos TolR-TolR y TolR-TolR-

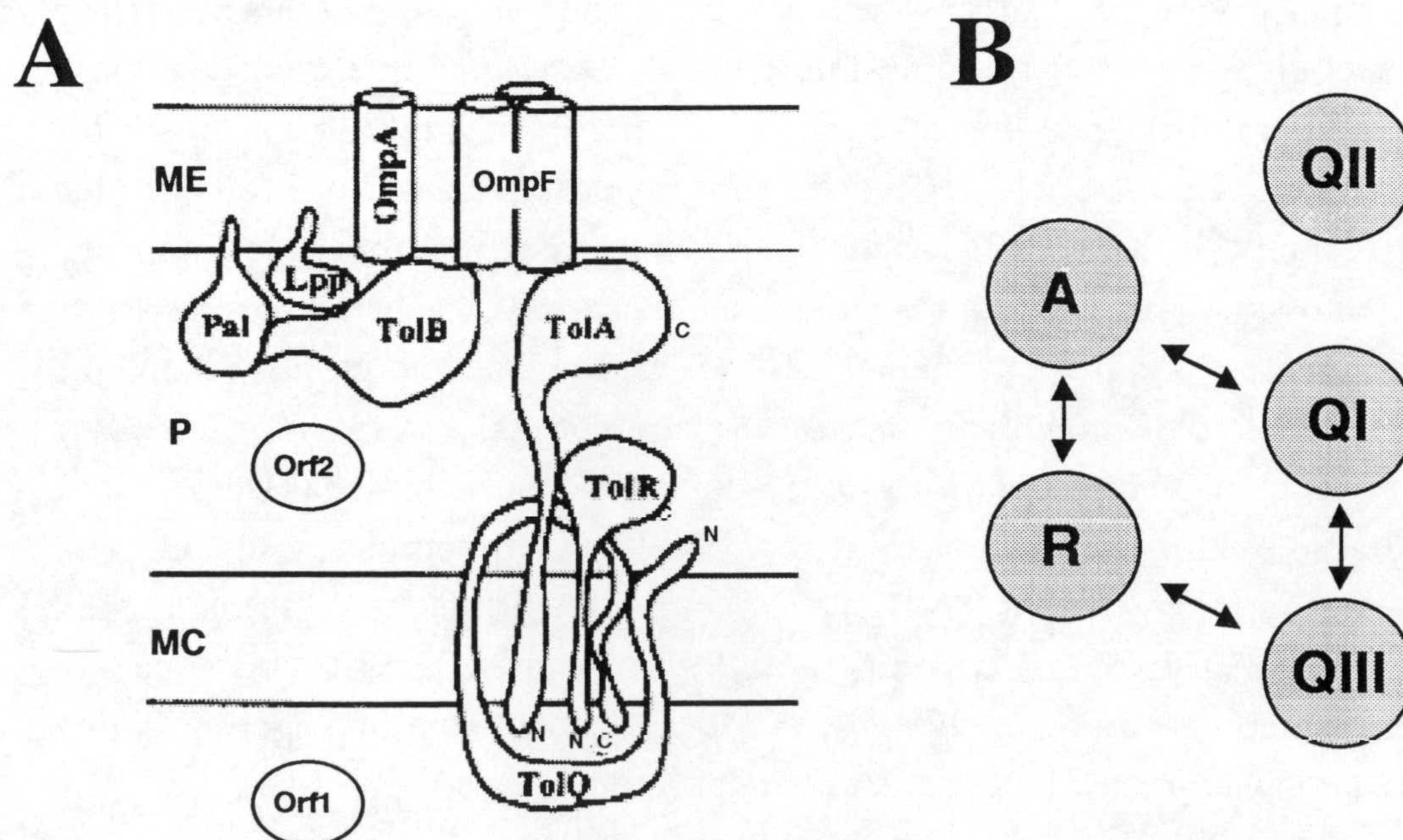


FIGURA 7. Sistema Tol-PAL. (A) Localización en la envoltura celular de las distintas proteínas del sistema Tol-PAL y de algunas de las proteínas con las que interaccionan. ME, membrana externa; MC, membrana citoplásmica; P, periplasma; N, extremo amino; C, extremo carboxilo. (Adaptado de Lazdunski *et al.*, 1998). (B) Esquema de las interacciones demostradas hasta la fecha entre los dominios transmembrana de las proteínas TolQ (QI, QII y QIII), TolR (R) y TolA (A). (Adaptado de Derouiche *et al.*, 1995).

TolQ, lo que sugiere que TolR podría formar dímeros *in vivo* (Germon *et al.*, 1998; Lazdunski *et al.*, 1998). Sin embargo, nunca se han podido detectar mediante esta técnica ningún complejo TolQ-TolR-TolA, lo que podría indicar que estas tres proteínas no forman un complejo estable sino que más bien podrían interactuar entre sí de forma secuencial. Por otra parte, la proteína TolB interactúa con PAL, Lpp y OmpA (Bouveret *et al.*, 1995; Clavel *et al.*, 1998) y de manera análoga a TolA, también interactúa con OmpF, OmpC, PhoE y LamB pero no con OmpA (Rigal *et al.*, 1997). PAL a su vez también interactúa con OmpA (Clavel *et al.*, 1998).

Aunque no existen evidencias experimentales que demuestren una interacción entre los complejos TolQ-TolR-TolA y TolB-PAL-Lpp-OmpA, el hecho de que las proteínas Tol se localicen mayoritariamente en los sitios de contacto entre las membranas interna y externa, apoya esta hipótesis (Guihard *et al.*, 1994). Además, el hecho de que el sistema Tol sea utilizado por diversas colicinas como vía de entrada en la célula y dado que muchas de ellas requieren la presencia de las proteínas TolQ, TolR, TolA y TolB, también favorece esta idea (Lazdunski *et al.*, 1998). Las colicinas son proteínas antibacterianas codificadas por plásmidos (que simultáneamente codifican una proteína de inmunidad), secretadas al medio por *E. coli* y activas contra cepas sensibles de *E. coli* y bacterias relacionadas (James *et al.*, 1996; Kleanthous *et al.*, 1998; Lazdunski, 1995; Lazdunski *et al.*, 1998). Estas proteínas, cuya estructura tridimensional se ha determinado en algunos casos (Elkins *et al.*, 1997; Parker *et al.*, 1992; Wiener *et al.*, 1997), constan de tres dominios, un dominio central implicado en el reconocimiento de un receptor de membrana específico, un dominio N-terminal en la translocación y un tercer dominio C-terminal responsable de la actividad letal (ADNasa, ARNasa, "porina", etc.). Las colicinas se dividen en dos grupos según su ruta de entrada en la célula: las colicinas del grupo A (A, E1-E9, K, L, N, S4, bacteriocina 28b y cloacina DF13) usan el sistema Tol y las del grupo B (B, D, G, H, Ia, Ib, M, Q, V, 5 y 10) usan el sistema TonB. Existen células mutantes, insensibles a la acción de las colicinas debido a la pérdida del receptor de membrana (denominadas "resistentes") o bien debido a mutaciones en el sistema de translocación (denominadas "tolerantes"). Entre estas últimas se encuentran las diversas mutaciones en los genes *tol*. El mecanismo de entrada de las colicinas se ha propuesto como sistema modelo para el estudio del transporte de proteínas a través de las membranas (Lazdunski, 1995), y se ha analizado en profundidad, particularmente en el caso de la colicina A (Lazdunski *et al.*, 1998). De esta forma, se sabe que el dominio C-terminal de TolA interactúa *in vitro* con las colicinas A y E1, concretamente con su dominio N-terminal (de translocación) (Bénédicti *et al.*, 1991; Derouiche *et al.*, 1997), y se ha demostrado la interacción de TolB con el dominio N-terminal de la colicina E3 (Bouveret *et al.*, 1997). También se ha encontrado un motivo conservado de 5 aminoácidos (denominado "caja TolA") en la región N-terminal de todas las colicinas del

grupo A, y se ha comprobado que, aunque es importante para la translocación de la colicina A, en realidad no se une a TolA sino a TolB (Bouveret *et al.*, 1998; Garinot-Schneider *et al.*, 1997). En cuanto al proceso de translocación de la colicina A (que precisa de las proteínas OmpF, TolA, TolB, TolQ y TolR) se ha propuesto el siguiente modelo basado en todos los datos experimentales disponibles (Lazdunski *et al.*, 1998) (Fig. 8): Pasos 1 y 2, la colicina se "despliega" tan pronto como se une a su receptor (BtuB) lo que permitiría el acceso de su dominio N-terminal (T) al canal de OmpF (Duché *et al.*, 1994; Jeanteur *et al.*, 1994). Nada más acceder a la cara interna de la membrana externa (paso 3), el dominio T interaccionaría con TolB que estaría unida a PAL, y eventualmente desplazaría a TolB de PAL, lo cual permitiría a esta última interaccionar mejor con el peptidoglicano dado que las regiones de PAL que interaccionan con TolB y con el peptidoglicano solapan (Clavel *et al.*, 1998). Después, TolA interaccionaría con el

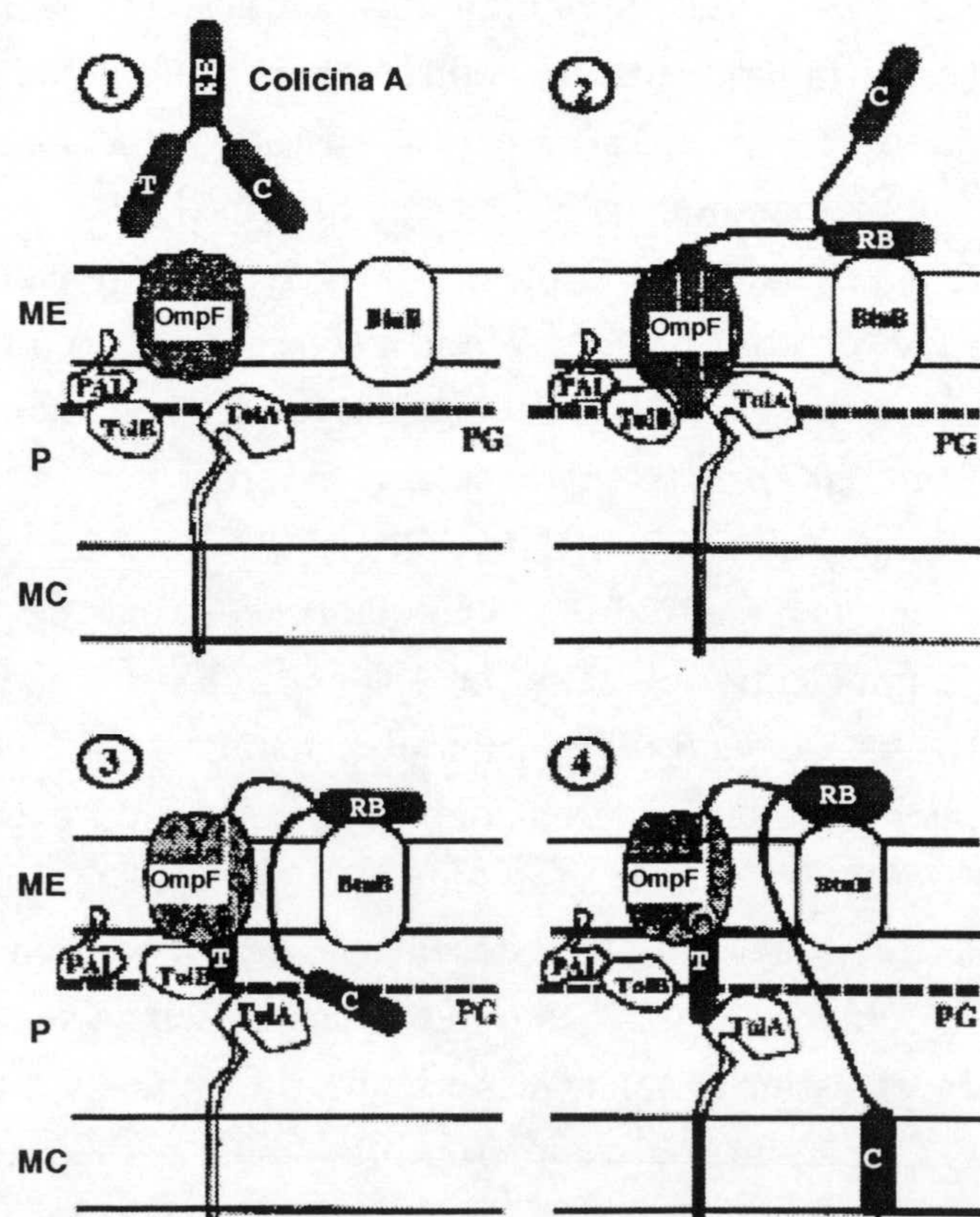


FIGURA 8. Modelo propuesto para la translocación de la colicina A. ME, membrana externa; MC, membrana citoplásica; P, periplasma; PG, peptidoglicano; C, región carboxilo terminal (dominio formador del poro); T, región amino terminal (dominio implicado en la translocación); RB, región central (dominio de unión al receptor). (Obtenido de Lazdunski *et al.*, 1998).

dominio T (paso 4). Durante esta secuencia de interacciones, y de un modo aún por dilucidar, el dominio C-terminal se translocaría a través de la membrana externa hasta alcanzar la membrana interna donde formaría un poro. Se sabe que la colicina A continúa interaccionado con su receptor y con el sistema de translocación una vez ha formado el poro, con lo que adoptaría una conformación extendida a través de la envoltura celular (Bénédicti *et al.*, 1992; Duché *et al.*, 1994).

De forma análoga a las colicinas, ciertos bacteriófagos filamentosos (f1, fd y M13) también usan el sistema Tol como vía de entrada para su genoma de ADN monocatenario (Click y Webster, 1997 y 1998), requiriendo concretamente la presencia de las proteínas TolQ, TolR y TolA durante la infección (Sun y Webster, 1986 y 1987). En el caso de TolA, se ha determinado que su dominio C-terminal es esencial para que se produzca infección porque interacciona con una proteína de la cápsida del fago, de hecho, este dominio se ha designado como el co-receptor para la infección de este tipo de fagos (Riechmann y Holliger, 1997).

Como se mencionó anteriormente, el sistema TonB (Fig. 9) también es parasitado por las colicinas del grupo B además de por los fagos T1 y ϕ 80. Este sistema está compuesto por las proteínas TonB, ExbB y ExbD. Las dos últimas guardan una similitud significativa con TolQ y TolR, (del 79,1% y 70% en *E. coli*), respectivamente, e incluso se complementan parcialmente (Braun, 1989; Braun y Herrmann, 1993; Eick-Helmerich y Braun, 1989). TolA y TonB sólo presentan similitud de secuencia a nivel del segmento transmembrana y, aunque ambos poseen conformaciones alargadas, sus estructuras son diferentes. Como las proteínas del complejo Tol de membrana interna, las proteínas del sistema TonB también interaccionan entre sí de manera muy similar y recientemente se ha encontrado que forman homomultímeros (dímeros y trímeros) (Higgs *et al.*, 1998).

El sistema Tol-PAL, al igual que el sistema TonB, parece estar conservado en diversas bacterias gram negativas, incluyendo *Haemophilus influenzae* y *P. aeruginosa* (Dennis *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 1997; Sen *et al.*, 1996). Esta última especie también produce proteínas con actividad bactericida (denominadas piocinas), similares a las colicinas producidas por *E. coli*, aunque de codificación cromosómica. Entre las piocinas producidas por *P. aeruginosa* destacan las del tipo S y en particular la piocina AP41 (AR41), una toxina que posee un dominio con actividad ADNasa muy similar al de la colicina E2 (Sano y Kageyama, 1993). La particularidad de esta bacteriocina es que también precisa de las proteínas Tol para penetrar en las células de *P. aeruginosa*, lo que refleja un alto grado de conservación en la función de los sistemas Tol, a pesar de que ninguno de los genes *tolQ*, *tolR* o *tolA* de *P. aeruginosa* es capaz de complementar el fenotipo de su correspondiente mutante *tol* de *E. coli* (Dennis *et al.*, 1996; Holloway *et al.*, 1973).

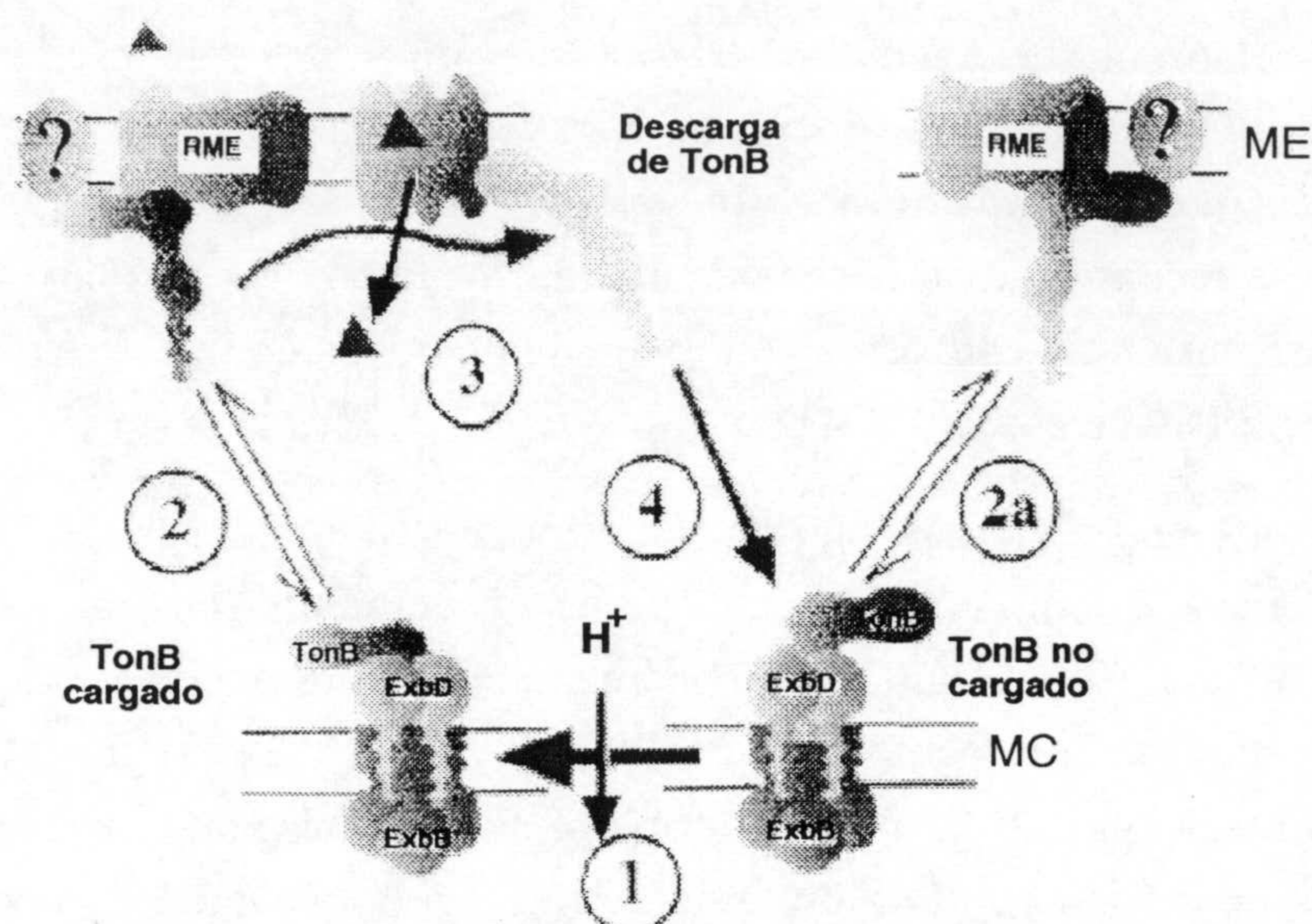
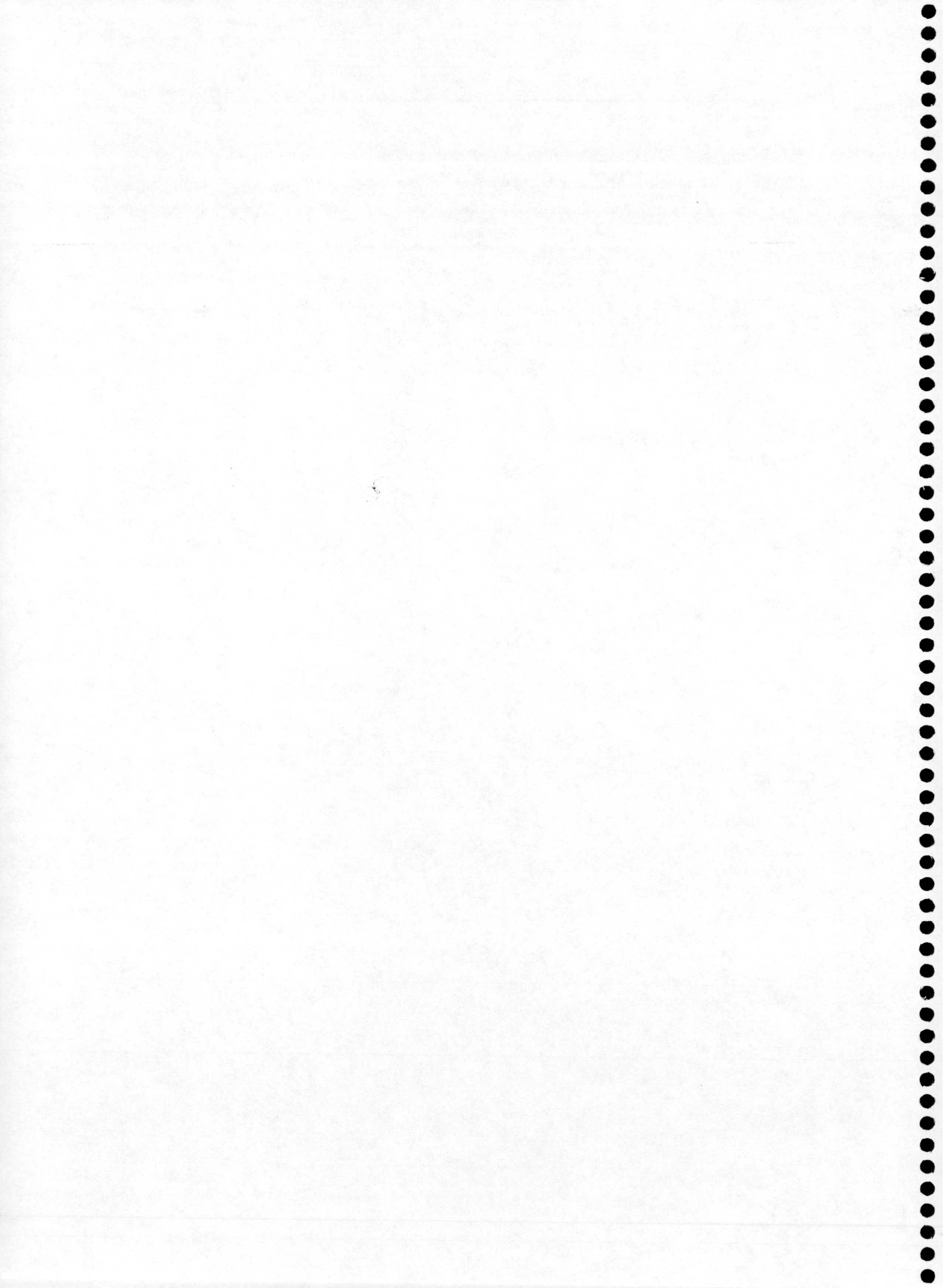


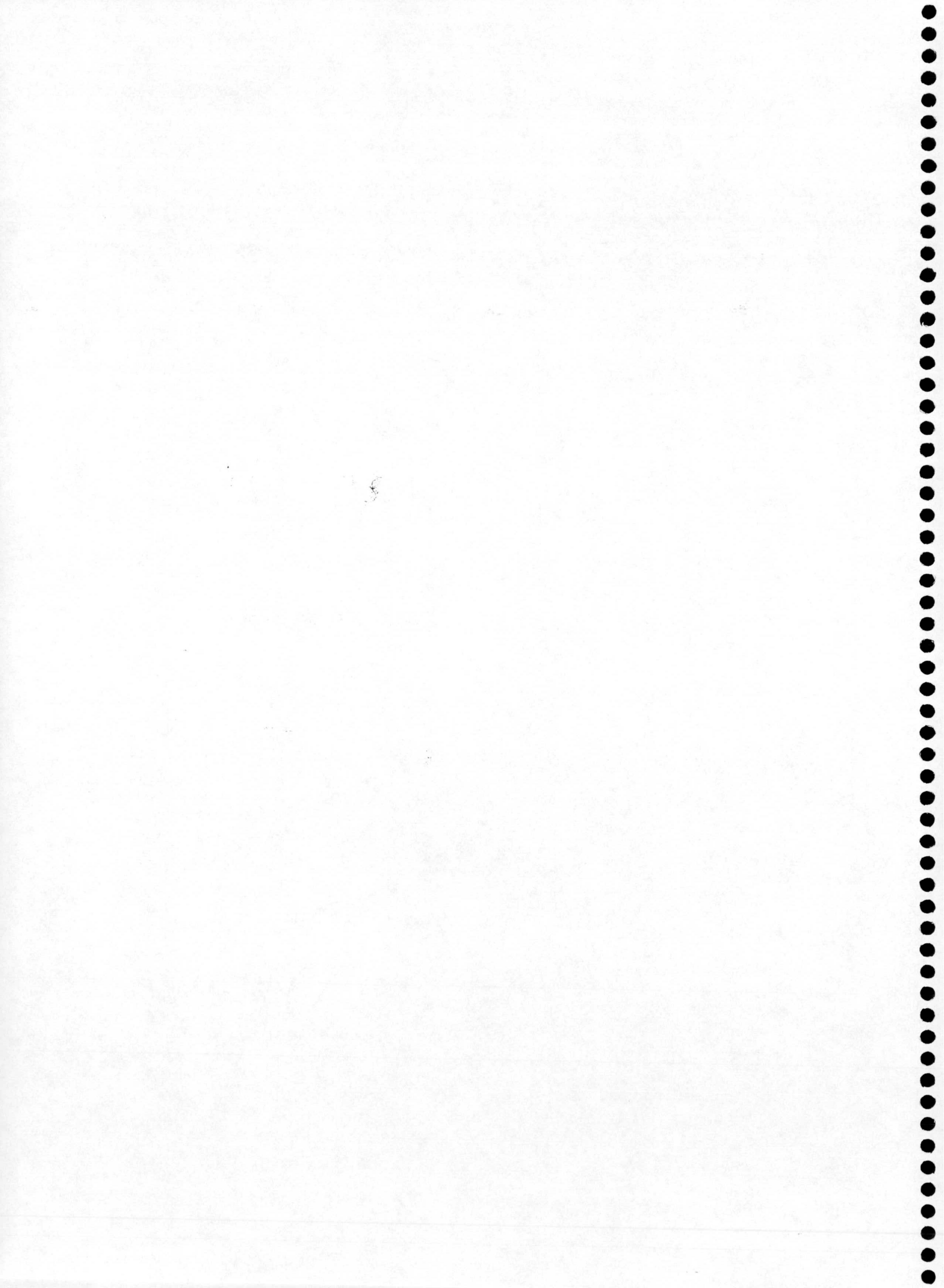
FIGURA 9. Modelo de transducción de energía dependiente de TonB. 1, Transición de TonB desde la conformación "no cargada" hasta la conformación "cargada" (energetizada) acoplada al gradiente de protones. Aunque se desconoce el mecanismo, ExbB parece estar directamente implicada en dicho proceso. El complejo proteico de membrana interna ExbB/ExbD se representa como un heterohexámero en base a los datos de Higgs *et al.* (1998). 2, TonB en su conformación "cargada" interactúa con componentes de la membrana externa (RME, receptor de membrana externa; ?, proteínas de la membrana interna aún sin identificar). Estas interacciones ocurren independientemente del estado energético de TonB (2a). En este modelo, se asume que TonB no permanece asociada a la membrana citoplásmica mientras interacciona con los componentes de la membrana externa, en base a los datos obtenidos a partir de experimentos de fraccionamiento subcelular (aunque se desconoce lo que sucede *in vivo*). La presencia de ligando unido al RME potencia su interacción con TonB. 3, La liberación de la energía almacenada por TonB provoca un cambio conformacional del RME que conduce a la entrada del ligando unido. El mecanismo de transporte del ligando aún no se ha dilucidado. 4, Tras la transferencia de energía al RME, TonB se recicla interaccionando nuevamente con el complejo ExbB/ExbD. MC, membrana citoplásmica; ME, membrana externa. (Obtenido de Larsen *et al.*, 1999).

Con respecto a las posibles funciones del sistema Tol-PAL, la más evidente es la función estructural, interviniendo en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa. En este contexto se ha sugerido que el complejo formado por las proteínas TolB, PAL, Lpp y OmpA, podría intervenir decisivamente en la unión del peptidoglicano a la membrana externa (Clavel *et al.*, 1998). Además, se han sugerido otras posibilidades en base a la demostrada interacción de algunas de las proteínas del sistema con las porinas. Así, podría intervenir en los procesos exportación de las porinas a través del periplasma y su ensamblaje en la membrana externa, aunque el principal problema de esta hipótesis es que las porinas se ensamblan correctamente en los distintos mutantes *tol* aunque éstos posean menos cantidad de OmpF y LamB de la normal (Lazzaroni *et al.*, 1986).

Finalmente, también se ha sugerido que el sistema Tol-PAL podría intervenir en algún tipo de regulación de la apertura de los canales inespecíficos, pero no existen ningún dato experimental que apoye esta hipótesis.



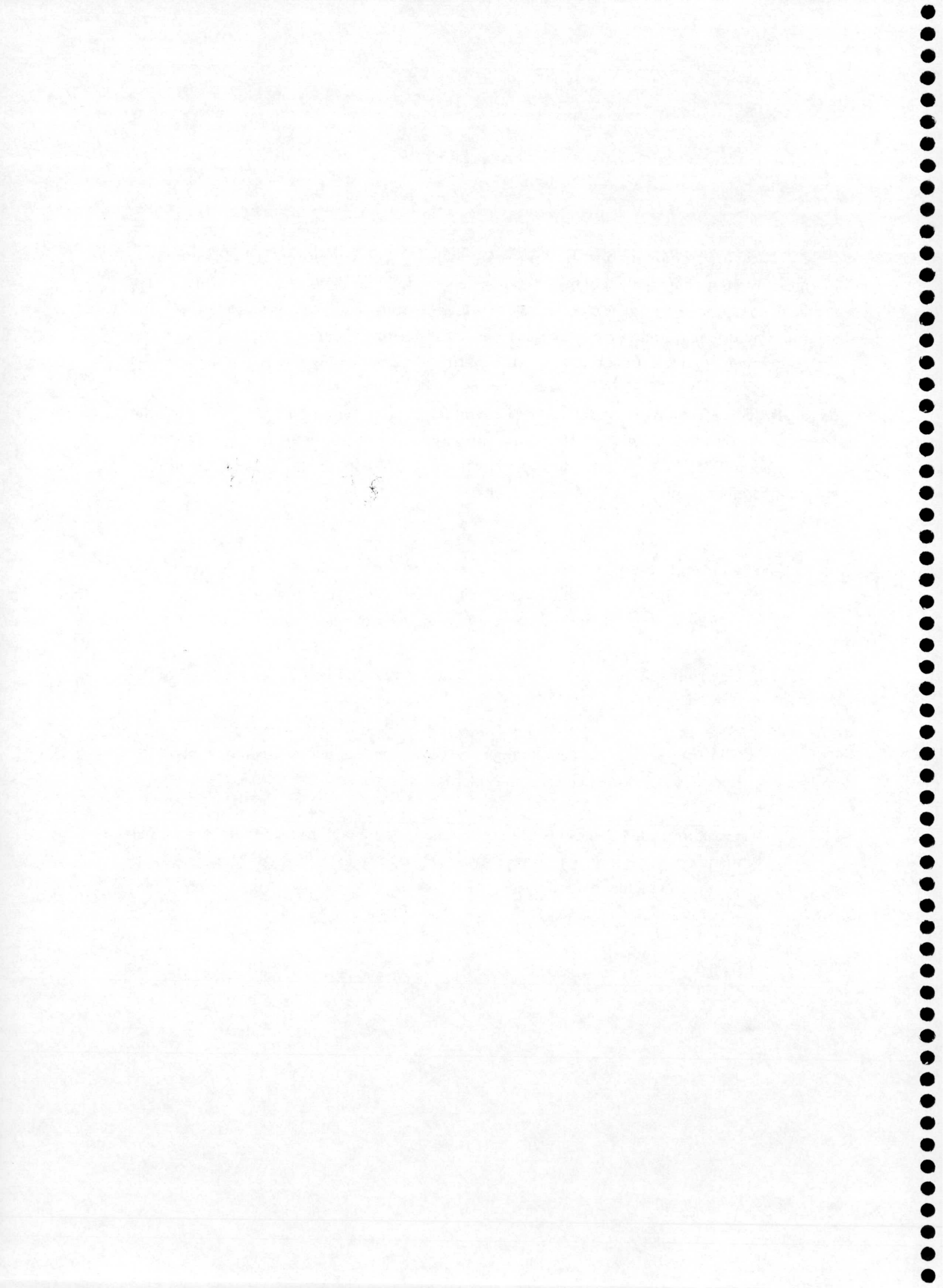
OBJETIVOS



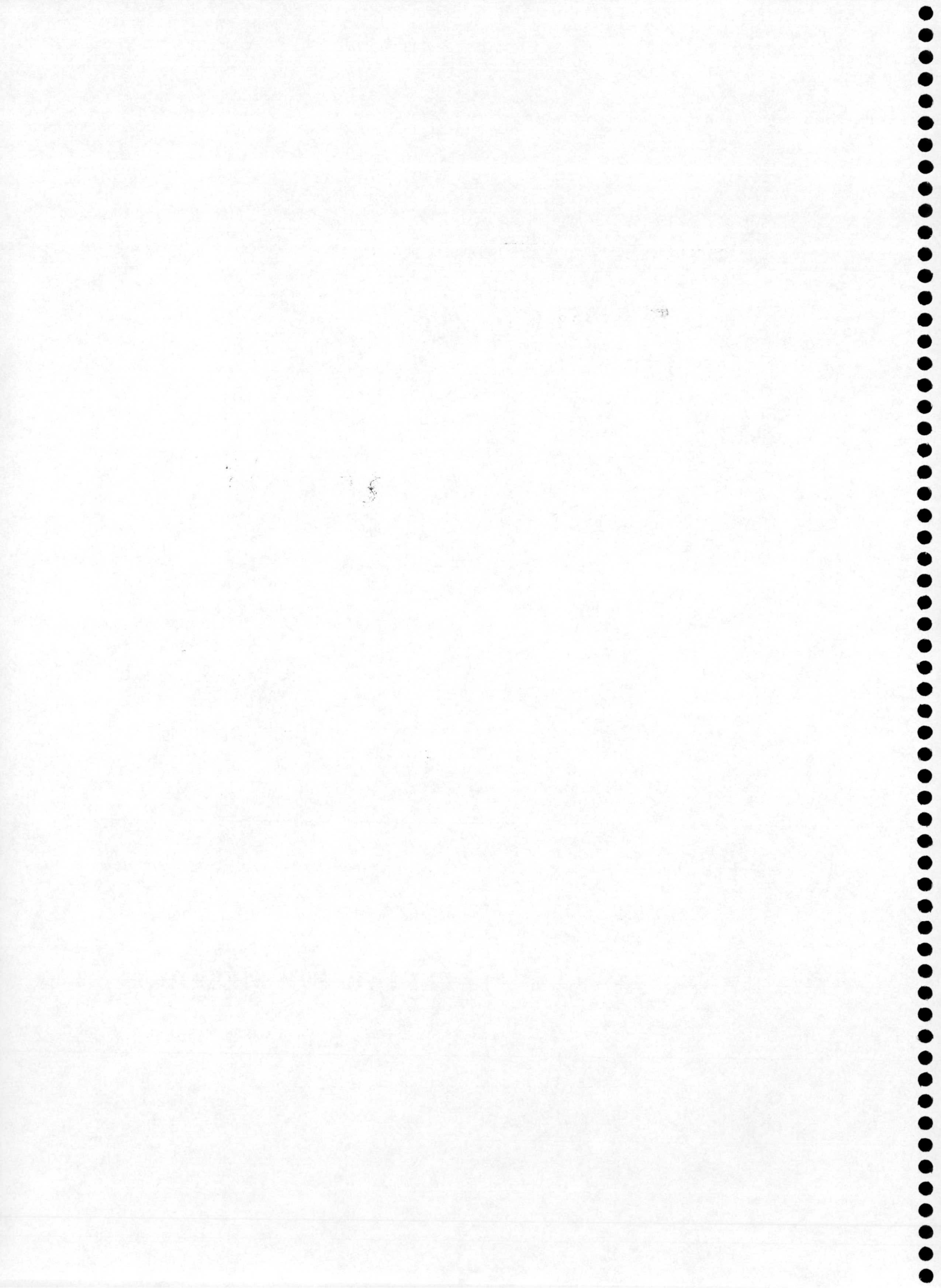
OBJETIVOS

En un trabajo anterior, Ramos-González y colaboradores (1992) generaron anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie de *P. putida* KT2440. Entre los distintos anticuerpos generados se obtuvo uno, denominado 7.5D, que reconocía una proteína de membrana de *P. putida*. Con el fin de identificar el antígeno con el que reaccionaba dicho anticuerpo, la cepa *P. putida* KT2440 se mutagenizó al azar con el transposón mini-Tn5*phoA* (Ramos-González, 1993). Entre más de 1.600 mutantes analizados, afectados en proteínas de la envoltura celular (fenotipo PhoA⁺) se obtuvo un clon, denominado *P. putida* 14G3, que no expresaba el producto reconocido por el monoclonal 7.5D. Continuando con esta línea de trabajo, en el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Clonación del gen responsable de este defecto y determinación de su función celular, junto con la caracterización fenotípica de la cepa mutante *Pseudomonas putida* 14G3, afectada en la expresión de dicha proteína de membrana.
2. Determinación de la secuencia y de la organización génica de las regiones de ADN adyacentes al gen mutado.
3. Construcción de una cepa mutante de *Pseudomonas putida* afectada a nivel del lipopolisacárido de la membrana externa.
4. Estudio de las consecuencias que tienen las mutaciones de membrana antes mencionadas, sobre la supervivencia de *Pseudomonas putida* en condiciones que simulan su hábitat natural.



MATERIALES Y MÉTODOS



1. CEPAS BACTERIANAS Y SU CONSERVACIÓN

Las estirpes utilizadas en este trabajo, junto con su genotipo o sus características fenotípicas más relevantes, se recogen en la Tabla 1. Las cepas se conservaron a corto plazo a 4°C, en cultivos en estría sobre placas de medio sólido, y a largo plazo a -80°C, en cultivos líquidos mezclados en proporción 1:1 con glicerol al 80% (v/v).

TABLA 1. Estirpes bacterianas

Estirpe	Genotipo/Características	Referencia/Fuente
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>gyrA96</i> (Nal ^R) <i>relA1 thi</i> $\Delta(lac-proAB)$ F' [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ</i> Δ M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
DH5 α	<i>supE44</i> $\Delta lacU169$ ($\phi 80 lacZ$ Δ M15) <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal ^R) <i>thi-1 relA1</i>	Hanahan (1983)
CC118	$\Delta(ara-leu)$ <i>araD</i> $\Delta lacX74$ <i>galE galK phoA20 thi-1 rpsE</i> (Sp ^R) <i>rpoB</i> (Rif ^R) <i>argE recA1</i>	Manoil y Beckwith (1985)
CC118 λ pir	CC118 lisogenizada con el fago λ pir	Herrero <i>et al.</i> (1990)
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>xyl-5 mtl-1</i>	Boyer y Roulland-Dussoix (1969)
BMH71-18 <i>mutS</i>	<i>supE thi</i> $\Delta(lac-proAB)$ <i>mutS::Tn10</i> (Tc ^R) F' [<i>proAB⁺ lacI^q lacZ</i> Δ M15]	Promega, ref. Q6321
1292	<i>supE hsdS met gal lacY fhuA</i>	W. Wood
JC7782	1292 <i>tolA</i> (parada después del codón 40)	J. C. Lazzaroni
JC7752	1292 <i>tolB</i> (parada después del codón 363) Δpal	Bouveret <i>et al.</i> (1995)
JC3417	1292 <i>tolB</i> (parada después del codón 329)	Isnard <i>et al.</i> (1994) Lazzaroni <i>et al.</i> (1989)
JC8031	1292 $\Delta tolRA$	Derouiche <i>et al.</i> (1995)
GM1	<i>ara</i> $\Delta(lac-pro)$ <i>thi</i> / F' [<i>lac-pro</i>]	D. Steege
TPS13	GM1 <i>tolQ</i> (parada después del codón 36)	Sun y Webster (1986, 1987)
TPS300	GM1 <i>tolR::Cm</i>	Sun y Webster (1987)

(Cont.)

(Cont.)

Pseudomonas

<i>P. putida</i> KT2440	<i>hsdR1</i>	Franklin <i>et al.</i> (1981)
<i>P. putida</i> KT2442	<i>P. putida</i> KT2440 Rif ^R	Franklin <i>et al.</i> (1981)
<i>P. putida</i> DOT-T1	Cepa que tolera hasta 90% (v/v) de tolueno	Ramos <i>et al.</i> (1995)
<i>P. putida</i> 29	Rif ^R	D. Springael
<i>P. putida</i> 43	Rif ^R	D. Springael
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>		A. Collmer
<i>P. stutzeri</i>	Nah ⁺	J. Lalucat
<i>P. aeruginosa</i> PAO1162	Km ^R	Colección EEZ
<i>P. fluorescens</i> 55		A. Collmer

Otras estirpes

<i>Brevundimonas diminuta</i>		CECT-313
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Km ^R	M. A. Schell
<i>Delftia acidovorans</i>	Km ^R	M. A. Schell

2. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Medios de cultivo

Como medio habitual de crecimiento se utilizó el medio Luria-Bertani (LB), que contiene 1% (p/v) de NaCl (Sambrook *et al.*, 1989). Cuando se indica, se utilizó medio LB líquido con una concentración de NaCl de 0,1% (p/v). Para el cultivo de cepas de *E. coli* en medio mínimo se utilizó medio M9 (Sambrook *et al.*, 1989) suplementado con glucosa al 0,5% (p/v) como fuente de carbono y con 0,05 mM de tiamina cuando fue necesario. Para el cultivo de cepas de *P. putida* en medio mínimo se usó medio M9 suplementado con una solución de micronutrientes (Abril *et al.*, 1989) y con 5 mM de benzoato sódico como única fuente de carbono.

Para la preparación de los medios sólidos se añadió bacto-agar (Difco, ref. 0140-01) a una concentración final de 1,5% (p/v). En la preparación de medio LB semisólido para los ensayos de movilidad bacteriana, se utilizó bacto-agar a una concentración final de 0,3% (p/v).

Los medios se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos a 120°C de temperatura y 1 atmósfera de presión, o por filtración a través de filtros estériles de acetato de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poro.

2.2. Condiciones de cultivo

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

2.3. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en H₂O_d concentrados 1.000 veces y se esterilizaron por filtración, excepto el cloramfenicol que se preparó en etanol absoluto, y la rifampicina y la tetraciclina que se disolvieron en metanol. Los antibióticos se usaron a las concentraciones finales siguientes (en µg/ml): ácido nalidíxico, 10; ampicilina, 100; cloramfenicol, 30; estreptomina, 50 ó 100; gentamicina, 10 (para *E. coli*) y 200 (para *P. putida*); kanamicina, 25 ó 50; piperacilina, 90; rifampicina, 10 ó 20; y tetraciclina, 20. Para los ensayos de resistencia/sensibilidad a antibióticos, éstos se suministraron en forma de disco (bioMérieux), en las siguientes cantidades (en µg/disco): ácido nalidíxico, 30; ampicilina, 10; cloramfenicol, 30; eritromicina, 15; estreptomina, 10; kanamicina, 30; neomicina, 30; piperacilina, 100; rifampicina, 30; tetraciclina, 30; y vancomicina, 30.

3. PLÁSMIDOS

En la Tabla 2 se muestran los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. Los plásmidos de nueva construcción se describirán en los apartados correspondientes de la sección *Resultados*. A continuación se describen con más detalle las características de los plásmidos mencionados en dicha tabla.

TABLA 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Características	Referencia/Fuente
pUC18	Ap ^R ; <i>oriColE1 rop⁻</i> , α-complementación	Norlander <i>et al.</i> (1983) GenBank: L08752
pJB3Km1	Ap ^R , Km ^R ; <i>oriV RK2, trfA, oriTRK2</i> , α-complementación	Blatny <i>et al.</i> (1997) GenBank: U75323
pALTER-1	Tc ^R ; <i>oriColE1, f1ori</i> , α-complementación	Promega, ref. Q6301 GenBank: X65334
pLAFR3	Tc ^R ; <i>cos, oriV RK2, oriTRK2</i> , α-complementación	Staskawicz <i>et al.</i> (1987)
pKNG101	Sm ^R ; <i>oriR6K, oriTRK2, sacB</i>	Kaniga <i>et al.</i> (1991)
pXYLE10	Km ^R ; porta un gen <i>xyle</i> sin promotor	Stein (1992)
pUCH218	Ap ^R ; pUC18 con un gen ' <i>phoA</i> sin péptido señal	Strom y Lory (1987)

(Cont.)

(Cont.)

pCNB5 (pUT/mini-Tn5 <i>lacI</i> ^q /P _{trc})	Ap ^R , Km ^R ; <i>ori</i> R6K, <i>ori</i> TRP4, plásmido para la donación del mini-Tn5 <i>lacI</i> ^q /P _{trc}	de Lorenzo <i>et al.</i> (1993)
pUT/mini-Tn5 <i>phoA</i>	Ap ^R , Km ^R ; <i>ori</i> R6K, <i>ori</i> TRP4, plásmido para la donación del mini-Tn5 <i>phoA</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> (1990)
pCK220 (pUT/mini-Tn5 <i>luxAB</i> Km)	Ap ^R , Km ^R ; <i>ori</i> R6K, <i>ori</i> TRP4, plásmido para la donación del mini-Tn5 <i>luxAB</i> Km	C. Sternberg
pBPAlI	Tc ^R ; derivado de pBR328 con <i>orf1</i> , <i>tolQ</i> , <i>tolR</i> , <i>tolA</i> , <i>tolB</i> y <i>pal</i> de <i>E. coli</i>	C. Lazdunski
pBBR1MCS-5	Gm ^R ; <i>ori</i> TRK2, α-complementación	Kovach <i>et al.</i> (1995) GenBank: U25061
pRK600	Cm ^R ; <i>ori</i> ColE1, <i>mob</i> RK2, <i>tra</i> RK2	Kessler <i>et al.</i> (1992)

pUC18: vector de clonación de 2.686 pb que combina fragmentos de pBR322 y de vectores de la serie M13mp (Fig. 10). Carece del gen *rop* implicado en el control del número de copias de plásmidos que contienen el origen de replicación de ColE1, y como consecuencia, presenta un alto número de copias (más de 700) por célula. Confiere resistencia a ampicilina, y posee un sitio de clonación múltiple (MCS) dentro de la región que codifica el péptido α de LacZ. Esto posibilita una fácil selección de los plásmidos recombinantes en cepas que permitan α-complementación, es decir, aquellas portadoras de la delección *lacZ*ΔM15 (por ejemplo JM109, DH5α, etc.). Aquellos clones que porten un plásmido con inserto, formarán colonias de color blanco (en contraposición al color azul de los clones sin inserto) en medio LB sólido suplementado con ampicilina y con 25 μg/ml del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal). Si el plásmido se transforma en una cepa *lacI*⁺, es necesario añadir, además, 130 μM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG).

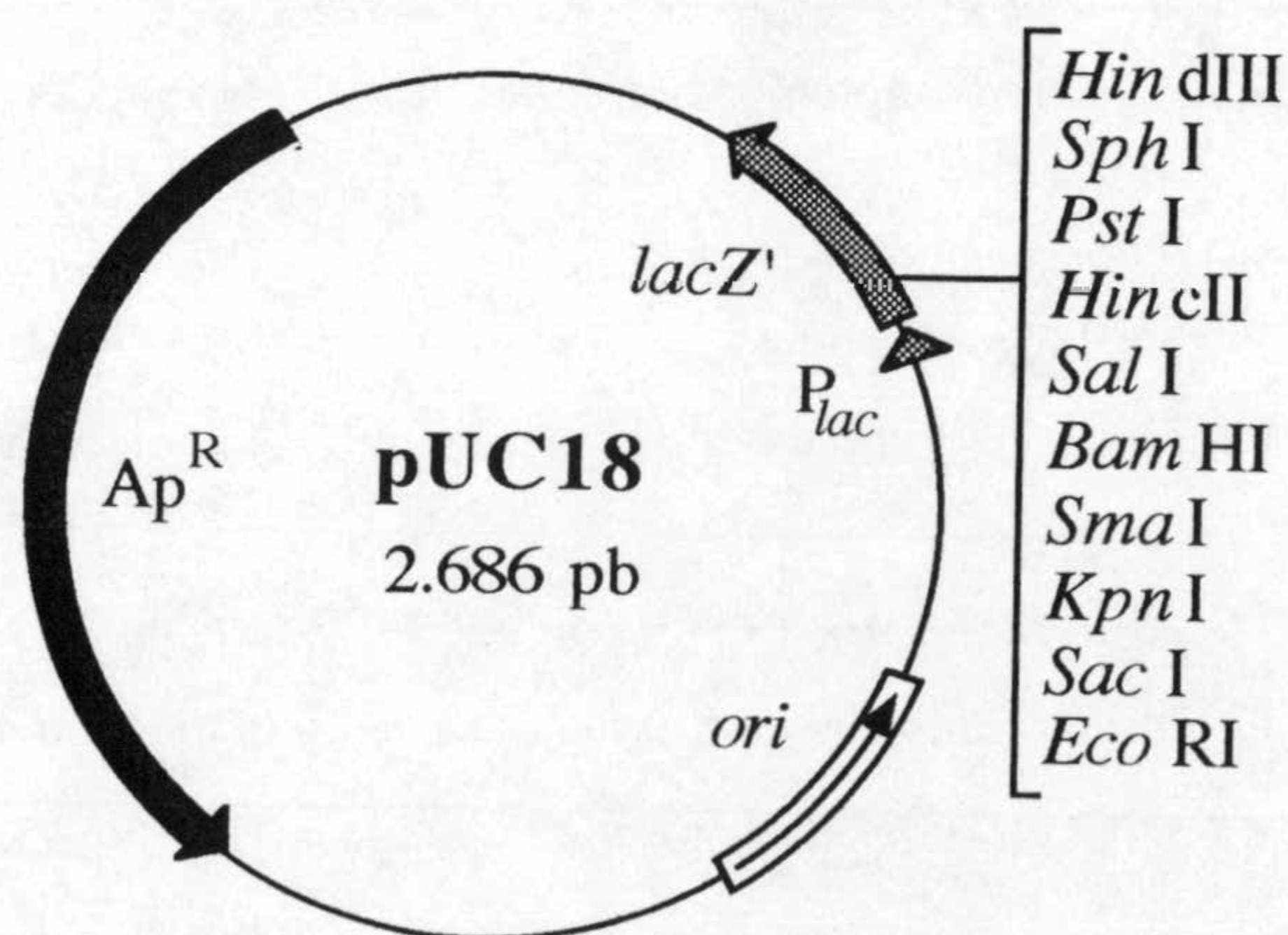


FIGURA 10. Plásmido pUC18. Los sitios de restricción indicados son únicos y están localizados en el MCS dentro del gen *lacZ'*. También se muestra la localización del origen de replicación (*ori*), y del gen de resistencia a ampicilina. Las flechas indican el sentido de la replicación o de la transcripción de los genes.

pJB3Km1: plásmido de 6.052 pb de amplio espectro de huésped, derivado de RK2 (Fig. 11). Posee el MCS y las regiones *lac* de pUC19 que permiten la α -complementación. Su número de copias en *E. coli* es de aproximadamente 5-7 por cromosoma. Además, posee el gen *trfA* que codifica una proteína esencial para la iniciación de la replicación a partir del *oriV* de RK2. Se sabe que ciertas mutaciones puntuales en este gen producen un aumento del número de copias del plásmido en la célula (hasta 24 veces). Este plásmido posee el origen de transferencia de RK2, lo cual permite su transferencia cuando se aportan las funciones de movilización en *trans*. pJB3Km1 confiere resistencia a ampicilina y a kanamicina.

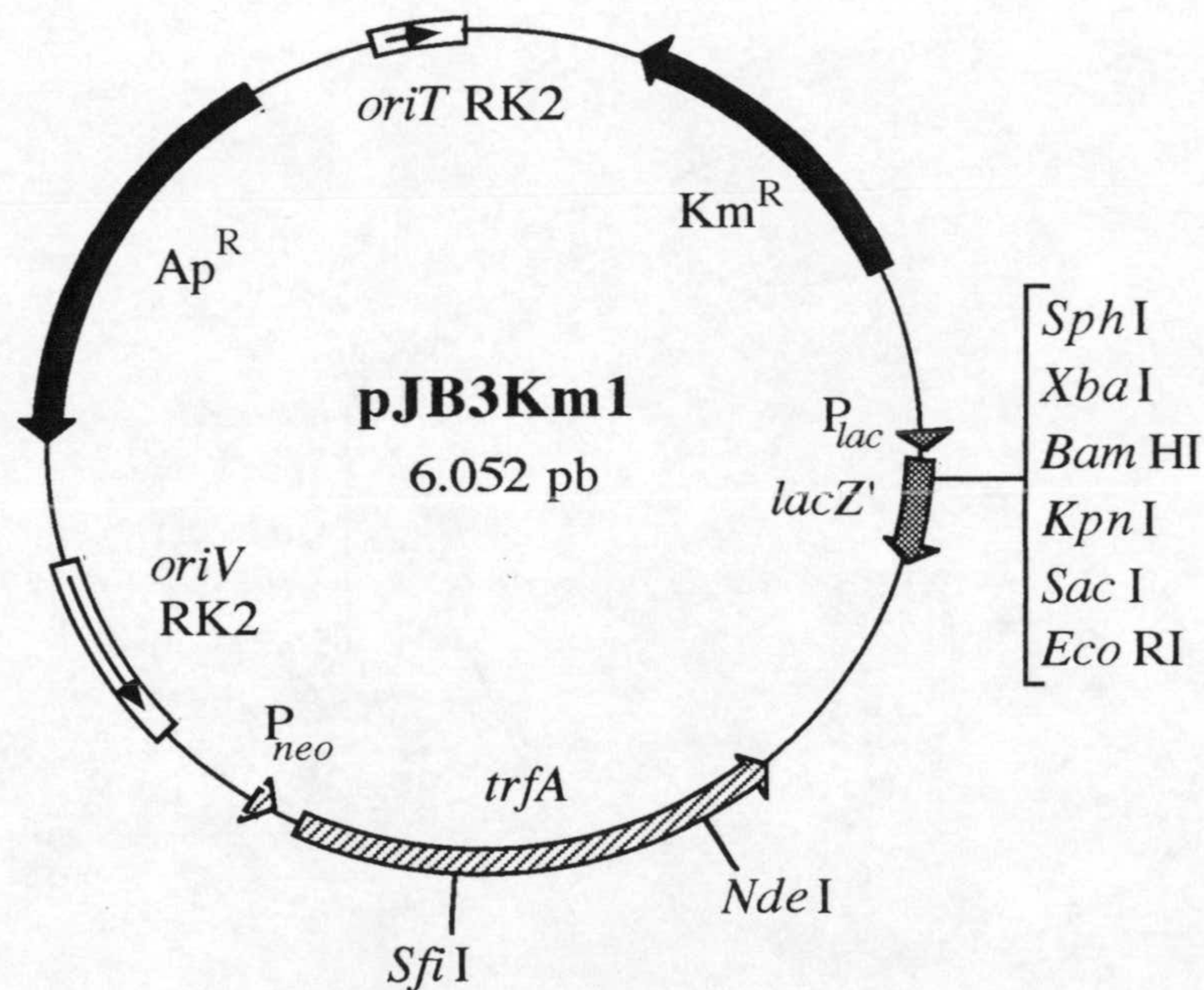


FIGURA 11. Plásmido pJB3Km1. Los sitios de restricción indicados son únicos y están localizados en el MCS dentro del gen *lacZ'*. También se muestra la localización del origen de replicación (*oriV*RK2), del origen de transferencia (*oriT*RK2), de los genes de resistencia a ampicilina y a kanamicina, y del gen *trfA* que se expresa desde el promotor constitutivo P_{neo}. Las flechas indican el sentido de la replicación, de la transferencia o de la transcripción de los genes.

pALTER-1: plásmido de 5.680 pb diseñado para mutagénesis dirigida *in vitro* utilizando cadena sencilla y oligonucleótidos mutagénicos. Contiene el origen de replicación del fago f1, las regiones *lac* que permiten la α -complementación, y un MCS tipo pUC19 flanqueado por los promotores de los fagos T7 y SP6. El plásmido confiere resistencia a tetraciclina, y porta además un gen de resistencia a ampicilina mutado. Este gen se repara mediante el uso del oligonucleótido adecuado, en la misma reacción en la que se muta el inserto clonado, transformándose las cepas que llevan el plásmido en resistentes a ampicilina.

pLAFR3: cósmido derivado de pLAFR1 (Friedman *et al.*, 1982) que posee el fragmento *Hae*II de 454 pb de pUC8 (Vieira y Messing, 1982) conteniendo el MCS y las regiones *lac* que permiten la α -complementación (Fig. 12). Posee los sitios *cos* del fago lambda necesarios para el empaquetamiento de ADN dentro de la cápsida de dicho fago. Sólo los cósmidos recombinantes con un tamaño total entre 36 y 51 kb son susceptibles de ser empaquetados *in vitro*. Este plásmido se utilizó para construir genotecas de *P. putida*.

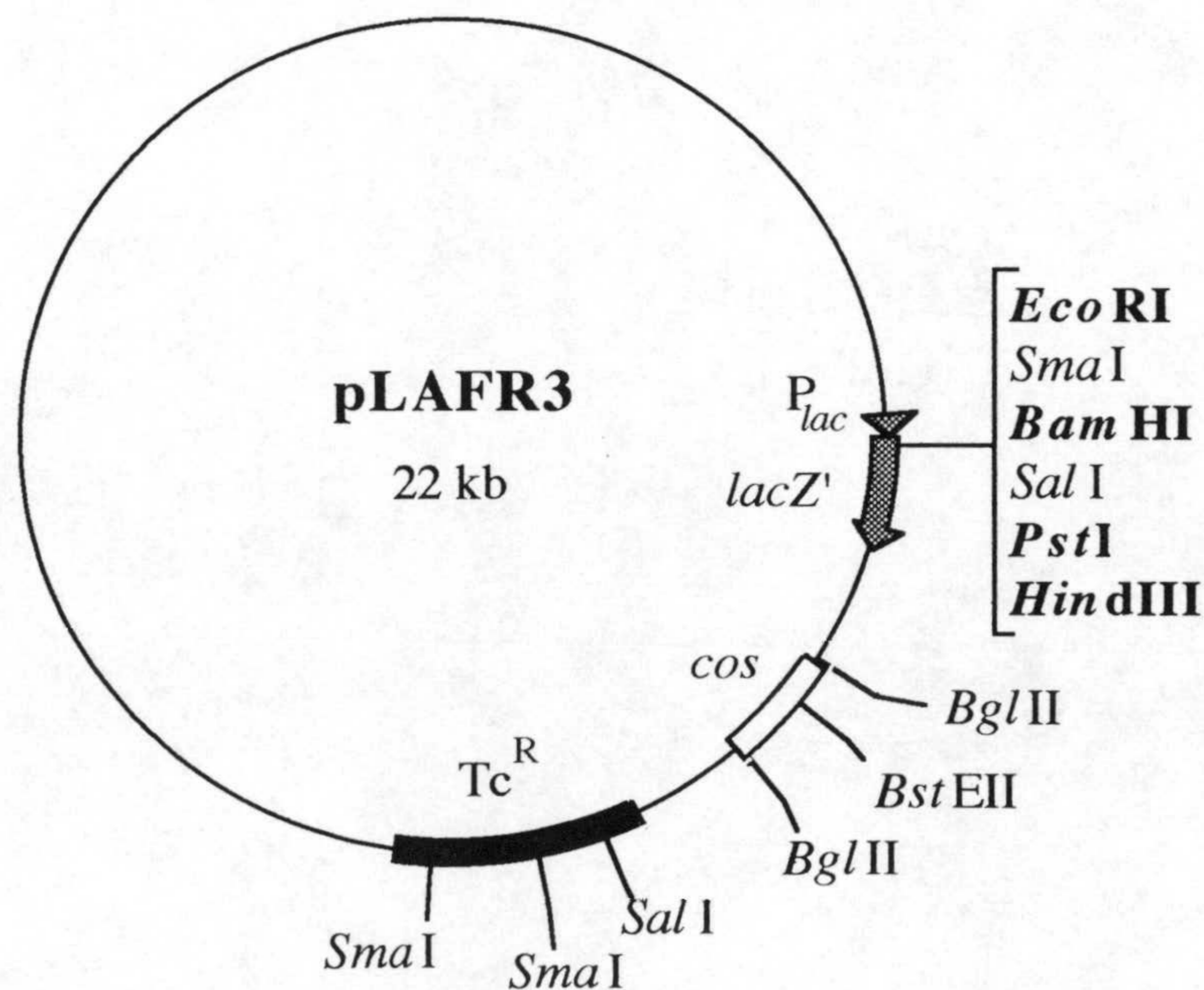


FIGURA 12. Cósmido pLAFR3. En el mapa se muestran los sitios de restricción más relevantes. En negrita se indican los sitios del MCS que son únicos en el plásmido. Se muestra además la posición del gen de resistencia a tetraciclina y de los sitios *cos*. También se indica la posición el gen *lacZ'* que se encuentra bajo el control del promotor P_{lac} (el sentido de la transcripción viene indicado por la flecha).

pKNG101: plásmido suicida utilizado en experimentos de intercambio alélico que permite la selección positiva de eventos de doble recombinación en bacterias gram negativas. Posee el origen de replicación del plásmido R6K (Fig. 13), que es dependiente de la proteína π codificada por el gen *pir* y, por tanto, sólo se mantiene en bacterias que producen dicha proteína (por ejemplo, *E. coli* CC118 λ *pir*). Presenta el origen de transferencia de RK2, lo que permite transferirlo a otras bacterias si se aportan las funciones de movilización en *trans*. Posee los genes *strA* y *strB* de resistencia a estreptomycin, que sirven como marcador de selección de la integración del vector en el cromosoma de la bacteria huésped. Su característica más relevante es que porta el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* como marcador contraseleccionable, lo que permite seleccionar positivamente la escisión del vector del cromosoma. Este gen, codifica una levano-sacarasa que cataliza la hidrólisis de sacarosa así como la síntesis de levanos que, en bacterias gram negativas, se acumulan en el periplasma y producen la muerte celular cuando la concentración de sacarosa es mayor o igual al 5% (p/v).

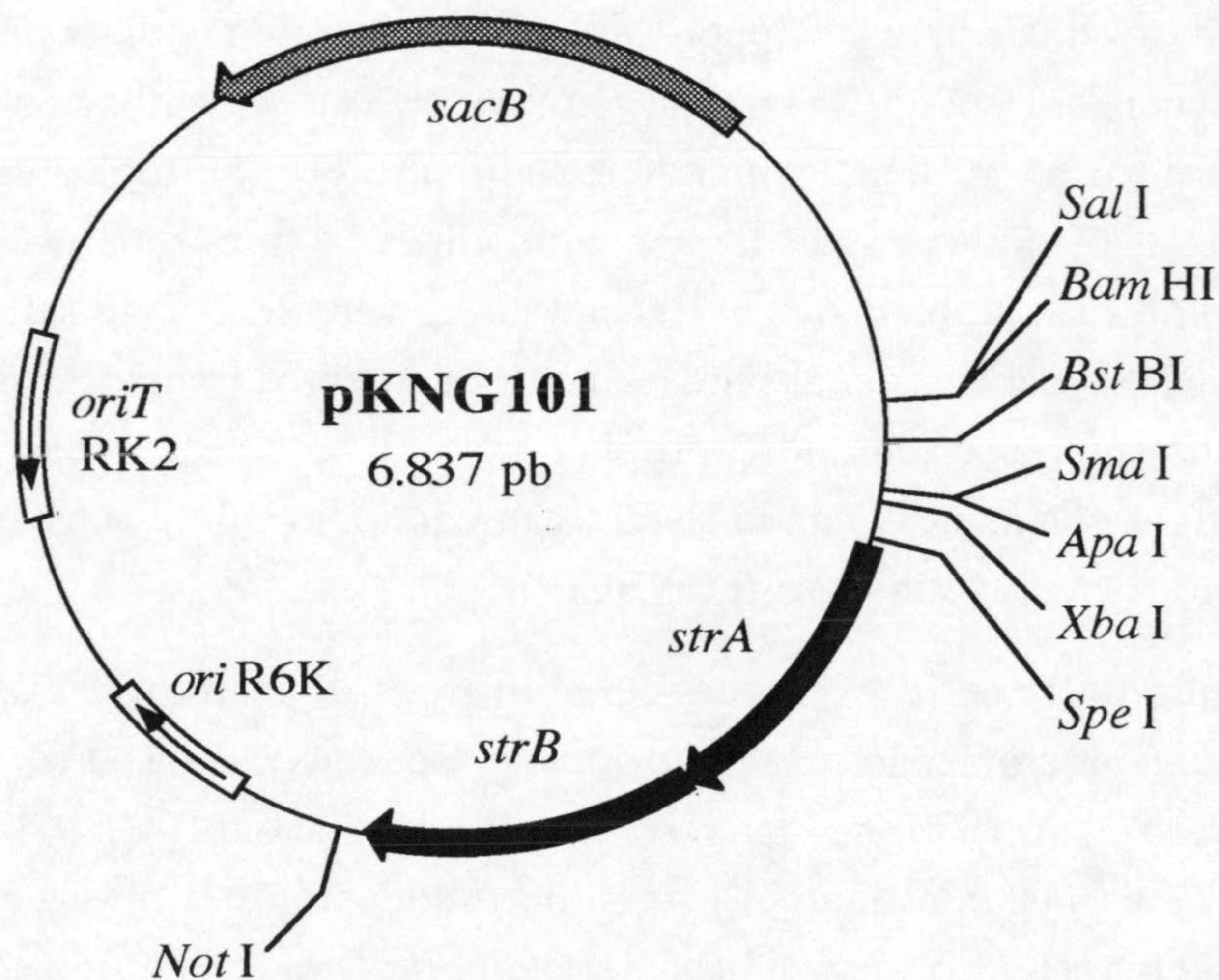


FIGURA 13. Plásmido pKNG101. Los sitios de restricción para las enzimas que se indican son únicos. Se muestra además la localización del origen de replicación (*oriR6K*), del origen de transferencia (*oriTRK2*), de los genes de resistencia a estreptomycin (*strA* y *strB*) y del gen que codifica la levano-sacarasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*. Las flechas indican el sentido de la replicación, de la transferencia o de la transcripción de los genes.

pXYLE10: plásmido de 3,65 kb que confiere resistencia a kanamicina y que porta el gen *xylE* del plásmido TOL (pWW0) de *P. putida*. Este gen lleva un sitio de unión al ribosoma mejorado, pero carece de promotor y de señales de terminación de la transcripción corriente abajo. El casete *xylE* (de 1 kb) de pXYLE10 ha sido diseñado para ser utilizado como un gen indicador, y se puede escindir fácilmente gracias a los sitios de restricción flanqueantes que posee (*EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI* y *BamHI* en el extremo 5', y *SmaI*, *PstI*, *SphI* y *HindIII* en el extremo 3'). El producto del gen *xylE*, la catecol-2,3-dioxigenasa (C23O), convierte el catecol en un producto de color amarillo brillante, el semialdehído del ácido 2-hidroximucónico. Las colonias (C23O⁺) que llevan fusiones transcripcionales con el gen *xylE* se tornan amarillas después de ser rociadas con una solución de catecol 0,1 M en tampón fosfato 50 mM pH 7,5.

pUCH218: plásmido derivado de pUC18 que contiene un fragmento de 2,4 kb que porta el gen que codifica la fosfatasa alcalina de *E. coli* desprovisto de su secuencia señal ('*phoA* ') (Fig. 14). Delante de '*phoA*' se encuentra parte del MCS original de pUC18, lo que facilita la construcción de fusiones traduccionales con '*phoA*'. Este plásmido se utiliza en el análisis de proteínas de membrana. La fosfatasa alcalina de *E. coli* es un homodímero que posee dos puentes disulfuro intramoleculares en cada monómero, que son esenciales para que la enzima se pliegue en su conformación activa. Estos puentes disulfuro no se pueden formar habitualmente en el citoplasma, y en consecuencia la proteína se vuelve activa sólo cuando se exporta a través de la membrana interna celular. Esta propiedad convierte a PhoA en un sensor de señales de exportación de proteínas (secuencias señal procesables y segmentos transmembrana de proteínas de membrana interna orientados apropiadamente). Los clones que portan fusiones con PhoA activas son azules cuando se cultivan en medio sólido suplementado con 0,1 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP).

pCNB5: plásmido de la serie pUT que lleva un transposón mini-Tn5lacI^q/P_{trc} (Fig. 15). El sistema donador empleado para todos los transposones mini-Tn5 se basa en el plásmido pUT (Herrero *et al.*, 1990), un derivado del plásmido suicida pGP704 (Miller y Mekalanos, 1988). Este plásmido tiene el origen de replicación del plásmido R6K (dependiente de la proteína π), el origen de transferencia, *oriT*, del plásmido RP4 (es transferible si se aportan las funciones de movilización en *trans*) y lleva el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia a una gran variedad de antibióticos β -lactámicos incluyendo piperacilina. pUT lleva además el gen que codifica la transposasa de IS50_R, necesaria para la transposición de los elementos mini-Tn5. Durante la transposición la transposasa corta el ADN diana dejando una duplicación directa de 9 pb a cada lado de los extremos del mini-Tn5. Estos elementos transponibles, delimitados por 19 pb de los

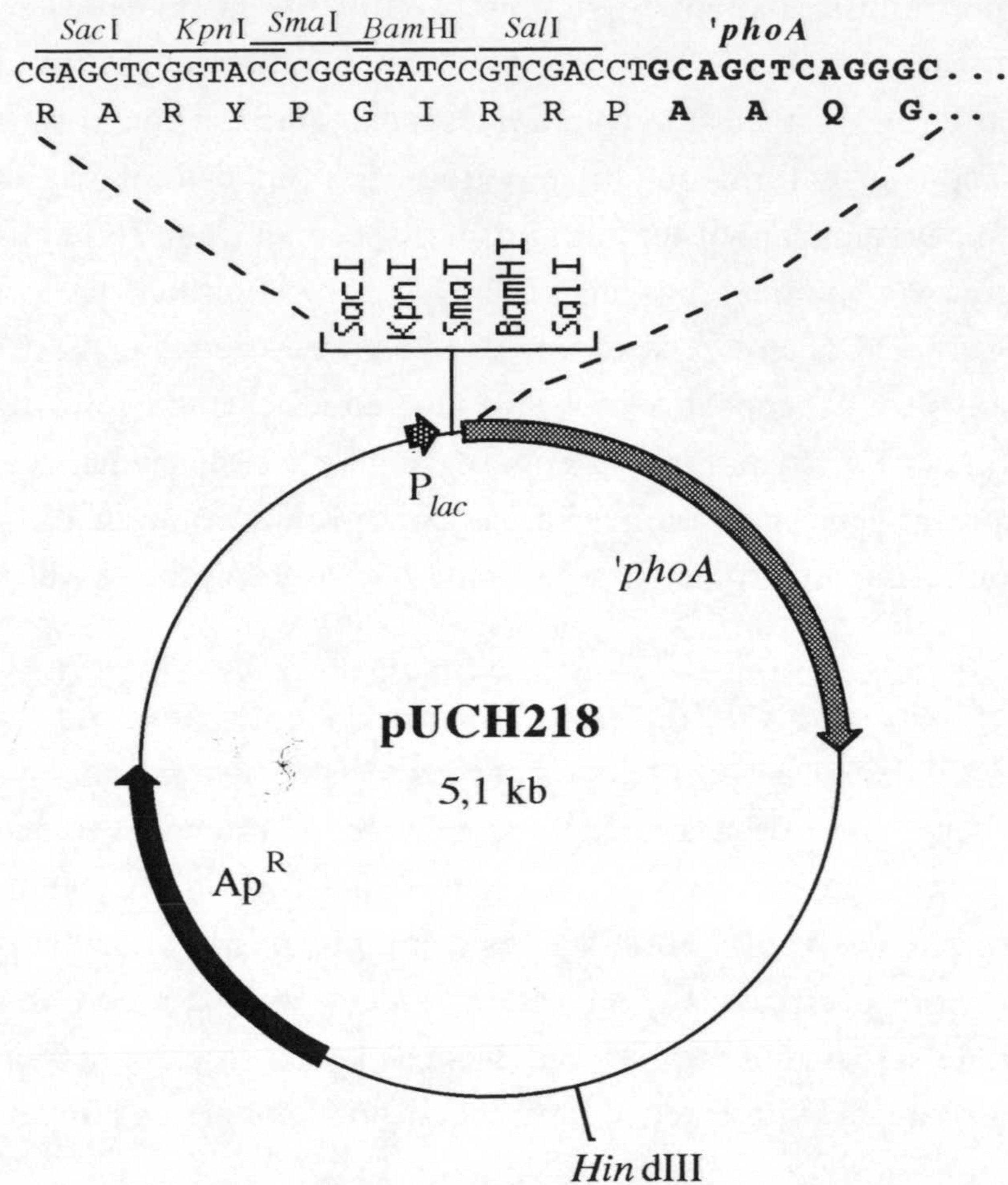


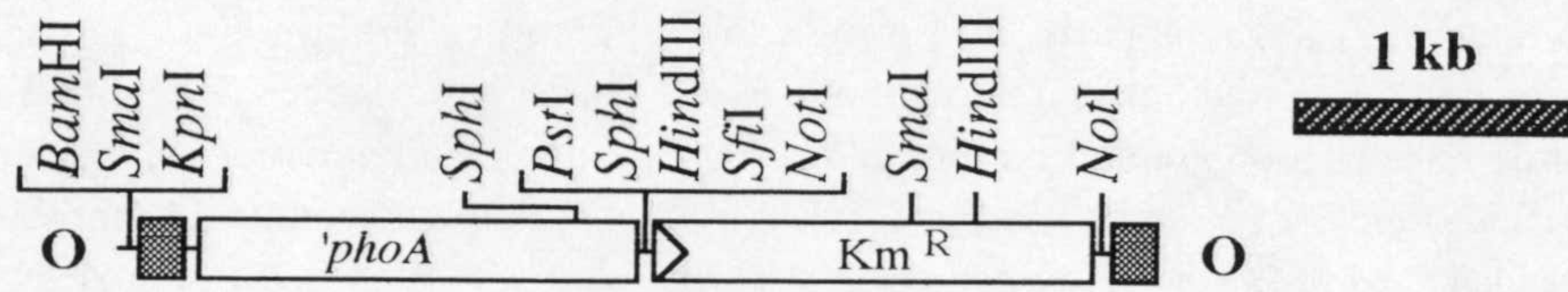
FIGURA 14. Plásmido pUCH218. Los sitios de restricción para las enzimas que se indican son únicos. Se señalan además el gen de resistencia a ampicilina y el gen que codifica la fosfatasa alcalina de *E. coli* carente de secuencia señal ('*phoA*), que se encuentra bajo el control del promotor *P_{lac}*. Se muestra en detalle la secuencia de nucleótidos (5'→3') del MCS y del principio de '*phoA* (en negrita), así como la secuencia de aminoácidos a que da lugar la lectura de los correspondientes codones (cada aminoácido se indica debajo de la base central del codón que lo codifica). Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes.

extremos I y O de Tn5, poseen como característica común un gen marcador seleccionable y un sitio de restricción único, *NotI* o *SfiI*, que facilita la clonación de ADN heterólogo para su posterior inserción en el cromosoma o en otro replicón de la bacteria elegida. Además, se han eliminado secuencias no esenciales (como el gen *inh*, que codifica un inhibidor de la transposición), reduciendo así considerablemente su tamaño. Como consecuencia, una misma cepa puede usarse repetidas veces como receptora de distintas transposiciones siempre que se utilicen mini-Tn5 con marcadores de selección diferentes. Por otra parte, el gen que codifica la transposasa se encuentra fuera de los extremos del

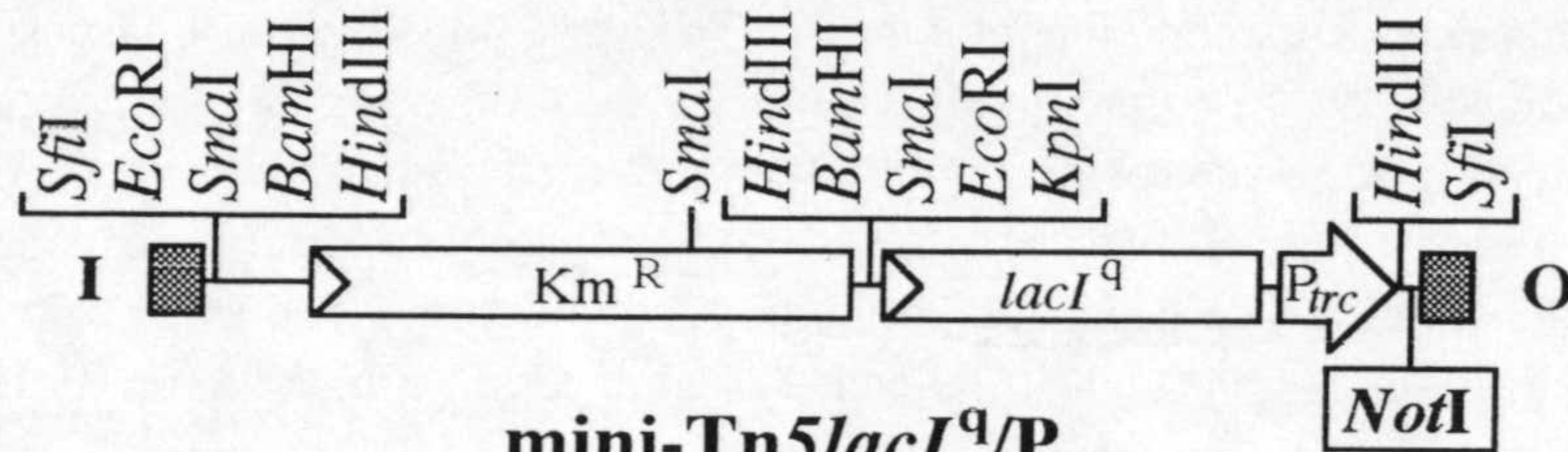
minitransposón y, por tanto, no se moviliza con éste durante la transposición. Como resultado, las inserciones resultantes son muy estables. Además, como la transposasa actúa preferentemente en *cis*, incluso si la célula huésped adquiriese con posterioridad, o ya portase, un transposón natural del mismo tipo, éste no estimularía una nueva transposición del elemento mini-Tn5 insertado. Los transposones de la serie mini-Tn5 se pueden usar para generar mutantes por inserción al azar o también para introducir secuencias heterólogas de ADN en el cromosoma de una gran variedad de bacterias gram negativas. Para este último propósito se ha usado, en este trabajo, el transposón mini-Tn5*lacI^q/P_{trc}* (Fig. 15). Este minitransposón, que confiere resistencia a kanamicina, permite clonar y expresar genes heterólogos bajo el control del promotor P_{trc}. Además, porta el gen *lacI^q* con lo que la expresión a partir de dicho promotor se puede inducir añadiendo IPTG.

pUT/mini-Tn5*phoA*: plásmido de la serie pUT que lleva un transposón mini-Tn5*phoA* (Fig. 15). Este transposón, que codifica resistencia a kanamicina, porta el gen *phoA* de *E. coli* desprovisto de su secuencia señal, apto para fusiones traduccionales. Se usa en bacteria gram negativas para detectar genes que codifican proteínas que se exportan (ver comentarios para pUCH218). Tras la mutagénesis, la selección de los clones que portan fusiones activas debe hacerse en medio con suficiente fosfato para reprimir la expresión de la fosfatasa alcalina endógena de la cepa receptora (por ejemplo, en medio LB). Esta estrategia evita el tener que generar previamente una mutación *phoA* en la cepa diana.

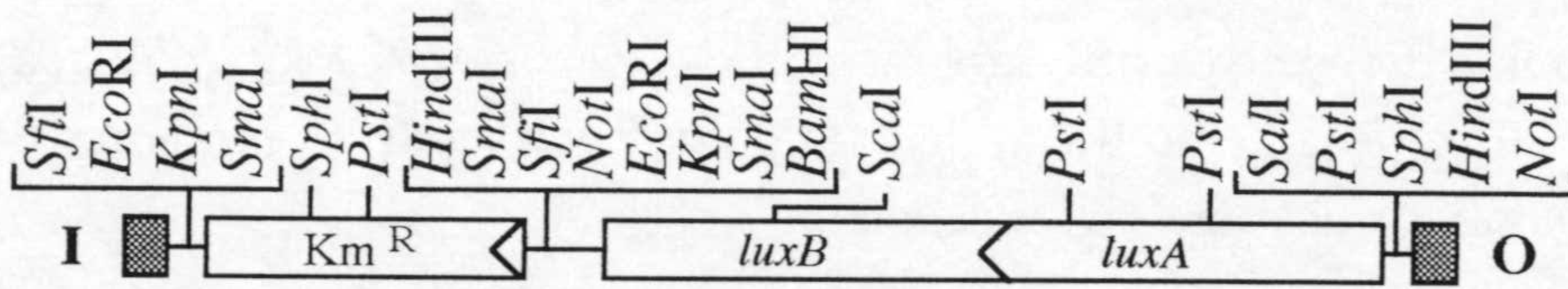
pCK220: plásmido de la serie pUT que lleva un transposón mini-Tn5*luxABKm* (Fig. 15). Este minitransposón es un derivado del mini-Tn5*luxAB* construido por de Lorenzo *et al.* (1990) en el cual se ha reemplazado el gen original de resistencia a tetraciclina por un gen de resistencia a kanamicina. También lleva los genes *luxAB* desprovistos de promotor. Estos genes codifican las subunidades α y β , respectivamente, de la luciferasa de *Vibrio harveyi*. Este elemento permite, mediante fusiones transcripcionales, detectar y cuantificar la actividad de promotores bajo los cuáles se inserte la unidad móvil. Los clones que portan fusiones activas se pueden detectar porque emiten una luz verdeazulada (con un máximo de emisión a una longitud de onda de 490 nm) en presencia de oxígeno molecular y de un aldehído saturado de cadena larga que contenga más de 8 átomos de carbono (por ejemplo, *n*-decil aldehído). Para ello, las colonias se incuban en presencia de 25 μ l de *n*-decil aldehído (extendidos sobre la cara interna de la tapa de una placa de cultivo), y la emisión de luz se recoge, tras 5 min de exposición, sobre una película "Hyperfilm-MP" (Amersham, ref. RPN 8).



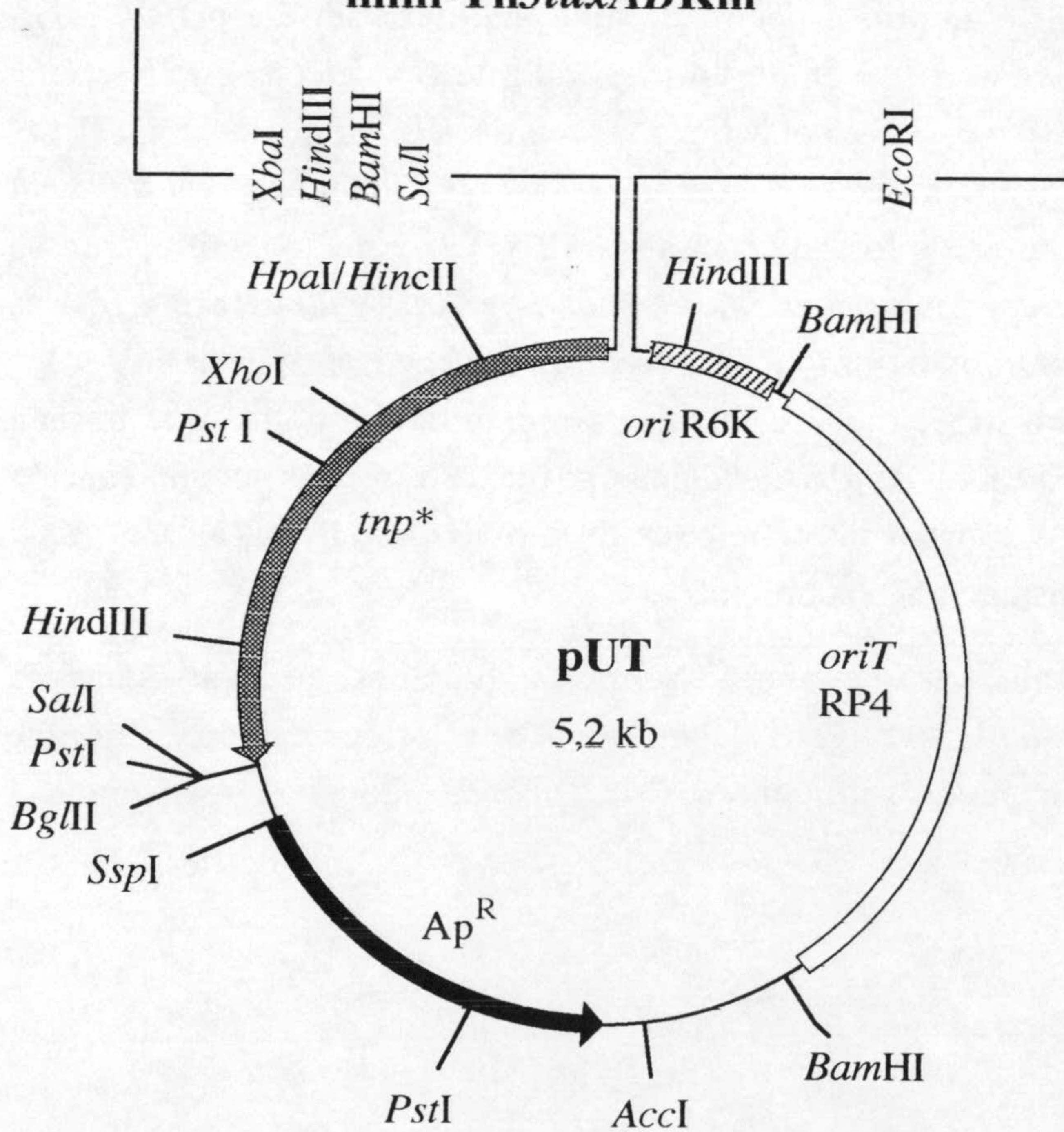
mini-Tn5phoA



mini-Tn5lacI^q/P_{trc}



mini-Tn5luxABKm



(Ver leyenda en la página siguiente)

FIGURA 15. Plásmidos de la serie pUT. El plásmido pUT, que funciona como donador de los elementos mini-Tn5, se muestra en la parte inferior de la figura, y es común para las tres construcciones. En el mapa se indican los sitios de restricción más relevantes, los orígenes de replicación y de transferencia, el gen de resistencia a ampicilina y el gen *tnp**. Este gen es un derivado de *tnp* (que codifica la transposasa de IS50_R) en el cual se ha eliminado un sitio *NotI* interno. Las unidades móviles que se muestran están clonadas en el pUT como fragmentos *XbaI-EcoRI*. Ambos sitios son externos a los extremos del minitransposón (indicados como I y O), y no son transportados con éste durante el evento de transposición. En el caso del mini-Tn5*phoA* los sitios *BamHI*, *SmaI* y *KpnI*, que se encuentran delante del gen '*phoA*, también están situados fuera del elemento móvil. Este minitransposón tiene además la peculiaridad de estar flanqueado, debido a cuestiones de su construcción, por dos extremos O. Con respecto a la procedencia de los genes de resistencia a kanamicina, el del mini-Tn5*phoA* proviene del transposón Tn903 y los otros dos del transposón Tn5. NOTA: Que un sitio de restricción mostrado en el mapa del pUT no se indique en el mapa de los minitransposones no implica que no pueda estar, y viceversa. En cambio, el sitio *NotI* recuadrado dentro del mini-Tn5*lacI^q/P_{trc}* sí es único, tanto en el minitransposón como en el pUT. Este sitio permite la clonación de genes que, orientados adecuadamente, quedan bajo el control del promotor P_{trc} (un híbrido *trp-lac*). Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes.

pBPAn: plásmido derivado de pBR328 que porta los genes *orf1*, *tolQ*, *tolR*, *tolA*, *tolB* y *pal* de *E. coli*. Este fragmento lleva, delante de *orf1*, el supuesto promotor del operón. El plásmido confiere resistencia a tetraciclina.

pBBR1MCS-5: plásmido de 4.768 pb de medio número de copias (30-40 copias/célula en *E. coli*) y de amplio espectro de huésped, derivado de pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994) derivado a su vez de un plásmido de *Bordetella bronchiseptica* (Antoine y Loch, 1992) (Fig. 16). Posee el MCS y las regiones *lac* de pBluescript II KS (Stratagene, ref. 212207) que permiten la α -complementación. Flanqueando al MCS, el plásmido posee los promotores de los bacteriófagos T3 y T7. Este plásmido, que se replica en bacterias del género *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* entre otros, es compatible con otros plásmidos de amplio espectro de huésped pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncP, IncW e IncQ, y también con aquellos que poseen orígenes de replicación de ColE1 o de p15A. Además, se puede transferir por conjugación a otras bacterias cuando se aportan las funciones de movilización de RK2 en *trans*. pBBR1MCS-5 confiere resistencia a gentamicina.

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

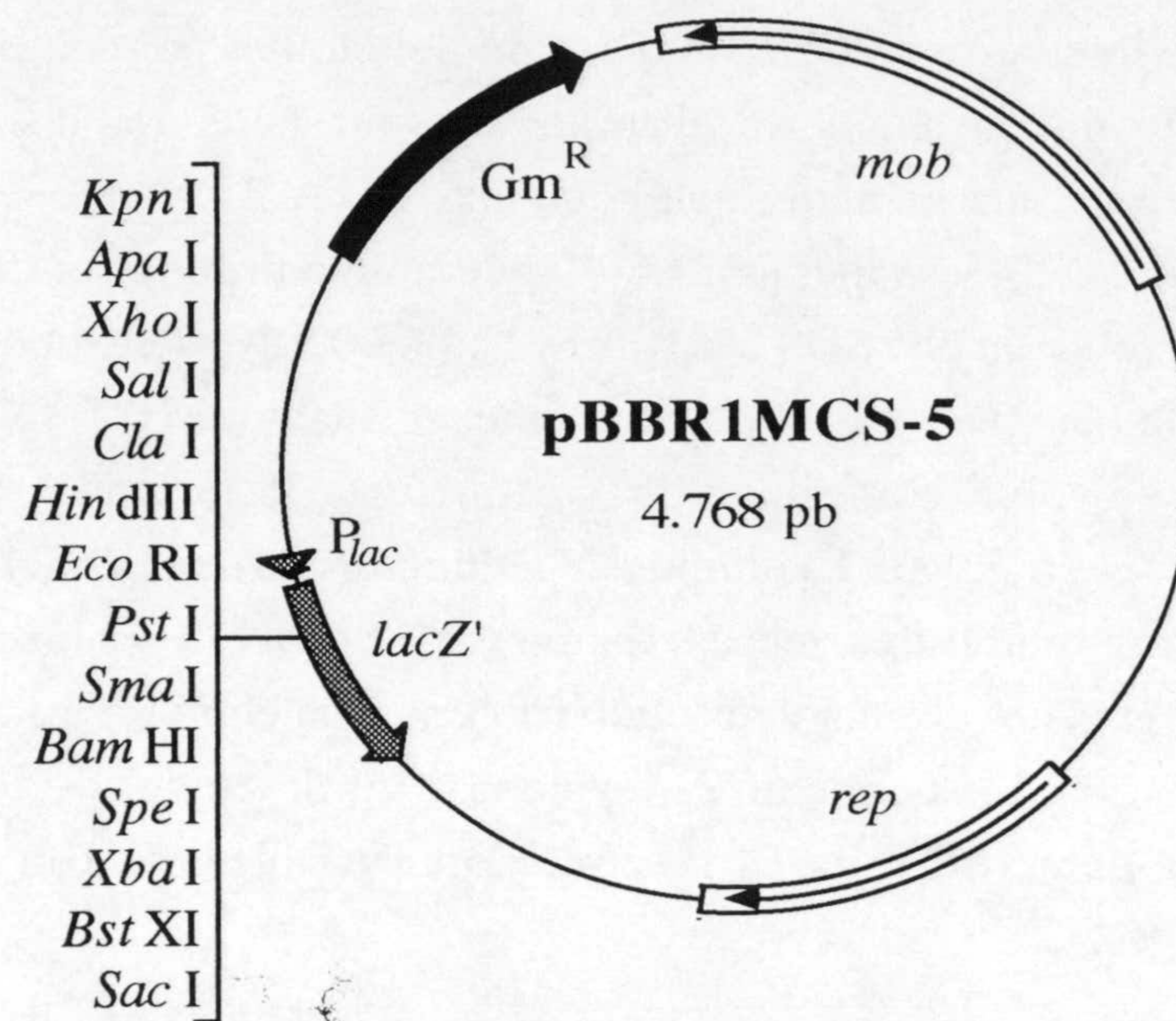


FIGURA 16. Plásmido pBBR1MCS-5. Los sitios de restricción indicados son únicos y están localizados en el MCS dentro del gen *lacZ'*. Se muestra la localización del gen *rep*, que codifica una proteína esencial para la replicación, del gen *mob*, que codifica una proteína esencial para la movilización por conjugación, y del gen de resistencia a gentamicina. Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes.

4. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron distintos métodos según el grado de pureza requerido en su uso posterior. En todos los casos, la cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó con agitación durante 10-14 horas a su temperatura óptima en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Para la obtención de ADN plasmídico de alta pureza, para su uso posterior en reacciones de secuenciación y/o clonación, se utilizó el sistema comercial "QIAprep-spin Plasmid Kit" (QIAGEN, ref. 27104) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la comprobación de plásmidos de nueva construcción por análisis de restricción, éstos se aislaron por el método de la lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989).

5. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL

Para la preparación de ADN total se utilizó una modificación del método descrito por Kado y Liu (1981). Brevemente, las células se cultivaron con agitación durante 10-14

horas en medio LB, tras lo cual se recogieron 0,5-1 ml del cultivo por centrifugación a 17.000 x g durante 1 min. Después de eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 400 µl de una solución que contenía EDTA 25 mM, sacarosa 20% (p/v) y Tris-HCl 25 mM pH 8,0, y se incubaron a 4°C durante 5 min. A continuación, se añadieron 200 µl de una solución con SDS 2% (p/v) y NaOH 0,3 N, y el tubo se mezcló por inversión hasta que la lisis fue total. Posteriormente, se añadieron 0,1 volúmenes de MgCl₂ 0,1 M y el tubo se volvió a mezclar. Tras centrifugar la mezcla a 17.000 x g durante 10 min, el ADN se extrajo con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La extracción se repitió tres veces. Finalmente, el ADN de la fase acuosa se precipitó añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se concentró por centrifugación a 17.000 x g durante 15 min. El sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 17.000 x g durante 1 min. El precipitado de ADN se secó a 37°C y se resuspendió en 50 µl de H₂O_d.

6. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS POR CONJUGACIÓN

La movilización a *P. putida* de los plásmidos no autotransferibles con el origen de transferencia del plásmido RP4 (*oriTRP4*) o del plásmido RK2 (*oriTRK2*), se realizó mediante conjugación "tripartita" (de Lorenzo y Timmis, 1994) en la que participaron la cepa de *E. coli* donadora (portadora del plásmido a movilizar), la cepa de *P. putida* receptora y la cepa auxiliar *E. coli* HB101(pRK600). El plásmido pRK600, que determina las funciones de transferencia, no es capaz de replicarse en *Pseudomonas*. Los transconjugantes de *P. putida* se seleccionaron en medio mínimo con benzoato suplementado con los antibióticos adecuados para la selección del plásmido transferido. Simultáneamente, se sembraron diluciones seriadas de la mezcla de conjugación en el medio anterior pero sin antibiótico, para calcular el número de células receptoras de *P. putida* presentes en dicha mezcla. La frecuencia de transconjugantes se expresó como el número de transconjugantes en relación al número de receptores.

7. TÉCNICAS COMUNES DE MANIPULACIÓN DE ADN

7.1. Electroforesis de ADN

La electroforesis de ADN se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa preparados en tampón Tris/acetato/EDTA (TAE). Como patrones de peso molecular se usaron los fragmentos de ADN del fago lambda cortado con los enzimas *HindIII*, *HindIII* más *EcoRI* o *BstEII*.

7.2. Recuperación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa

Para la recuperación de fragmentos de ADN de la agarosa se utilizó el sistema comercial "QIAEX II Gel Extraction Kit" (QIAGEN, ref. 20021), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.3. Transformación de células de *E. coli*

El método utilizado para la preparación de células competentes de *E. coli* y su ulterior transformación fue el descrito por Inoue *et al.* (1990), con el cuál se obtuvieron frecuencias de transformación mayores de 1×10^8 transformantes/ μg de ADN de pBR322.

7.4. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN plasmídico y de los fragmentos de ADN amplificados por PCR se realizó tanto de forma manual como automática. Para la secuenciación manual se siguieron las instrucciones del sistema comercial "T7 Sequencing Kit" (Pharmacia P-L Biochemicals, ref. 27-1682-01) basado en el método de Sanger *et al.* (1977), usando $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ y la ADN polimerasa del fago T7. La secuenciación automática la realizó el servicio de secuenciación automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra del CSIC en Granada, utilizando un aparato de Applied Biosystems (modelo 373 STRECHT). Se usó el sistema de secuenciación "DNA Sequencing Kit with AmpliTaq DNA polymerase" (Perkin-Elmer, ref. 402122), basado en la utilización de didesoxinucleótidos con cromóforos fluorescentes. Los oligonucleótidos empleados como cebadores en la secuenciación también se sintetizaron en el mismo servicio. Se secuenciaron siempre ambas cadenas de ADN para eliminar las ambigüedades que surgían.

7.5. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente ("PCR")

Este método se empleó para la amplificación de fragmentos de ADN del cromosoma de *P. putida*, y en algunos análisis de colonias obtenidas tras la transformación de ligaciones, para encontrar de forma rápida el ADN recombinante de interés. La reacción de amplificación contenía: ADN molde (0,2 ng/ μl para el ADN cromosómico o 10 pg/ μl para el ADN plasmídico), cebadores (0,5 μM cada uno), tampón de reacción (KCl, 50 mM; MgCl₂, 1,5 mM; Tris-HCl, 10 mM pH 9,0), dNTPs (100 μM cada uno) y ADN polimerasa *Taq* (Pharmacia Biotech, ref. 27-0799-02) (0,025 U/ μl). Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, se realizaron 33 ciclos en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min; 50°C, 1 min; 72°C, 1 min, y finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 min. La temperatura de hibridación se varió en función los cebadores utilizados. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria se combinaron distintas modificaciones, como

cambiar la concentración de $MgCl_2$ (incrementándola a 3 ó 4,5 mM) y/o añadir ciertos compuestos a la mezcla de reacción (por ejemplo, glicerol al 10% [v/v] o DMSO al 5% [v/v]). Ocasionalmente, el producto obtenido tras la amplificación se purificó utilizando el sistema comercial "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN, ref. 28104) para eliminar los cebadores y los dNTPs.

7.6. Transferencia de ADN a membrana e hibridación ("Southern blotting")

El ADN previamente digerido y separado en gel de agarosa, se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Boehringer Mannheim, ref. 1417240) siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989). El marcaje con digoxigenina de la sonda, la hibridación, y la posterior detección se realizaron siguiendo las instrucciones indicadas por el sistema comercial "DIG DNA Labelling and Detection Kit" (Boehringer Mannheim, ref. 1093657). Las membranas se hibridaron y lavaron en condiciones estrictas.

7.7. Otras técnicas de manipulación de ADN

Las reacciones de digestión de ADN plasmídico o ADN total con enzimas de restricción, reacciones de ligación, de defosforilación, de relleno de extremos colgantes en 5' (mediante tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*) o de eliminación de extremos colgantes en 3' (usando la ADN polimerasa del fago T4), se realizaron siguiendo los protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989). La digestión parcial de ADN se realizó siguiendo el método descrito en Ausubel *et al.* (1999), basado en la dilución seriada del enzima de restricción. La fosforilación e hibridación de oligonucleótidos se hicieron siguiendo los métodos descritos por Ausubel *et al.* (1999).

8. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

8.1. Microscopía de células vivas

Para la observación de bacterias vivas, 15 μ l de un cultivo celular cultivado en medio LB se observaron con un microscopio Zeiss (Photomicroscope 3) dotado de objetivos y condensador de contraste de fases. Para la toma de fotografías se utilizó una película "Kodak" en blanco y negro de 100 ASA de sensibilidad.

8.2. Microscopía electrónica de transmisión

Células cultivadas en medio LB hasta la fase de crecimiento deseada se recogieron por centrifugación y, se fijaron con una mezcla de formaldehído al 1% (v/v) y glutaraldehído al 2% (v/v) en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas a 4°C.

Posteriormente, se lavaron con este mismo tampón y se post-fijaron con tetróxido de osmio al 2% (v/v) y ferrocianuro potásico al 1.5% (v/v) durante 1 hora. Las muestras se lavaron nuevamente con el tampón anterior y se contrastaron en bloque con acetato de uranilo al 1% (v/v) durante 1 hora, se deshidrataron en un gradiente de etanol y se sometieron a un tratamiento con óxido de propileno. A continuación se infiltraron durante una hora en óxido de propileno más resina (proporción 1:1) y se dejaron en resina pura durante 12 horas. Después, se polimerizaron en una estufa a 60°C durante 12 horas y finalmente los bloques se cortaron en secciones ultrafinas de aproximadamente 500 Å, que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss modelo EM902, a un voltaje de aceleración de 80 kV. Tanto el procesamiento como la observación de las muestras se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

8.3. Microscopía electrónica de barrido

Las células se cultivaron en medio LB hasta alcanzar la fase de crecimiento deseada. Después, una gota del cultivo bacteriano se colocó sobre un cubreobjetos impregnado con poli-L-lisina, y se sometió durante 24 horas a vapores de glutaraldehído al 25% (v/v) en una cámara húmeda a 4°C. Las muestras se lavaron con H₂O_d y después se deshidrataron en un gradiente de etanol. Posteriormente, se transfirieron a acetato de amilo y se desecaron por el método del punto crítico (Anderson, 1951) en un desecador marca Polaron. Finalmente, se montaron con carbón conductor LEIT C sobre un portamuestras de aluminio, se metalizaron con oro en un aparato "SEM Coating Unit E5000" marca Polaron, y se observaron en un microscopio electrónico de barrido Zeiss modelo DSM950. Tanto el procesamiento como la observación de las muestras se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

9. TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN *IN VITRO*

Para la expresión *in vitro* de genes clonados se utilizó el sistema "Prokaryotic DNA-Directed Translation Kit" (Amersham, ref. N.380Y), basado en el extracto S-30 de *E. coli* MRE600, una cepa deficiente en ARNasa I. Para el marcaje de los polipéptidos se usó L-[³⁵S]metionina. El protocolo utilizado fue el recomendado por el fabricante, excepto que como medida de precaución se añadió a cada reacción 40 unidades del inhibidor de ribonucleasas "RNasin Ribonuclease Inhibitor" (Promega, ref. 799017). Finalmente, los polipéptidos marcados radiactivamente se separaron por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (EGPA-SDS). Como patrones

de peso molecular se utilizaron proteínas marcadas con ^{14}C (Amersham, ref. CFA.626). Tras la electroforesis, el gel se fijó en una solución de ácido acético al 7% (v/v), se secó al vacío, y las bandas de proteína se visualizaron por autorradiografía utilizando una película "Hyperfilm-MP" (Amersham, ref. RPN 8).

10. MUTAGÉNESIS

10.1. Mutagénesis por transposición

Los transposones usados en el proceso de mutagénesis, así como la base del mismo, se describen extensamente en el apartado de *Materiales y Métodos* correspondiente a los plásmidos. Éstos se introdujeron en *P. putida* por conjugación "tripartita" como se indica en el apartado 6 de esta sección, usando la cepa *E. coli* CC118 λ *pir* como donadora. Los transconjugantes se seleccionaron por su resistencia a kanamicina, el marcador que portan los elementos mini-Tn5 utilizados. De los transconjugantes seleccionados se descartaron aquellos que además fueron resistentes a piperacilina. Éstos aparecían a baja frecuencia como consecuencia de la integración del plásmido completo en el cromosoma de la célula huésped y no eran pues, el resultado de un verdadero hecho de transposición.

10.2. Mutagénesis dirigida *in vitro*

Este tipo de mutagénesis se utilizó para la creación de nuevos sitios de restricción en un fragmento dado de ADN. El método utilizado, descrito originariamente por Hutchinson *et al.* (1978), consiste en la hibridación de un oligonucleótido sintético a un ADN molde de cadena sencilla, al cual es complementario excepto en la región que contiene el(los) cambio(s) deseados. Con la ayuda de la ADN polimerasa del fago T4 y usando dicho oligonucleótido como cebador, se sintetiza una molécula de ADN de doble cadena que después se sella con una ADN ligasa, y se transforma en *E. coli* para que segreguen ambas cadenas. La mutagénesis dirigida se realizó usando el sistema comercial "Altered Sites *in vitro* Mutagenesis System" (Promega, ref. Q6210) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa en la utilización del plásmido pALTER-1 para la obtención de ADN de cadena sencilla (ver apartado de plásmidos) en conjunción con un segundo oligonucleótido mutagénico que repara la mutación que porta dicho plásmido en el gen de la β -lactamasa. El uso de este oligonucleótido simultáneamente con el oligonucleótido mutagénico de interés confiere resistencia a ampicilina a la cadena de ADN mutante. Además, al utilizar en una primera ronda de transformación una cepa deficiente en reparación, como *E. coli* BMH71-18 *mutS*, el rendimiento de plásmidos con la mutación deseada es mucho mayor.

11. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES POR INTERCAMBIO ALÉLICO

Para la construcción de mutantes de *P. putida* por recombinación homóloga se utilizó el plásmido pKNG101 (ver apartado de plásmidos), en el cuál se clonó el gen a mutar interrumpido por un gen marcador (el interposón Ω Km o el gen indicador *xylE*) de manera que hubiese suficiente secuencia de ADN, preferiblemente 1 kb o más, a cada lado de dicho marcador. El plásmido se transfirió desde *E. coli* CC118 λ pir a *P. putida* por conjugación "tripartita". Se seleccionaron los transconjugantes resistentes a estreptomicina, surgidos como consecuencia de la integración del vector en el cromosoma del huésped por recombinación homóloga con las secuencias que flanqueaban al marcador. Se comprobó que estas cepas (denominadas merodiploides o cointegrados) poseían el fenotipo que les confería el marcador introducido (resistencia a kanamicina o C230⁺). De esta forma, se descartaron posibles mutantes espontáneos resistentes a estreptomicina. Los merodiploides que aparecieron fueron de dos tipos: aquellos en los que el hecho de recombinación se había producido antes del marcador, y aquellos en los que se había producido después del mismo. Las cepas merodiploides no deberían crecer en medio LB suplementado con estreptomicina (100 μ g/ml) y sacarosa al 5% (p/v), pero en ocasiones, las condiciones del medio tuvieron que optimizarse (aumentando la concentración de sacarosa, o bajando la de NaCl o la temperatura de crecimiento) para que esto fuese así. Esta última cuestión fue crítica para garantizar la eficacia de las selecciones posteriores. Se eligieron varios merodiploides, procurando que hubiese de ambos tipos, y se cultivaron por separado durante 8-10 h en medio LB sin presión selectiva. Al cabo de este tiempo se sembraron diluciones seriadas en medio LB sólido (para el conteo de número de células totales) y en LB con sacarosa (en las condiciones optimizadas). Parte de este cultivo se utilizó para inocular medio LB fresco, y se volvió a repetir todo el proceso. Alternativamente, en lugar de cultivar los merodiploides en medio LB líquido, se cultivaron en medio LB sólido y se dejaron a 4°C durante varios días, después de los cuales se sembraron en medio LB con sacarosa. El crecimiento en ausencia de presión selectiva, permitió que pudiese ocurrir un segundo evento de recombinación que tuvo como consecuencia la pérdida de las secuencias del vector y de una de las copias del gen que se deseaba mutar (bien fuese la copia silvestre o la mutante). La posterior siembra en medio con sacarosa permitió seleccionar los clones en los que el cointegrado se había resuelto. La selección de los clones que portaban el gen marcador permitió distinguir inequívocamente los clones que poseían la copia mutada del gen, de aquellos que habían revertido al genotipo silvestre. Finalmente, la pérdida de las secuencias del vector y del gen silvestre se confirmó mediante PCR e hibridaciones de ADN.

12. ENSAYOS DE MOVILIDAD BACTERIANA

La movilidad de la cepa silvestre y de los mutantes se determinó analizando su capacidad de migrar durante el cultivo en placas de medio LB semisólido. Para ello, bacterias procedentes de una placa de medio LB fresco se inocularon tocando de forma puntual sobre la superficie del medio semisólido, con la ayuda de un palillo estéril. Tras 16 horas de incubación a 30°C, se determinó el diámetro del halo de crecimiento. La movilidad también se estimó de manera cualitativa observando las células, en fase de crecimiento exponencial, mediante microscopía de contraste de fases.

13. ENSAYOS DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD

13.1. Ensayos de resistencia/sensibilidad a antibióticos

Cuatro mililitros de un cultivo de células de *P. putida* en fase de crecimiento exponencial (DO_{660} entre 0,6 y 0,8) se añadieron sobre la superficie de una placa de Petri con 25 ml de medio LB sólido. Tras distribuirlos bien por toda su superficie, el líquido sobrante se añadió sucesivamente sobre otras tres placas y, al final se desechó. Las placas se dejaron secar inclinadas boca abajo durante unos minutos, tras los cuales el líquido sobrante se aspiró por vacío. Las placas se acabaron de secar dejándolas abiertas boca arriba al calor de la llama de un mechero. De esta forma, se conseguía fácilmente un césped bacteriano homogéneo. Sobre dichas placas se colocaron los discos de antibióticos (bioMérieux). Es muy importante que las placas estén bien secas para asegurar una difusión homogénea del antibiótico. Tras aproximadamente 20 horas de incubación a 30°C se determinó el diámetro del halo de inhibición del crecimiento, que incluía el diámetro de los discos (6,5 mm).

13.2. Ensayos de tolerancia/sensibilidad a colicinas con cepas de *E. coli*

Se realizaron de manera similar a los ensayos con antibióticos salvo que las placas se incubaron a 37°C. Las colicinas A y B (en forma purificada) y la colicina E3 (obtenida de sobrenadante celular) se obtuvieron del laboratorio de C. Lazdunski en Marsella (Francia), y se conservaron a -20°C. Justo antes de usarlas, se prepararon diluciones seriadas en tampón fosfato sódico 10 mM con 0,1% (v/v) de Tritón X-100. De cada una de las diluciones se añadió 1 μ l sobre las placas recién sembradas y éstas se dejaron secar, destapadas, al calor de la llama de un mechero. Tras aproximadamente 16 horas a 37°C, se determinó la presencia o no de halo de inhibición del crecimiento. La colicina B, perteneciente al grupo B de colicinas, se usó como control positivo de lisis celular.

13.3. Ensayos de resistencia/sensibilidad a otros compuestos

Para los ensayos de tolerancia a tolueno, se estudió la capacidad de crecimiento de las distintas cepas en cultivos de medio LB líquido suplementados con diferentes concentraciones del citado solvente. Tras 24 horas de incubación a 30°C en matraces sellados, se determinó la DO₆₆₀ de cada cultivo. Los ensayos de resistencia/sensibilidad a los restantes compuestos se realizaron según el método de Sukupolvi *et al.* (1984). Una colonia de la cepa en estudio se resuspendió en 1 ml de medio LB y se sembraron diluciones seriadas, para obtener colonias aisladas, en placas de medio LB que contenían distintas concentraciones del compuesto en cuestión (SDS, Tritón X-100, EDTA, deoxicolato sódico [DOC] o ácido benzoico). Tras 16 horas de incubación a 30°C se determinó la capacidad de cada cepa para formar colonias aisladas.

14. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA E INMUNODETECCIÓN ("WESTERN BLOTTING")

14.1. Preparación de lisado celular total

Entre 1 y 10 ml de un cultivo de células en la fase de crecimiento deseada se recogieron por centrifugación a 2.500 x g durante 10 min a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en tampón de muestra (Laemmli, 1970) a razón de 50 µl por cada equivalente de DO₆₆₀-ml. El número de equivalentes de DO₆₆₀-ml se calculó multiplicando el volumen (en ml) de cultivo centrifugado por su DO₆₆₀ en el momento de la recogida. Para eliminar la viscosidad de la muestra debida a los ácidos nucleicos, se añadieron 2,5 U de la endonucleasa comercial "Benzonasa" (Merck, ref. 1.01653), por cada equivalente de DO₆₆₀-ml. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras se solubilizaron calentándolas durante 5 min a 95°C, y después se enfriaron en hielo. Las células sin romper y los restos celulares de mayor tamaño se eliminaron por centrifugación a 17.000 x g durante 3 min. Para el análisis electroforético de la muestra se utilizaron 15 µl de este sobrenadante (0,3 equivalentes de DO₆₆₀-ml). Como patrones de peso molecular se utilizaron, indistintamente, los marcadores comerciales "SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range" (Bio-Rad Laboratories, ref. 161-0317), "LMW Marker Kit" (Pharmacia, ref. 17-0446-01), o "Calibration Proteins for SDS-Gel Electrophoresis, High Range" (Boehringer Mannheim, ref. 1317474). Éstos, se diluyeron en tampón de muestra según las recomendaciones del fabricante, y se solubilizaron de manera idéntica a las demás muestras.

14.2. Separación de proteínas por electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (EGPA-SDS)

Para la separación electroforética de proteínas se utilizó el equipo de electroforesis vertical "Mini-PROTEAN II" (Bio-Rad Laboratories, ref. 165-2940) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Las electroforesis se realizaron utilizando geles discontinuos de poliacrilamida de 1,5 mm de espesor, de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Cada gel constaba de un segmento superior concentrador (con 4% [p/v] de poliacrilamida) y un segmento inferior separador (con una concentración de poliacrilamida entre el 10 y el 15% [p/v] dependiendo del tamaño de las proteínas a separar). Tanto los geles como el tampón de electroforesis llevaban 0,1% (p/v) de SDS.

14.3. Transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección

Para la transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente, se utilizó una membrana de nitrocelulosa "Immobilon-NC" (Millipore, ref. HAHY304F0) de 0,45 μm de diámetro de poro. Tras la electroforesis, el gel separador y la membrana se equilibraron brevemente en tampón de transferencia (Tris, 20 mM; glicina, 150 mM; etanol 20% [v/v]). La transferencia se realizó utilizando el equipo "Mini Trans-Blot" (Bio-Rad Laboratories, ref. 170-3930) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la transferencia, la membrana se sumergió en rojo Ponceau (Ponceau S, 0,2% [p/v]; ácido tricloroacético, 3% [p/v]), y se agitó suavemente durante 5 min a temperatura ambiente. Después, se lavó 3 ó 4 veces con H_2O_d hasta que las bandas de proteína se visualizaron claramente y finalmente, se secó entre dos hojas de papel "Whatman 3MM" (Whatman International Ltd., ref. 3030917). Así, a la vez que se comprobó la eficiencia de la transferencia, se marcó a lápiz la posición de las bandas correspondientes a los patrones de peso molecular. En este punto, la membrana se guardó para su uso posterior o se utilizó inmediatamente para la detección inmunológica. Para ello, la membrana se incubó en agitación durante 5 min en tampón PBS (NaCl, 137 mM; KCl, 2,7 mM; Na_2HPO_4 , 10 mM pH 7,4) suplementado con 5 ó 10% (p/v) de leche desnatada según el revelado fuese con un sustrato cromogénico o quimioluminiscente, respectivamente. Esta solución de PBS-leche, se utilizó en todas las incubaciones y lavados siguientes, salvo que se indique lo contrario. La membrana se incubó con el primer anticuerpo (diluído en PBS-leche) con agitación, durante 1 hora a temperatura ambiente o, alternativamente, durante toda la noche a 4°C. Después se realizaron 3 lavados con PBS-leche de 5 min cada uno y se añadió el segundo anticuerpo, conjugado a peroxidasa (diluído en PBS-leche). Tras incubarse en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se procedió al revelado (4 lavados de 10 min, cuando el revelado fue quimioluminiscente). En el caso del revelado con un sustrato cromogénico, la membrana se incubó en una solución recién preparada de PBS, con 0,6 mg/ml de

3,3'-diaminobencidina y 0,03% (v/v) de H₂O₂. Cuando las bandas de producto precipitado se visualizaron nítidamente, la reacción se paró lavando varias veces con H₂O_d. Para el revelado quimioluminiscente se utilizó el sistema comercial "ECL Western blotting detection reagents" (Amersham, ref. RPN 2109) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas de reacción se visualizaron por exposición frente a una película "Hyperfilm-MP" (Amersham, ref. RPN 8). Tras el revelado quimioluminiscente la membrana se puede lavar con PBS durante 5 min y se puede realizar un revelado clásico.

Como anticuerpos primarios se utilizaron los monoclonales: MA1-6 (Hancock *et al.*, 1982), que reconoce la proteína OprL de *P. aeruginosa* y presenta reacción cruzada con la proteína OprL de *P. putida*; y anti-PhoA (Caltag Laboratories, ref. ME6200), que reconoce la enzima fosfatasa alcalina de *E. coli*. Ambos anticuerpos se usaron a una dilución 1:1.000. También se utilizaron como anticuerpos primarios, un anticuerpo policlonal de conejo (diluído 1:1.000) dirigido contra la enzima β-lactamasa de *E. coli* (cedido por D. Cavard, CNRS, Marsella, Francia), y un anticuerpo policlonal de conejo (diluído 1:2.000) generado contra la proteína RpoS (σ³⁸) de *E. coli*. y que reconoce RpoS de *P. putida* (cedido por A. Filloux, CNRS, Marsella, Francia).

Como anticuerpos secundarios, se utilizaron anticuerpos de conejo (diluídos 1:1.000) dirigidos contra inmunoglobulinas de ratón (Dakopatts, ref. P161); y anticuerpos de cabra (diluídos 1:500) dirigidos contra inmunoglobulinas de conejo (Cappel, ref. 55682). En ambos casos estaban conjugados a peroxidasa de rábano.

15. ENSAYOS DE TRATAMIENTO CON GLOBOMICINA

Los ensayos de inhibición de la enzima peptidasa señal II, se realizaron usando el antibiótico peptídico cíclico globomicina (cedido por M. Inouye, Piscataway, New Jersey, USA), que inhibe específicamente esta enzima (Inukai *et al.*, 1978). Brevemente, las células se cultivaron hasta alcanzar una DO₆₆₀ entre 0,4 y 0,5. En este momento, el cultivo se repartió en 2 matraces conteniendo 5 ml de cultivo cada uno. A uno de ellos se le añadió globomicina a 100 μg/ml de concentración final (25 μl de una solución 20 mg/ml en etanol). Al otro matraz se le añadieron 25 μl de etanol, como control. La incubación se continuó durante 45-60 min. Transcurrido ese tiempo y tras determinar la DO₆₆₀ de cada cultivo, las células se recogieron por centrifugación a 2.500 x g durante 10 min a 4°C, y se trataron con tampón de muestra de manera idéntica a la indicada en el apartado 14.1 de esta sección. A continuación, las proteínas se separaron en EGPA-SDS y se transfirieron a nitrocelulosa como se describió en los apartados 14.3 y 14.4. En la electroforesis, el gel separador se utilizó a una concentración del 15% (p/v) de poliacrilamida, para mejorar la separación de las formas procesada y sin procesar de

OprL. Para la detección inmunológica de la proteína OprL de *P. putida* se usó el anticuerpo monoclonal MA1-6.

16. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL PEPTIDOGLICANO

La fracción de proteínas asociadas a peptidoglicano se obtuvo siguiendo el método descrito por Fuchs *et al.* (1991), que se basa en extracciones sucesivas con 1% (p/v) de SDS a temperaturas crecientes (10, 30 y 50°C). Brevemente, células de *P. putida* o *P. aeruginosa* se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 1-1,5. Las células se recogieron por centrifugación a 10.000 x g durante 15 min a 4°C, y se lavaron con Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 frío. Tras repetir la centrifugación, el sedimento celular se resuspendió en el tampón anterior a razón de 9 ml por cada gramo de peso húmedo de sedimento. A continuación, se añadió un inhibidor de proteasas (PMSF) a una concentración final de 1 mM, e inmediatamente las muestras se sonicaron hasta obtener un extracto transparente. Después de ajustar cada muestra a 1% (p/v) de SDS, el lisado celular se centrifugó a 42.000 x g durante 45 min a 10°C. El sedimento se lavó con H₂O_d, y se incubó durante 1 hora a 30°C en una solución que contenía SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v) y Tris-HCl 10 mM pH 7,8 (se añadió a razón de 2,5 ml por cada gramo de peso húmedo del sedimento inicial), tras lo cual se centrifugó en las condiciones antes indicadas. Este último paso se repitió a 50°C. Finalmente, 10 µl de la fracción sobrenadante obtenida de este último paso (que contenía las proteínas asociadas al peptidoglicano), se analizaron en EGPA-SDS. Además, las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a nitrocelulosa, y OprL se detectó inmunológicamente usando el anticuerpo MA1-6 (como se indica en el apartado 14 de esta sección).

17. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PERIPLÁSMICAS EN EL MEDIO EXTRACELULAR

Para la realización de este protocolo es aconsejable utilizar tubos de material transparente durante las centrifugaciones. Cepas de *P. putida* (portando el plásmido pJB3Km1) se cultivaron en 25 ml de medio LB líquido con los antibióticos adecuados, hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0,5. Entonces, 20 ml del cultivo celular se recogieron por centrifugación a 15.000 x g durante 7 min a 25°C (no se utilizó el freno de la centrífuga al parar). Parte del sobrenadante (15 ml) se recogió con una pipeta (con cuidado de no llevarse células) y se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriormente descritas. El sedimento celular de la primera centrifugación se resuspendió en tampón de muestra (Laemmli, 1970) como se indica en el apartado 14.1 de esta sección, y se utilizó como control positivo (lisado celular total). Parte del sobrenadante resultante de la segunda

centrifugación (10 ml) se recogió con una pipeta (con mucho cuidado de no llevarse células) y se dejó 30 min en hielo, precipitando con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v). La muestra se concentró después por centrifugación a 15.000 x g durante 30 min a 4°C. El sedimento se lavó con 400 μ l de acetona y se volvió a centrifugar como antes durante 5 min. Finalmente, el sedimento se resuspendió en tampón de muestra de Laemmli (con mucho cuidado de no dejar restos por las paredes del tubo) y se trató del mismo modo que se hizo con el sedimento de células. El tampón de muestra se añadió en la misma proporción que la indicada en el apartado 14.1 de esta sección (teniendo en cuenta que este sedimento provenía de 10 ml de cultivo original). Las muestras se analizaron en EGPA-SDS como se indica en el apartado 14.2 de esta sección, excepto que para el análisis de las muestras de sobrenadante celular se utilizaron 25 μ l (0,5 equivalentes de DO₆₆₀-ml) en lugar de los 15 μ l habituales. A continuación, se realizó un "Western blotting" (apartado 14.3) usando como anticuerpos primarios, el anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína β -lactamasa o el policlonal que reconoce la proteína RpoS de *P. putida*.

Alternativamente, las proteínas se visualizaron directamente en el gel mediante tinción con una solución de azul de Coomassie (0,25% [p/v] de azul de Coomassie en una mezcla de metanol:ácido acético:agua en proporción 45:10:45 [v/v/v]). En lugar de las 2-4 horas necesarias por el método tradicional, la tinción se aceleró calentando el gel sumergido en la solución anterior, en un microondas, justo hasta que comenzó a hervir. El gel se agitó entonces durante 5 minutos, a temperatura ambiente, en esta solución. Después, se agitó a temperatura ambiente en una solución de decoloración (idéntica a la anterior pero sin Coomassie) que se cambió frecuentemente por solución fresca, hasta que las bandas de proteínas se visualizaron con nitidez. La decoloración también puede acelerarse con el microondas, repitiendo varias veces con solución decolorante fresca, el mismo procedimiento que se utilizó para la tinción.

Para almacenar los geles de forma definitiva, éstos se incubaron con agitación durante un par de horas en una solución que contenía glicerol 3% (v/v) y metanol 30% (v/v), tras lo cual, se prensaron entre dos hojas de papel celofán transparente, y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente.

18. ANÁLISIS DE LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)

18.1. Preparación de LPS y electroforesis

Para la preparación de LPS se siguió básicamente el método descrito por Hitchcock y Brown (1983). Un mililitro de un cultivo de células de *P. putida* en fase de crecimiento exponencial (DO₆₆₀ entre 0,5 y 0,6) se recogió por centrifugación a 17.000 x g durante

1 min. Tras lavar el sedimento celular 1 vez con PBS, se resuspendió en 80 μ l de tampón de muestra de Laemmli modificado (SDS, 2% [p/v]; β -mercaptoetanol, 4% [v/v]; glicerol, 10% [v/v]; azul de bromofenol, 0,1 mg/ml; Tris-HCl, 1M pH 6,8). Las muestras se solubilizaron calentando durante 20 min a 95°C, y después se enfriaron en hielo. A cada muestra, se le añadió 20 μ l de una solución de proteinasa K (2,5 mg/ml en tampón de muestra modificado), y se incubaron durante 2 horas a 60°C. Después, las muestras se calentaron 5 min a 95°C y se enfriaron en hielo. Los restos celulares de mayor tamaño se eliminaron centrifugando a 17.000 x g durante 3 min. Para el análisis electroforético se utilizaron 5 μ l del sobrenadante. En la electroforesis, se utilizó un gel separador con 14% (p/v) de poliacrilamida. La electroforesis desnaturalizante se realizó como se indica en el apartado 14.2 de esta sección, excepto que el espesor de los geles utilizados fue de 0,75 mm.

18.2. Tinción de plata específica para LPS

La tinción de plata para LPS se realizó según el método descrito por Hitchcock y Brown (1983), aunque con algunas modificaciones. Debido a la sensibilidad de la tinción de plata, es fundamental utilizar durante todo el proceso, H₂O_d de alta calidad (preferiblemente de 18 M Ω x cm de resistividad), material de vidrio muy limpio, y manejar todo con guantes enjuagados previamente con H₂O_d. También es importante asegurarse de que el gel esté completamente sumergido en todo momento en las soluciones de incubación. Todas las incubaciones abajo indicadas se realizaron con agitación suave y a temperatura ambiente.

Tras la electroforesis, el gel se incubó durante toda una noche en una solución de fijación que contenía isopropanol 25% (v/v) y ácido acético 7% (v/v). Después, se sumergió durante 5 min (más tiempo es perjudicial) en solución de oxidación recién preparada (1,05 g de ácido peryódico, 150 ml de H₂O_d y 4 ml de la solución de fijación anterior). A continuación, el gel se lavó exhaustivamente 3 veces en 200 ml de H₂O_d, durante 15 min cada vez, y después se sumergió durante 10 min en una solución de tinción (preparada como se indica más abajo). El gel se lavó nuevamente, al menos 4 veces en 200 ml de H₂O_d, durante 15 min cada vez, y se sumergió posteriormente durante 10-20 min en una solución reveladora recién preparada (50 mg/l de ácido cítrico y 0,0185% [v/v] de formaldehído). Esta solución se debe usar a 25°C, porque si se usa por debajo de esta temperatura podrían revelarse las proteínas resistentes al tratamiento con proteinasa K que pudiese haber en el gel. El revelado se paró sumergiendo el gel en una solución de ácido acético al 5% (v/v) durante 15 min. Finalmente, el gel se lavó varias veces con H₂O_d y se almacenó como se indica en el apartado 17 de esta sección.

Para la preparación de la solución de tinción (ésta se preparó justo antes de usar y se protegió de la luz), se mezclaron 28 ml de NaOH 0,1 N con 1 ml de NH₄OH al 29,4% (v/v) y 115 ml de H₂O_d. A esta mezcla en agitación, se le añadió muy lentamente, para prevenir la formación de precipitados, AgNO₃ 20% (p/v) (aproximadamente 5 ml) hasta que la solución comenzó a saturarse. Entonces se le añadieron unas gotas de NH₄OH al 29,4% (v/v) hasta que la solución se aclaró por completo. Es fundamental que el NH₄OH concentrado esté en buen estado para obtener una tinción preferencial de los LPS.

19. TÉCNICA ELISA ("ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY")

Para la realización de esta técnica se siguió fielmente el método descrito por Ramos-González *et al.* (1992). Esta técnica se utilizó para la búsqueda de clones de *P. putida* con LPS alterados entre los mutantes obtenidos por transposición. Para ello se usó el anticuerpo monoclonal 7.3B (Ramos-González *et al.*, 1992), que reconoce el antígeno O del LPS de *P. putida* KT2440, como anticuerpo primario (dilución 1:1.000).

20. ENSAYOS DE INCORPORACIÓN DE 1,2,4-[¹⁴C]TRICLORO-BENCENO

Para estudiar el grado de incorporación de tolueno en las membranas de la cepa *P. putida* DOT-T1 y de sus derivados, se utilizó un compuesto análogo no metabolizable marcado radiactivamente, el 1,2,4-[¹⁴C]triclorobenceno. Las cepas en estudio se cultivaron en medio LB o en medio LB suplementado con tolueno a través de la fase gaseosa, hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Entonces, se recogieron por centrifugación, se lavaron con medio LB y se resuspendieron en 2,5 ml de dicho medio a razón de 150-200 µg de proteína celular/ml. Las células se incubaron entonces durante 10 min a 30°C en presencia de 5µCi de 1,2,4-[¹⁴C]triclorobenceno. Transcurridos 10 min, 250 µl de esta suspensión celular se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro y se lavaron con 2 ml de medio LB. Tras dejar secar los filtros, se determinó la cantidad de ¹⁴C (en desintegraciones/min) asociada al sedimento celular en un detector de radiaciones Packard 1500 TRI-CARB.

21. EXPERIMENTOS EN MICROCOSMOS EDÁFICOS

El suelo utilizado en estos experimentos fue de tipo fluvisol (6,4% [p/p] de materia orgánica; 3,5% [p/p] de CaCO₃; pH 8). El suelo se tamizó, antes de su utilización, a través de una criba metálica de 4 mm, y la humedad se ajustó al 30% de la capacidad de

campo. Posteriormente, se llenaron recipientes de cristal con 90 g de suelo. Como inóculo se utilizaron células de *P. putida* cultivadas durante 10-12 horas en medio LB líquido suplementado con los antibióticos apropiados. Las células se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 15 min a 15°C. Tras un lavado en tampón 1xM9 (Sambrook *et al.*, 1989), se resuspendieron en el mismo tampón a una concentración aproximada de 1x10⁸ células/ml. Un mililitro de esta suspensión celular se añadió a cada uno de los microcosmos, y las bacterias se distribuyeron uniformemente en el suelo con la ayuda de una varilla de vidrio estéril. Los microcosmos se mantuvieron tapados y a temperatura ambiente, salvo que se especifique lo contrario. Periódicamente, se tomaron muestras de 10 g de suelo, que se mezclaron con 90 ml de tampón 1xM9 y se agitaron a 200 rpm durante 30-60 min a 30°C en un incubador orbital Adolf Kühner ISF-4-V. A continuación, se sembraron diluciones seriadas en placas de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, para determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de suelo. La primera muestra ("muestra a tiempo cero") se tomó 2 horas después de la inoculación.

22. ENSAYOS DE ADHESIÓN A SEMILLA

Para los ensayos de unión de células de *P. putida* a semillas de maíz (*Zea mays*), se siguió el protocolo utilizado por de Weger *et al.* (1996) en la determinación de adhesión bacteriana a raíces de patata. Brevemente, las distintas cepas de *P. putida* en estudio se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Después, las células se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 10 min a 15°C. Tras lavarlas una vez en tampón 1xM9, las células se resuspendieron en el mismo tampón a una concentración aproximada de 1x10⁸ células/ml. Unas 30 semillas de maíz se incubaron en 200 ml de esta suspensión celular con agitación suave, durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se eligieron 3 semillas al azar de la suspensión, se secaron al aire, y se transfirieron a un tubo de vidrio que contenía 3 ml de tampón 1xM9. La suspensión con las semillas se agitó vigorosamente durante 2 min para eliminar las células unidas débilmente, y el proceso se repitió 2 veces en tampón fresco. En el último lavado, las semillas se agitaron en presencia de 1 g de bolas de vidrio (de 3 mm de diámetro) con objeto de separar las bacterias firmemente unidas a las semillas. Finalmente, se sembraron diluciones seriadas en medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes, para determinar el número de UFC/semilla. Cada muestra se analizó por triplicado.

23. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

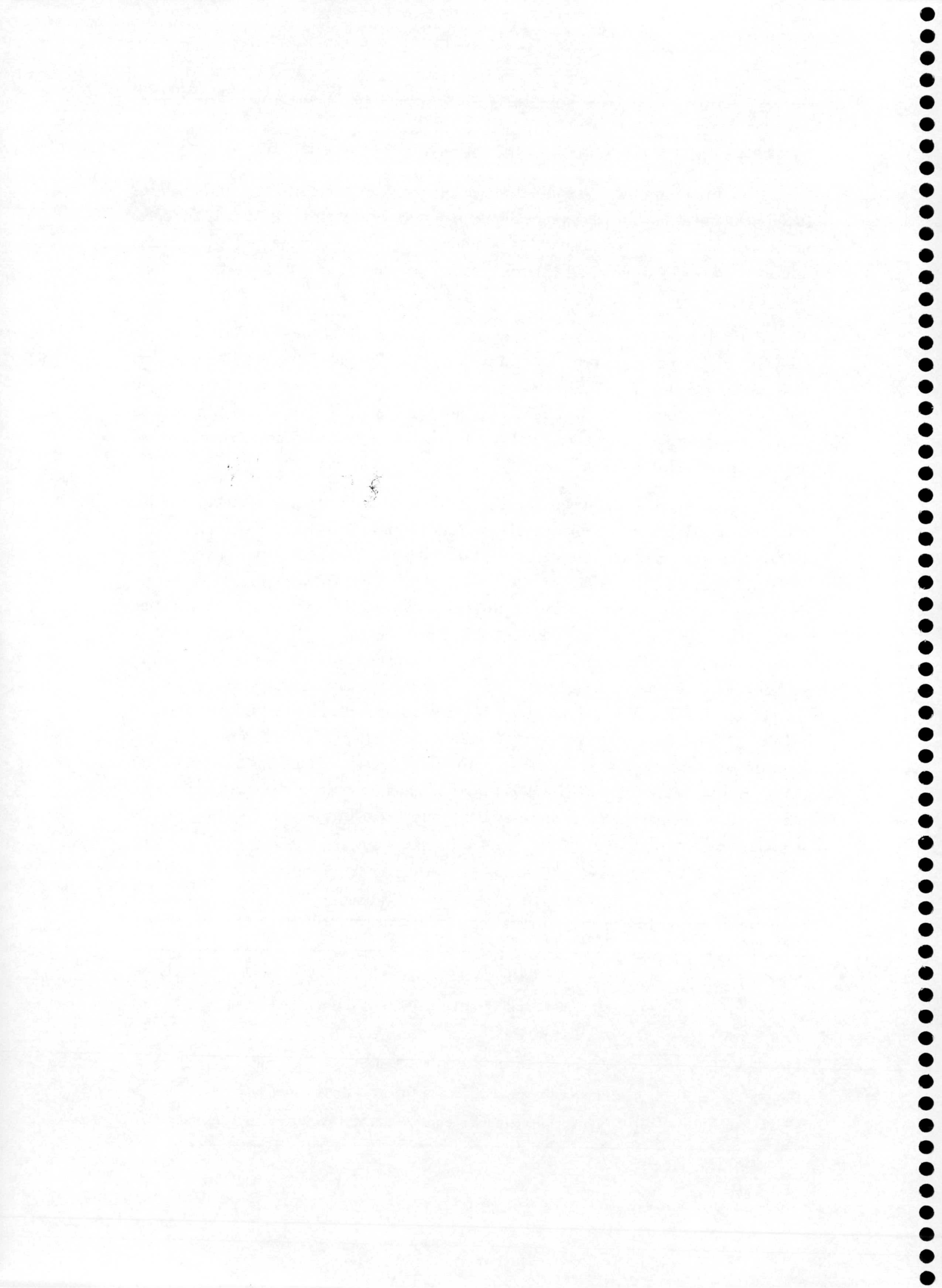
Para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos (determinación de las fases de lectura abierta, de los sitios de restricción, uso de codones, perfiles de hidropatía, composición de aminoácidos, etc.) se emplearon los programas informáticos DNA Strider v. 1.1 (Marck, 1988) y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

Para el diseño y análisis de oligonucleótidos (para secuenciación y PCR) se utilizaron los programas informáticos OLIGO v. 4.05 (W. Rychlik, National Biosciences, Inc., 1992) y Amplify v. 2.52B (B. Engels, University of Wisconsin, 1996). Para la estimación de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos se usó el programa "Tm determination" (Breslauer *et al.*, 1986) disponible en Internet (Tabla 3) que, además de la composición de bases, también tiene en cuenta su secuencia.

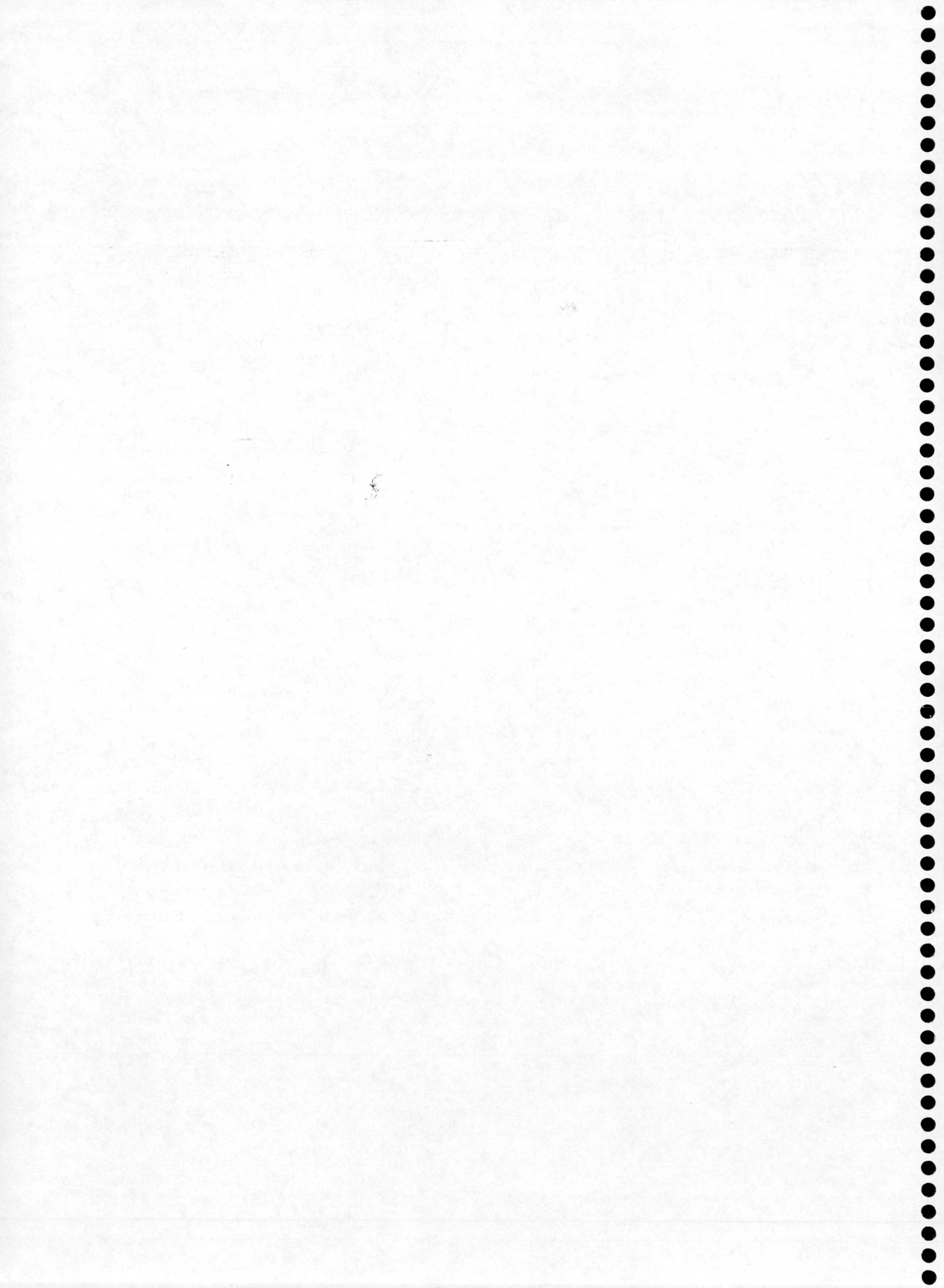
La comparación de nuevas secuencias (de nucleótidos y aminoácidos) con las distintas bases de datos, se realizó con la ayuda de los programas BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponible en el servidor de Internet del NCBI; y FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988) disponible en el servidor de Internet del EMBL-EBI (Tabla 3). Para la predicción de regiones transmembrana se usó el programa TMPred, disponible en el servidor de Internet del ISREC (Tabla 3). La predicción de péptidos señal y de su sitio de corte se realizó con ayuda del programa SignalP v. 1.1 (Nielsen *et al.*, 1997) disponible en el servidor de Internet del CBS (Tabla 3). El alineamiento de secuencias peptídicas se realizó con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) disponible en el servidor de Internet del PBIL (Tabla 3). Con todos estos programas se usaron las opciones estándar. Los alineamientos obtenidos se trataron con el programa MacBoxShade v. 2.01 (M. D. Baron, Mercurio MDEF, 1997) que, además de generar secuencias consenso para los alineamientos, permite colorear o dar sombreado a los aminoácidos en función de su identidad o similitud.

TABLA 3. Direcciones de Internet

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



RESULTADOS



Capítulo I

ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE UN MUTANTE DE *Pseudomonas putida* ALTERADO EN UNA PROTEÍNA DE MEMBRANA

RESUMEN

Mediante mutagénesis por transposición con un mini-Tn5*phoA* de una cepa derivada de *Pseudomonas putida* KT2440, se obtuvo un mutante, denominado *P. putida* 14G3, cuya capacidad de colonización del suelo se había disminuída en comparación con la de la cepa silvestre. Cuando la cepa mutante se caracterizó fisiológicamente, se observó que era incapaz de crecer en medio con baja concentración de NaCl, y que era más sensible que la cepa silvestre a compuestos como el SDS, el EDTA y el deoxicolato. Además, cuando se cultivaba en medio líquido, dicha cepa mostraba tendencia a lisarse y a formar grumos, especialmente al final de la fase de crecimiento exponencial. Al microscopio, tanto óptico como electrónico, se observó que esta cepa crecía formando cadenas celulares, y que presentaba alterada su morfología. La región de ADN donde se insertó el minitransposón se clonó, y se utilizó como sonda para rescatar el gen silvestre. La zona mutada se secuenció y se comparó con las secuencias disponibles en las bases de datos. El gen mutado mostró una alta similitud con genes que codifican la lipoproteína asociada al peptidoglicano (PAL) de bacterias gram negativas. La proteína codificada por dicho gen, denominado *oprL*, se identificó en ensayos acoplados de transcripción y traducción *in vitro*. También se demostró que el gen *oprL* estaba conservado dentro de las distintas especies que forman el género *Pseudomonas sensu stricto* (*Pseudomonas* pertenecientes al grupo I de ARN ribosómico). Corriente abajo del gen mutado se encontró otro gen, *orf2*, que presentó similitud con los genes localizados corriente abajo de *pal* en otras bacterias. Mediante ensayos de fusión con '*phoA* se determinó que este gen también codificaba una proteína que se exportaba a la envoltura celular.

1. CARACTERIZACIÓN DE *P. putida* 14G3

La cepa *P. putida* 14G3 es una derivada de *P. putida* EEZ40 (un mutante espontáneo resistente a estreptomicina de *P. putida* KT2440) obtenida tras mutagénesis al azar con el transposón mini-Tn5*phoA* (Ramos-González, 1993; Rodríguez-Herva *et al.*, 1996). Esta cepa se seleccionó originariamente como una colonia de color azul sobre medio LB sólido en presencia del sustrato cromogénico BCIP (ver apartado correspondiente a los plásmidos en la sección *Materiales y Métodos*), indicando que la mutación había afectado a un gen que codificaba una proteína que se exportaba a la envoltura celular. A continuación, se procedió a la caracterización de dicho mutante, analizando su crecimiento en distintas condiciones de cultivo y, en particular, estudiando su respuesta frente a distintos agentes químicos (detergentes, antibióticos, etc.) que afectan especialmente a microorganismos con defectos a nivel de la envoltura celular (Fung *et al.*, 1978; Sukupolvi *et al.*, 1986; Woodruff y Hancock, 1989).

1.1. Crecimiento en medio rico con distintas concentraciones de NaCl

P. putida EEZ40 se cultivó en medio LB líquido (1% [p/v] de NaCl) y en medio LB líquido con 0,1% (p/v) de NaCl. En ambos medios, su tiempo de generación fue de aproximadamente 35 min. (Fig. 17). *P. putida* 14G3 mostró un tiempo de generación similar al de la cepa parental, cuando se cultivó en medio LB con 1% (p/v) de NaCl. Sin embargo, fue incapaz de crecer en medio LB con baja concentración de NaCl (Fig. 17). Además, durante el cultivo en medio LB con 1% (p/v) de NaCl, y tras finalizar la fase de crecimiento exponencial, la cepa mutante comenzó a formar grumos provocando un estancamiento de la turbidez del cultivo e incluso una ligera disminución (Fig. 17).

1.2. Ensayos de resistencia/sensibilidad a diferentes compuestos

Algunos mutantes en proteínas de membrana muestran patrones de sensibilidad a ciertos detergentes, antibióticos, agentes quelantes y otros compuestos, cuando se comparan con las correspondientes cepas silvestres (Fung *et al.*, 1978; Sukupolvi *et al.*, 1986). En este estudio, se comparó el patrón de resistencia/sensibilidad de *P. putida* 14G3 a diferentes antibióticos, con el de la cepa parental. El crecimiento de la cepa mutante, al igual que el de la parental, no se inhibió con los antibióticos ampicilina, cloramfenicol, eritromicina, estreptomicina y vancomicina, a las concentraciones suministradas en los discos. El comportamiento del mutante frente a los antibióticos a los cuales la cepa parental era sensible (ácido nalidíxico, piperacilina, rifampicina y tetraciclina) fue similar al de dicha cepa.

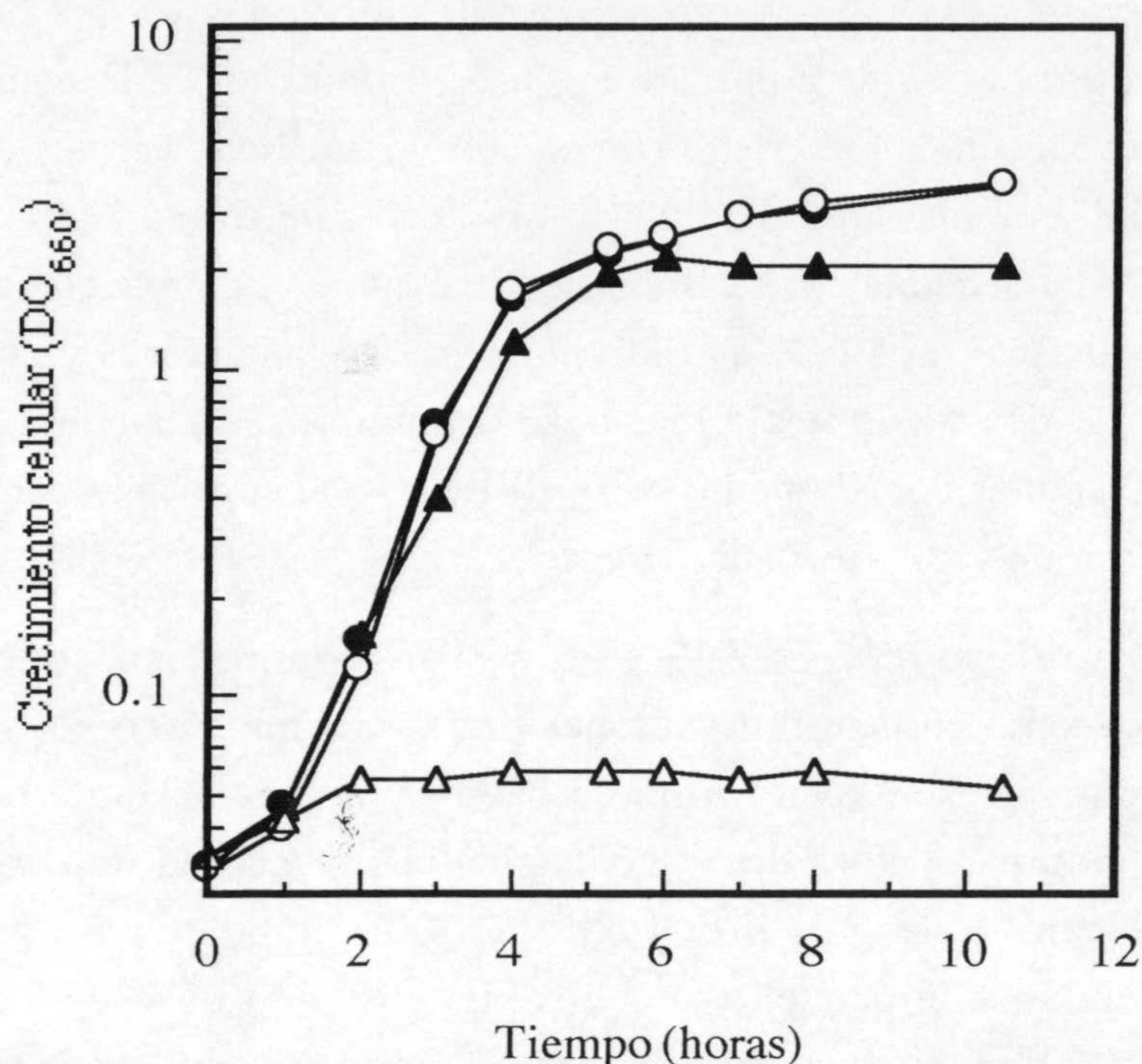


FIGURA 17. Crecimiento de *P. putida* EEZ40 y 14G3 en medio LB con distintas concentraciones de NaCl. *P. putida* EEZ40 (círculos) o *P. putida* 14G3 (triángulos) se cultivaron durante toda la noche en medio LB con 1% (p/v) de NaCl. Entonces, parte de este cultivo, se utilizó para inocular medio LB fresco (dilución 1:100) con 1% (p/v) de NaCl (símbolos cerrados) o con 0,1% (p/v) de NaCl (símbolos abiertos). La turbidez del cultivo se determinó a los tiempos indicados. DO_{660} , densidad óptica a 660 nm.

También se estudió el comportamiento de *P. putida* 14G3 y de *P. putida* EEZ40 frente a los detergentes SDS, Tritón X-100 y deoxicolato, y frente al agente quelante EDTA. Los ensayos se realizaron en medio LB sólido (ver apartado 13.3 de *Materiales y Métodos*). El primer detergente inhibió el crecimiento de la cepa parental a una concentración del 2,8% (p/v) y el de la cepa mutante a una concentración del 1,8% (p/v). El deoxicolato inhibió el crecimiento de la cepa parental a una concentración de 225 mM, e inhibió el de la mutante a 60 mM. El Tritón X-100 a concentraciones de hasta el 3% (p/v) no inhibió el crecimiento de ninguna de las dos cepas. En cuanto al comportamiento en presencia de EDTA, el crecimiento de la cepa parental se inhibió con 1,9 mM de EDTA, mientras que 1,4 mM de EDTA fue suficiente para inhibir el crecimiento de la cepa mutante.

1.3. Observación de *P. putida* 14G3 al microscopio óptico y al electrónico

Células de *P. putida* 14G3 y *P. putida* EEZ40 cultivadas en medio LB, se observaron al microscopio óptico de contraste de fases. El cultivo de la cepa parental (Fig. 18A) presentaba el aspecto característico de un cultivo de *Pseudomonas* en fase de crecimiento exponencial, con numerosas células individuales de forma bacilar, y otras muchas en proceso de división celular. Las células de la cepa mutante presentaban, por su parte, un aspecto bien distinto. Las células individuales eran más cortas y con formas heterogéneas, pero lo más destacado fue la presencia de numerosos filamentos celulares (con una media de 6-10 células por filamento) (Fig. 18B), lo que sugería la existencia de algún defecto en los últimos estadios de la división celular.

P. putida 14G3 y *P. putida* EEZ40 se observaron también al microscopio electrónico de barrido. Como en las observaciones previas al microscopio óptico, las células de la cepa parental presentaban forma de bacilo y aparecían tanto de manera individual como formando parejas, es decir, células en el proceso de división celular (Fig. 19A y B). En el cultivo de *P. putida* 14G3, a 1.000 aumentos, se observó la presencia de grumos celulares de pequeño tamaño (Fig. 19C). Al observar con mayor detalle (por ej. a 3.000-5.000x), algunas células aparecieron formando largos filamentos sin tabicación externa aparente, aunque en la mayoría de los filamentos las unidades celulares se distinguían con facilidad (Fig. 19D y E). Muchas células poseían evaginaciones membranosas en su superficie, a modo de burbujas, algunas de las cuales aparecían arrugadas como si hubiesen perdido su contenido (Fig. 19E y F).

Por último, mediante microscopía electrónica de transmisión, se analizó la ultraestructura de *P. putida* 14G3 y de *P. putida* EEZ40 en distintas fases del crecimiento. Las células se cultivaron en medio LB líquido y se recogieron en las fases exponencial y estacionaria. Después, las muestras se prepararon como se indicó en el apartado 8.2 de la sección *Materiales y Métodos*, y se observaron al microscopio electrónico de transmisión. Independientemente de la fase de crecimiento, las células de la cepa parental presentaron un aspecto homogéneo, con la morfología bacilar característica de las pseudomonádáceas. Las membranas interna y externa de la envoltura celular aparecieron íntegras y bien definidas (Fig. 20A y B). Las células de la cepa mutante presentaron, sin embargo, una morfología heterogénea y, aunque su membrana interna apareció bien definida, la membrana externa mostró numerosas discontinuidades (Fig. 20D y E). Todas estas características se acentuaron en la fase de crecimiento estacionario. Además, también se observó en ambas fases la presencia de numerosos "fantasmas celulares", es decir, células transparentes al paso de los electrones que habían perdido su contenido citoplásmico quedando reducidas prácticamente a la envoltura celular (Fig. 20C y D). Asimismo,

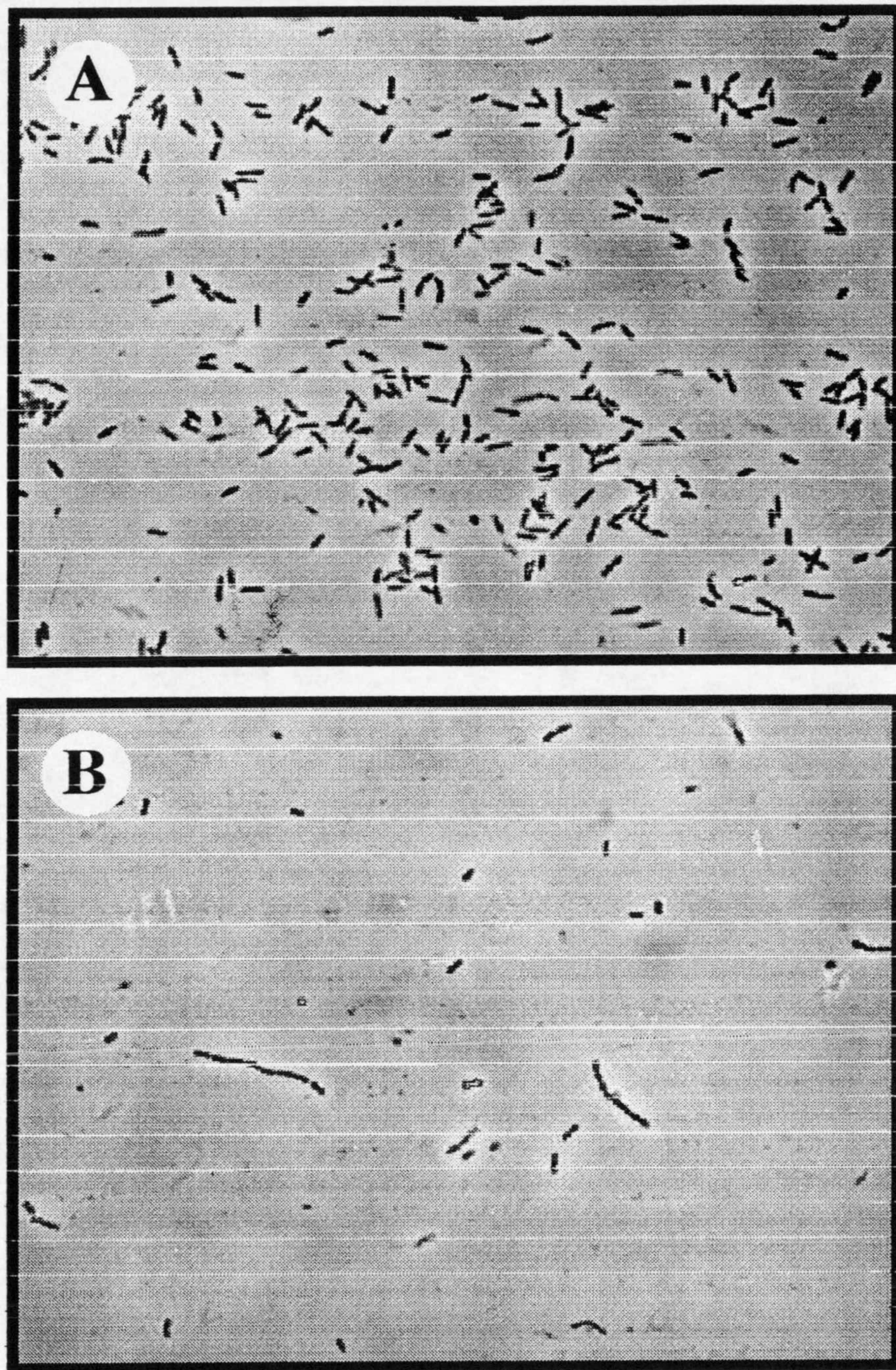


FIGURA 18. Fotografías de *P. putida* 14G3 y *P. putida* EEZ40 en microscopía de contraste de fases. Células de *P. putida* EEZ40 (A) o *P. putida* 14G3 (B) se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar una DO_{660} de 0,5 en el caso de la cepa mutante y de 0,7 en el caso de la parental, y después se observaron mediante microscopía de contraste de fases. Aumentos, x 640.

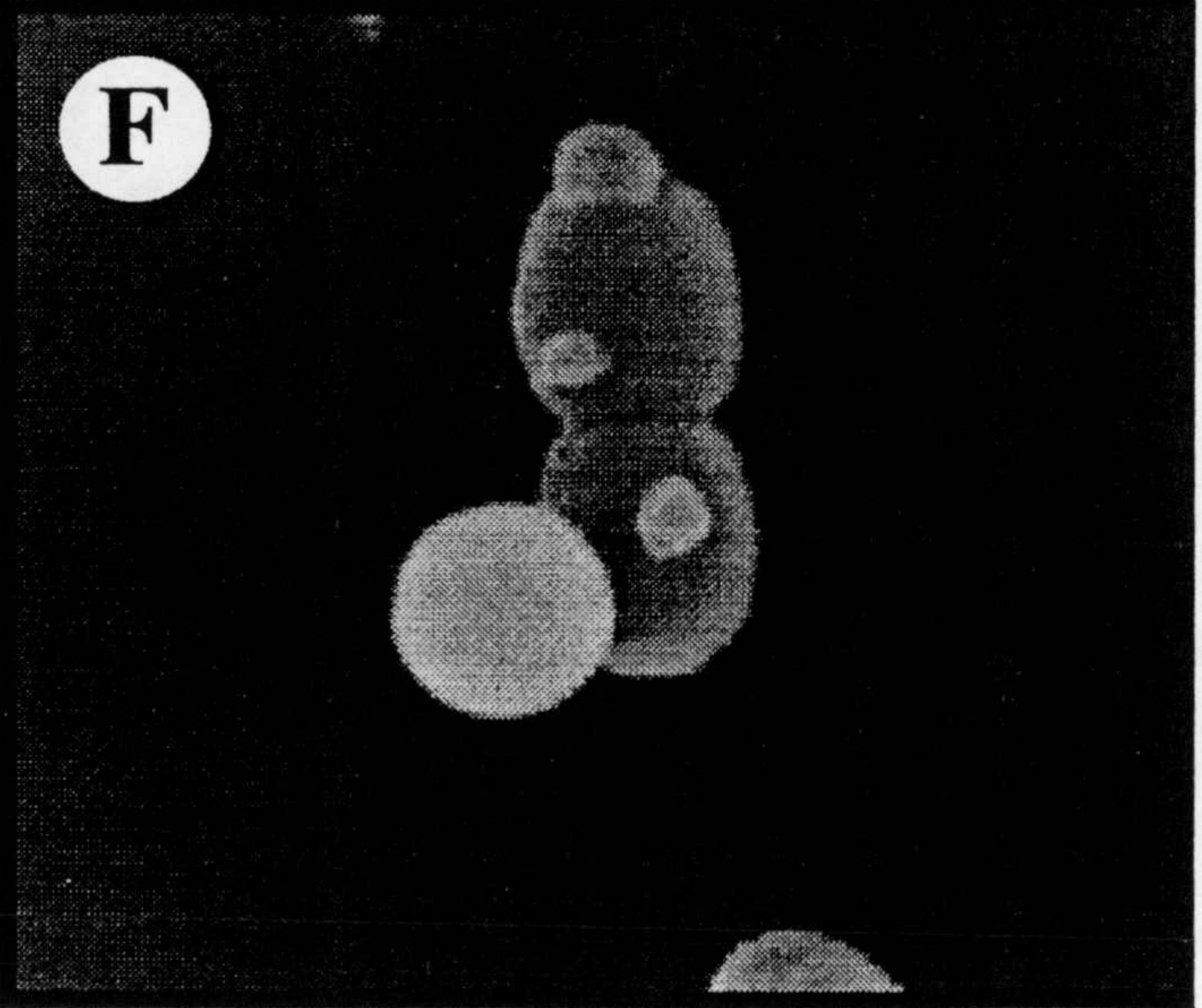
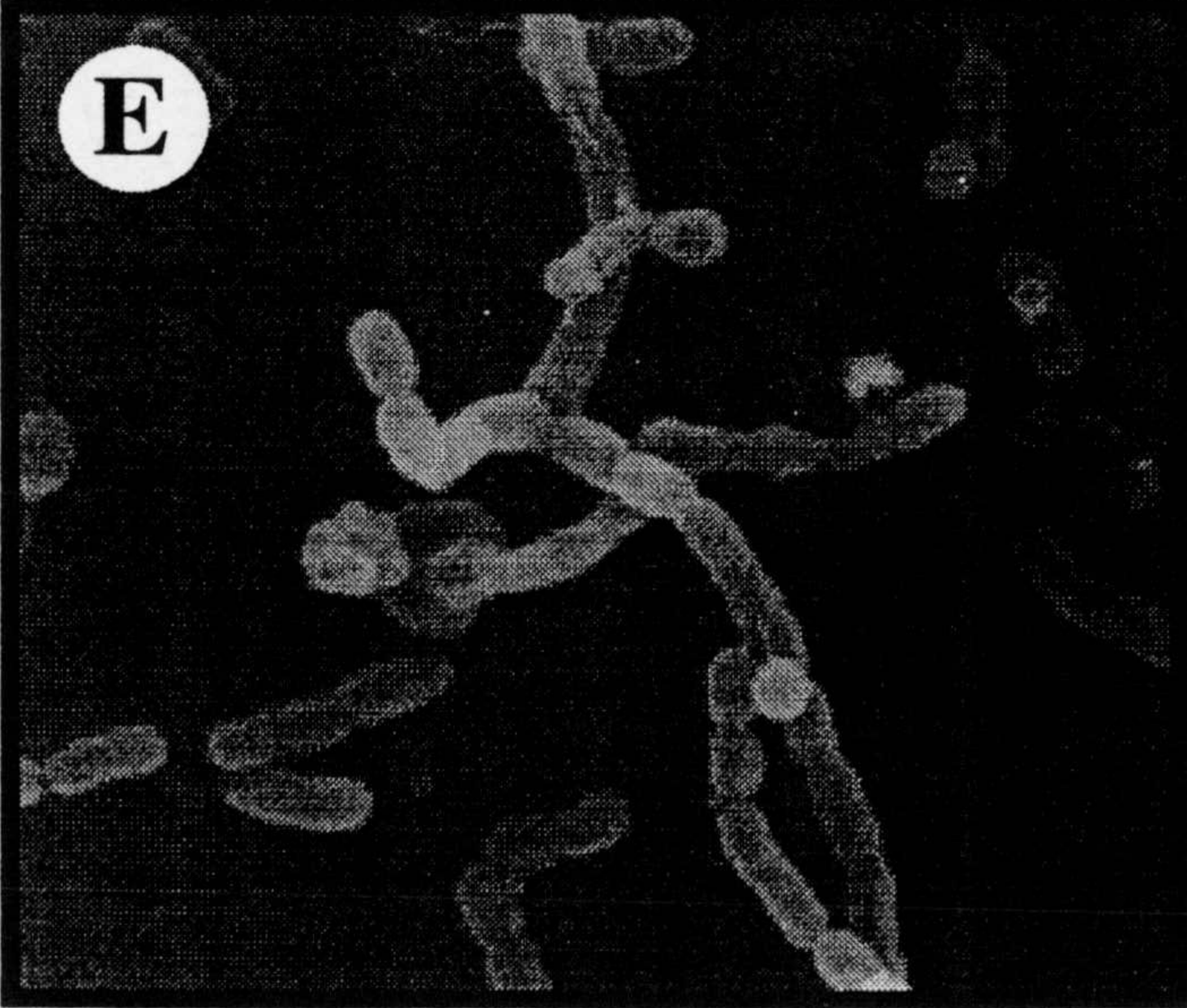
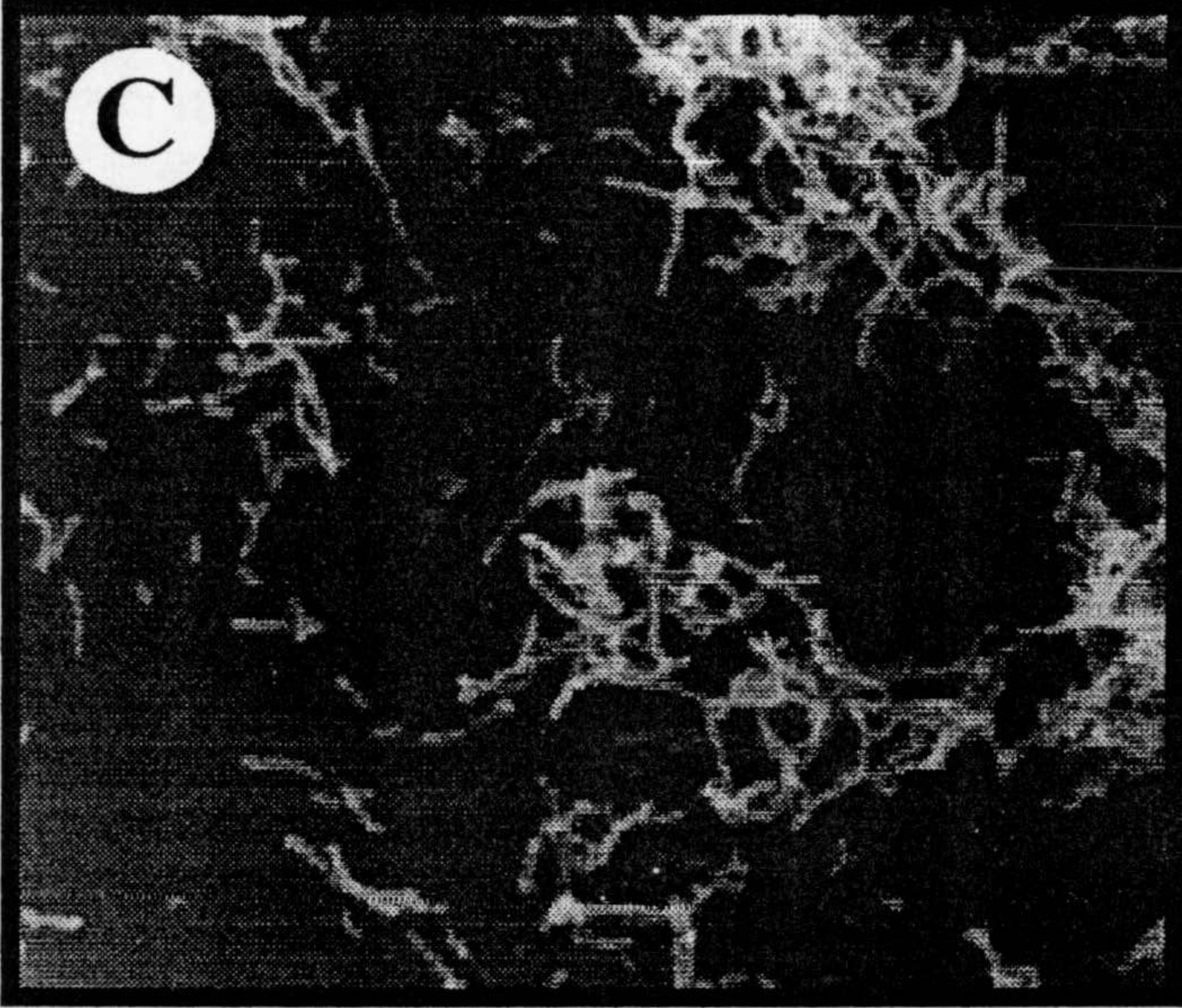
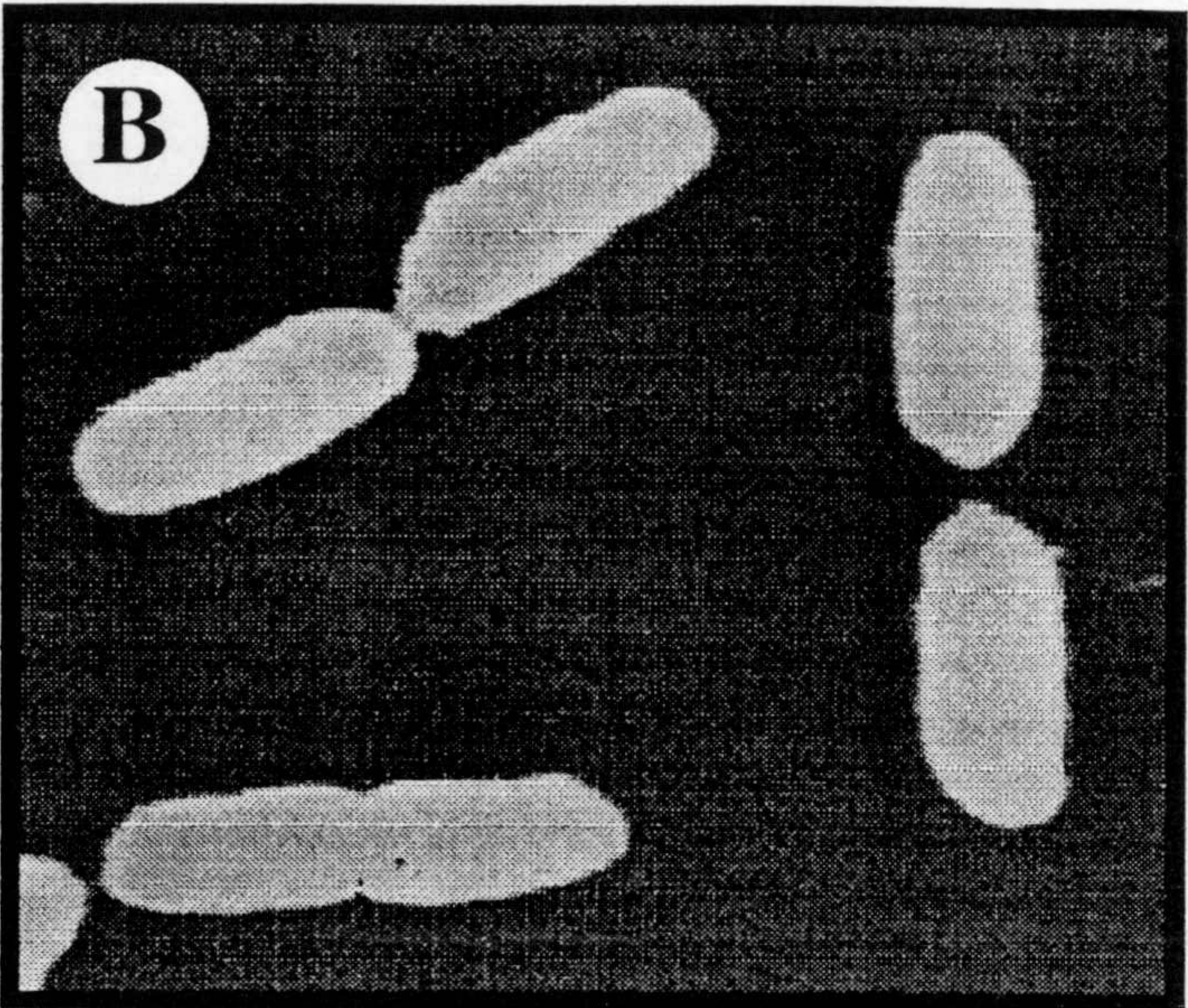
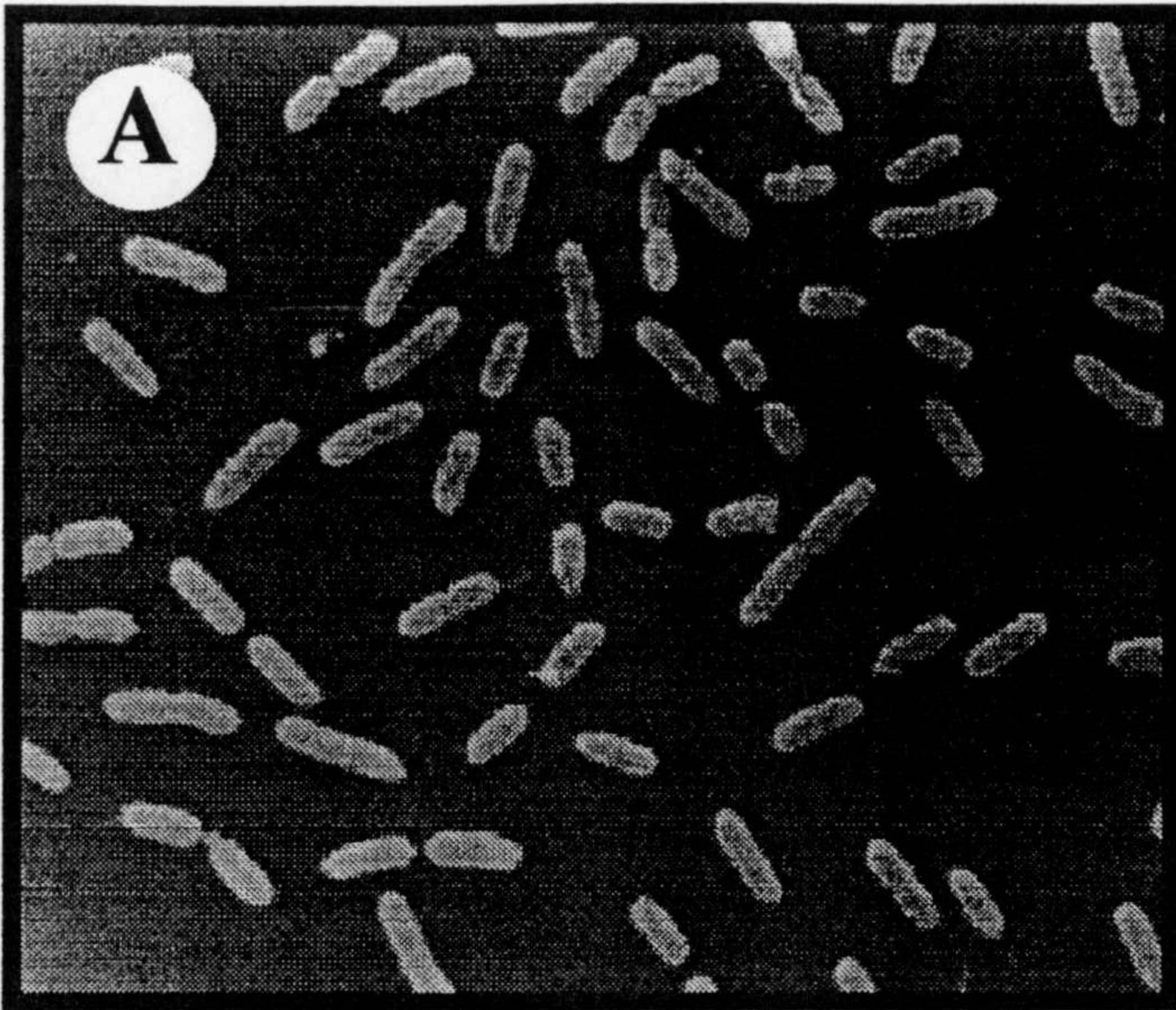


FIGURA 19. Microscopía electrónica de barrido de células de *P. putida* 14G3 y *P. putida* EEZ40. Células de *P. putida* EEZ40 (A y B) o *P. putida* 14G3 (C-F) se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar una DO_{660} de 0,7 en el caso de la cepa mutante y de 0,5 en el caso de la parental. Las muestras se prepararon como se indicó en el apartado 8.3 de la sección *Materiales y Métodos*, y se observaron al microscopio electrónico de barrido. Aumentos: (A) x 3.000, (B) x 15.000, (C) x 1.000, (D) x 3.000, (E) x 5.000, (F) x 20.000.

se observaron filamentos celulares en aquellas ocasiones en las que las células del filamento se encontraban en el mismo plano de corte (Fig. 20C). Paralelamente, cuando los cultivos en medio LB de ambas cepas alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, se diluyeron 10 veces en medio LB sin NaCl, de manera que la concentración final de NaCl quedó ajustada a 0,1% (p/v). Tras 30 minutos, las células se analizaron por microscopía electrónica de transmisión como se describió anteriormente. Mientras que la apariencia de las células de la cepa parental fue muy similar a la descrita anteriormente para las células cultivadas en medio LB con 1% (p/v) de NaCl (no mostrado), la mayoría de las células de la cepa mutante aparecieron lisadas, con el contenido citoplásmico disperso en el medio extracelular (Fig. 20F). Todas estas observaciones sugieren que el mutante 14G3 posee una membrana externa muy frágil.

2. CLONACIÓN DEL GEN DE *P. putida* 14G3 INTERRUMPIDO POR EL MINITRANSPOSÓN, Y RECUPERACIÓN DEL GEN SILVESTRE

La clonación y posterior secuenciación del gen mutado en *P. putida* 14G3 la realizó la doctora María Isabel Ramos González (1993). Para clonar la mutación de *P. putida* 14G3 se construyó una genoteca de esta cepa en el cósmido pLAFR3 (Ramos-González, 1993; Rodríguez-Herva *et al.*, 1996). De forma resumida, el ADN total de la cepa 14G3 se aisló y se digirió parcialmente con *Pst*I para obtener fragmentos con un tamaño medio de 20-25 kb. Posteriormente, estos fragmentos se ligaron con el cósmido pLAFR3 linearizado con *Pst*I y, tras empaquetarlos en partículas de fago lambda, se utilizaron para transfectar *E. coli* HB101. Después, se seleccionaron los clones de la genoteca resistentes a tetraciclina y kanamicina. De esta forma, se obtuvo un plásmido, denominado pPRO6, que además del marcador de resistencia a kanamicina portaba el minitransposón completo junto con secuencias flanqueantes de ADN de *P. putida*. El transposón mini-Tn5*phoA* utilizado para la mutagénesis posee un sitio *Sph*I único, situado entre el gen '*phoA* y el gen de resistencia a kanamicina (Fig. 15). Utilizando este último gen como sonda, se realizó una hibridación contra el plásmido pPRO6 digerido con *Sph*I (no mostrado), encontrándose el gen de resistencia a kanamicina en un fragmento *Sph*I de 2,8 kb, de las

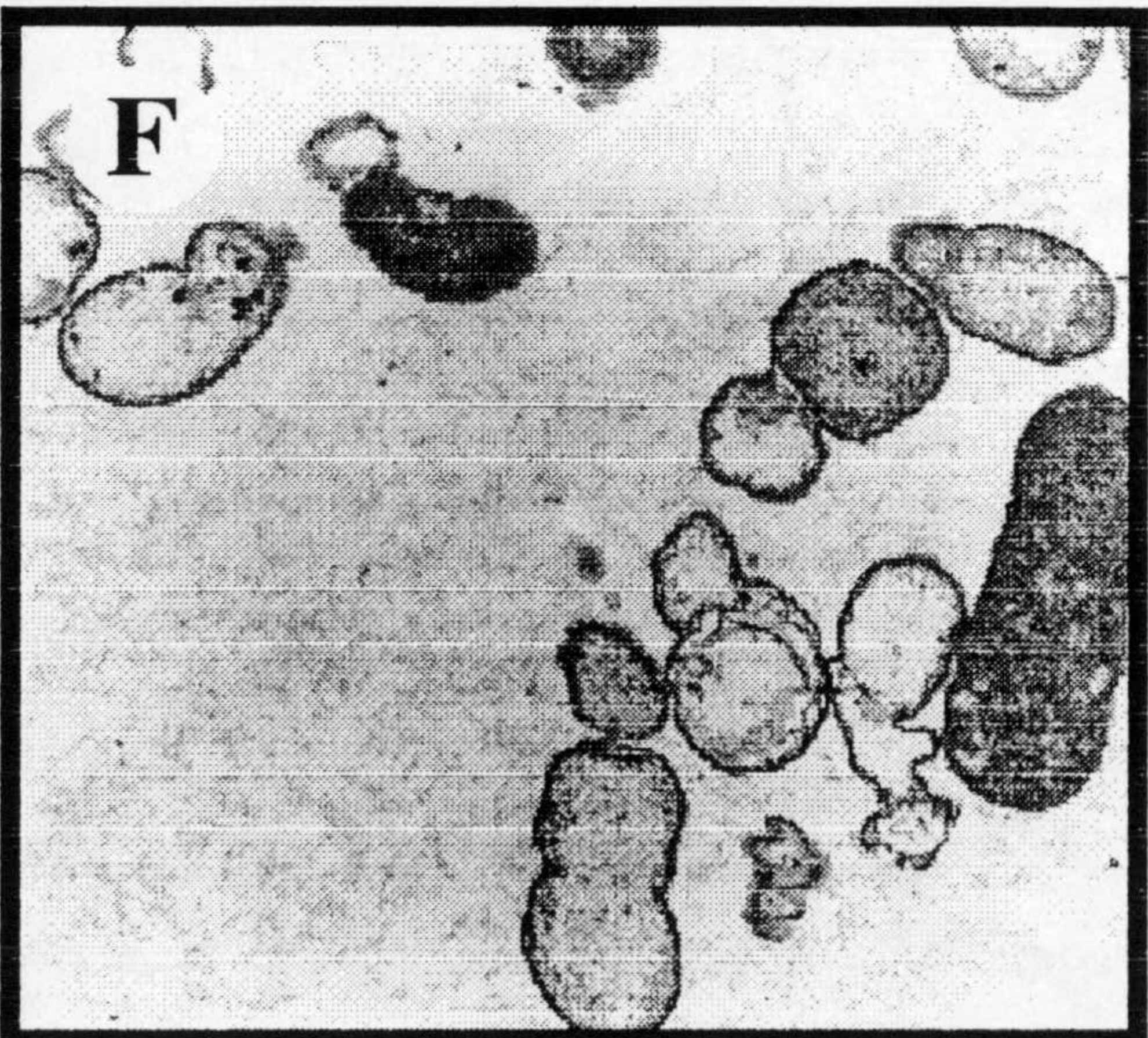
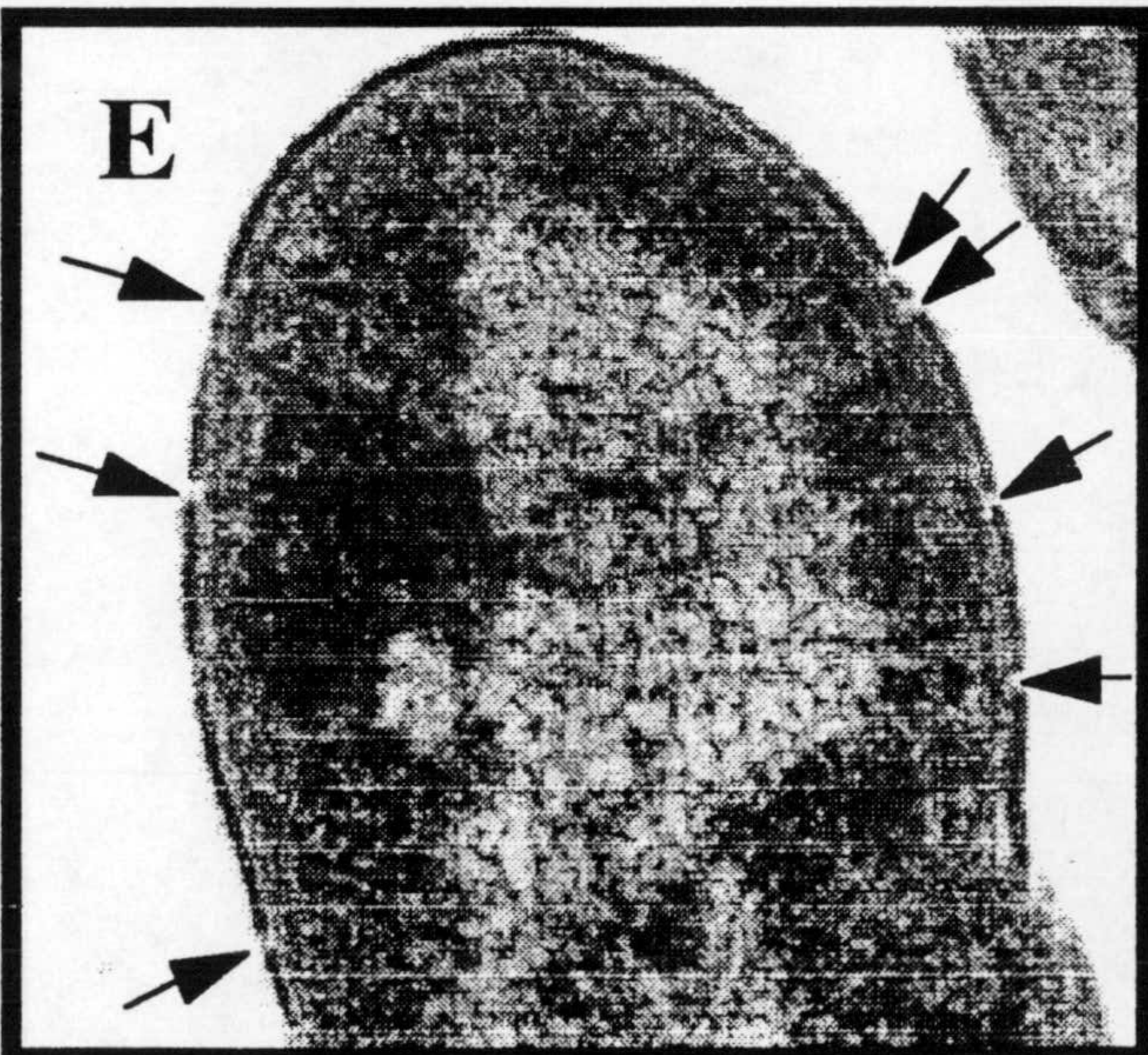
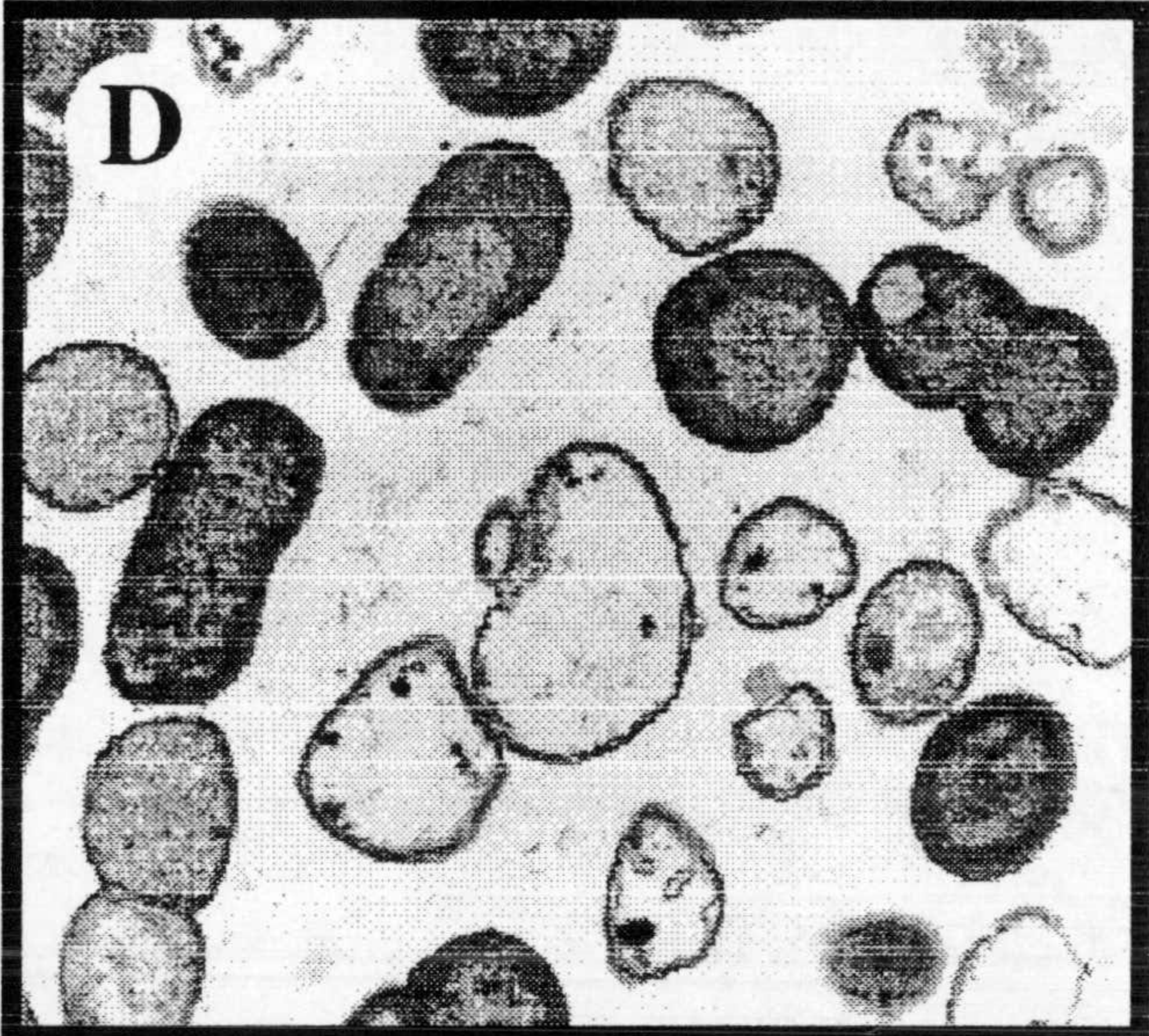
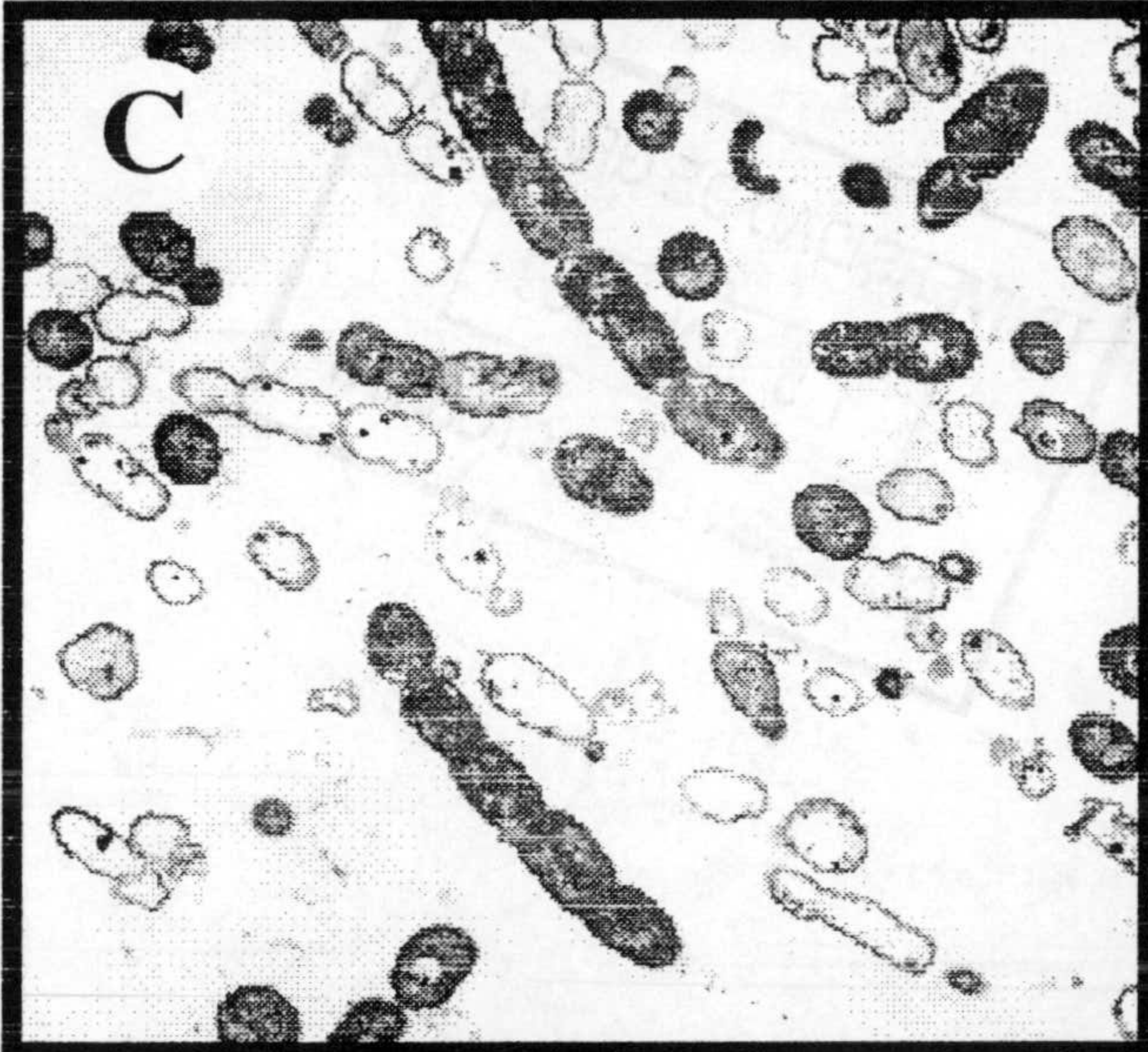
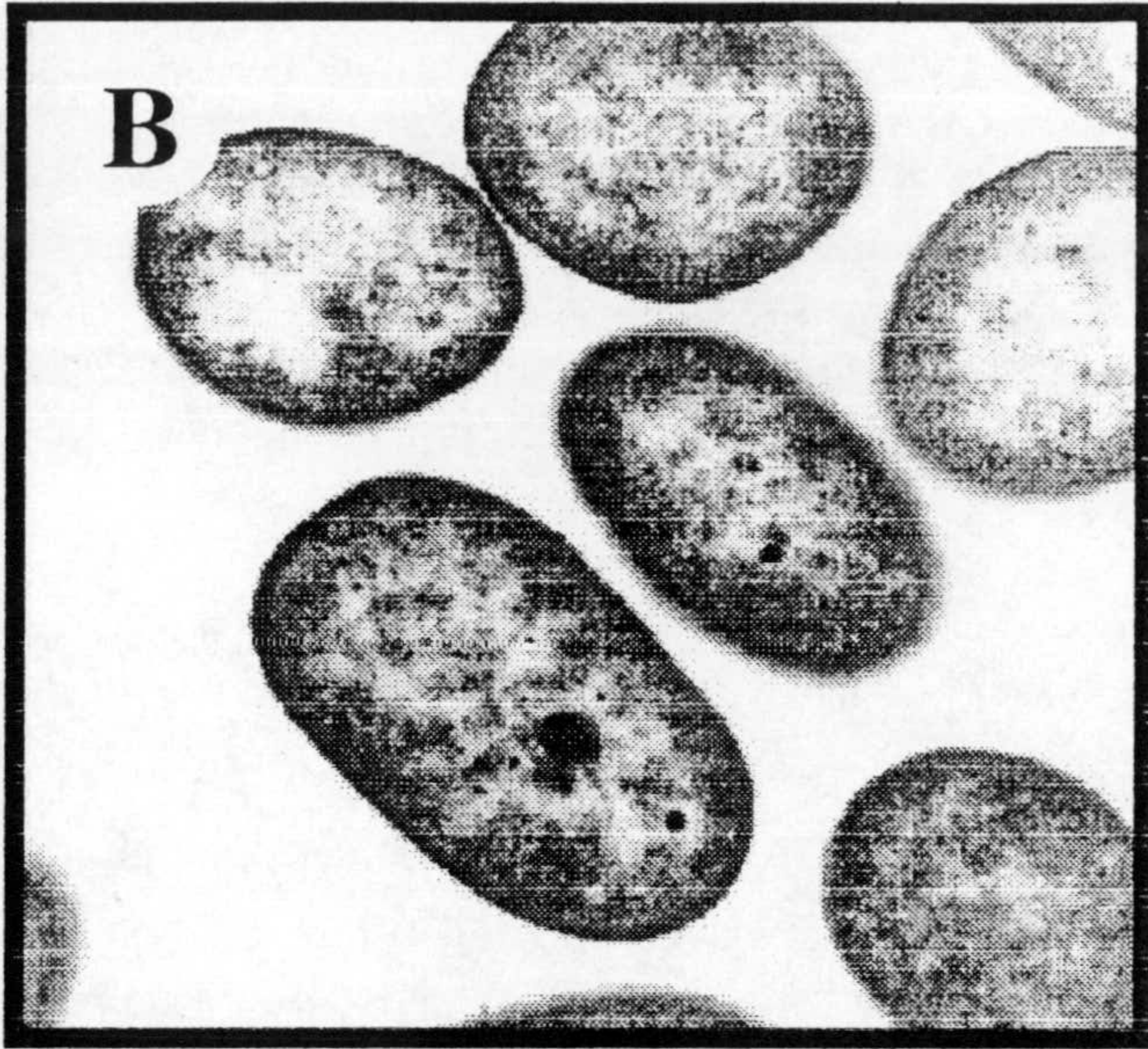
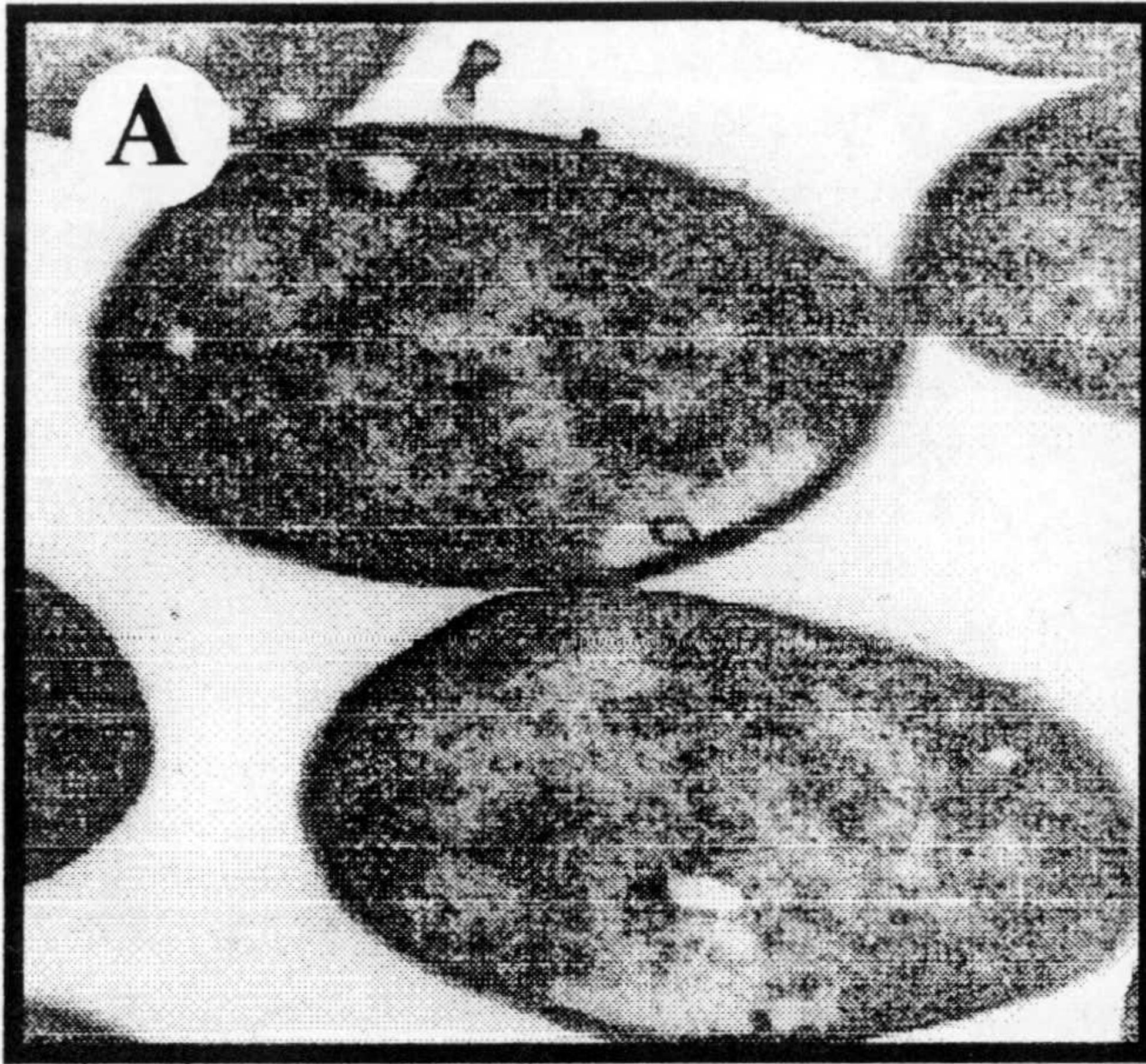


FIGURA 20. Microscopía electrónica de transmisión de células de *P. putida* 14G3 y *P. putida* EEZ40. Las células de *P. putida* EEZ40 (A y B) se cultivaron en medio LB líquido. (A) Fase exponencial, x 40.000. (B) Fase estacionaria, x 40.000. Las células de *P. putida* 14G3 (C-F) también se cultivaron en medio LB líquido. (C) Fase exponencial, x 4.400. (D) Fase estacionaria, x 16.000. (E) Detalle de una célula de la cepa 14G3 en fase estacionaria, x 100.000. Las flechas indican discontinuidades de la membrana externa. (F) Células mutantes tras someterlas a un choque salino hipotónico, x 12.000.

cuales aproximadamente 1,2 kb correspondían a ADN flanqueante de *P. putida*. Este fragmento de 2,8 kb se subclonó en el sitio *SphI* de pBR322, dando lugar al plásmido pPRO63. Un fragmento *NotI-SphI* de 1,2 kb de pPRO63, que llevaba el ADN de *P. putida* flanqueante al gen de la kanamicina, se utilizó como sonda para encontrar el gen silvestre en una genoteca de la cepa parental (construida de manera análoga a la anterior). Mediante hibridación en colonias se encontró, entre más de 10.000 clones analizados, un único clon que hibridaba con la sonda. El plásmido portado por este clon se denominó pPRO50. Cuando el fragmento *NotI-SphI* de 1,2 kb de pPRO63 se utilizó como sonda frente al plásmido pPRO50 digerido con *SphI*, se encontró una señal de hibridación positiva con un fragmento *SphI* de 2,3 kb.

3. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN DE *P. putida* 14G3 POR EL CÓSMIDO QUE PORTA EL GEN SILVESTRE

El cósmido pLAFR3 y su derivado pPRO50, que portaba el gen silvestre, se transfirieron mediante conjugación "tripartita" a *P. putida* 14G3. Los transconjugantes se seleccionaron en medio sólido LB suplementado con kanamicina y tetraciclina. *P. putida* 14G3 (pLAFR3) y *P. putida* 14G3 (pPRO50) se cultivaron en medio LB líquido (1% [p/v] de NaCl) y en medio LB líquido con 0,1% (p/v) de NaCl. La cepa que llevaba el plásmido pPRO50 creció en ambos medios, alcanzando los cultivos una turbidez final similar a la alcanzada por la cepa parental. Además, en ningún momento se detectó la presencia de grumos en los cultivos. Por su parte, la cepa mutante con el plásmido control pLAFR3 se comportó de manera similar a la cepa 14G3 sin plásmido (Fig. 21). En contraste con estos resultados, el plásmido pPRO50 no complementó los fenotipos de sensibilidad a SDS, EDTA y deoxicolato de la cepa mutante.

4. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL FRAGMENTO CLONADO

El fragmento *SphI* de 2,3 kb de pPRO50 que produjo una señal de hibridación positiva con el ADN adyacente al gen de resistencia a kanamicina, se subclonó en pUC18

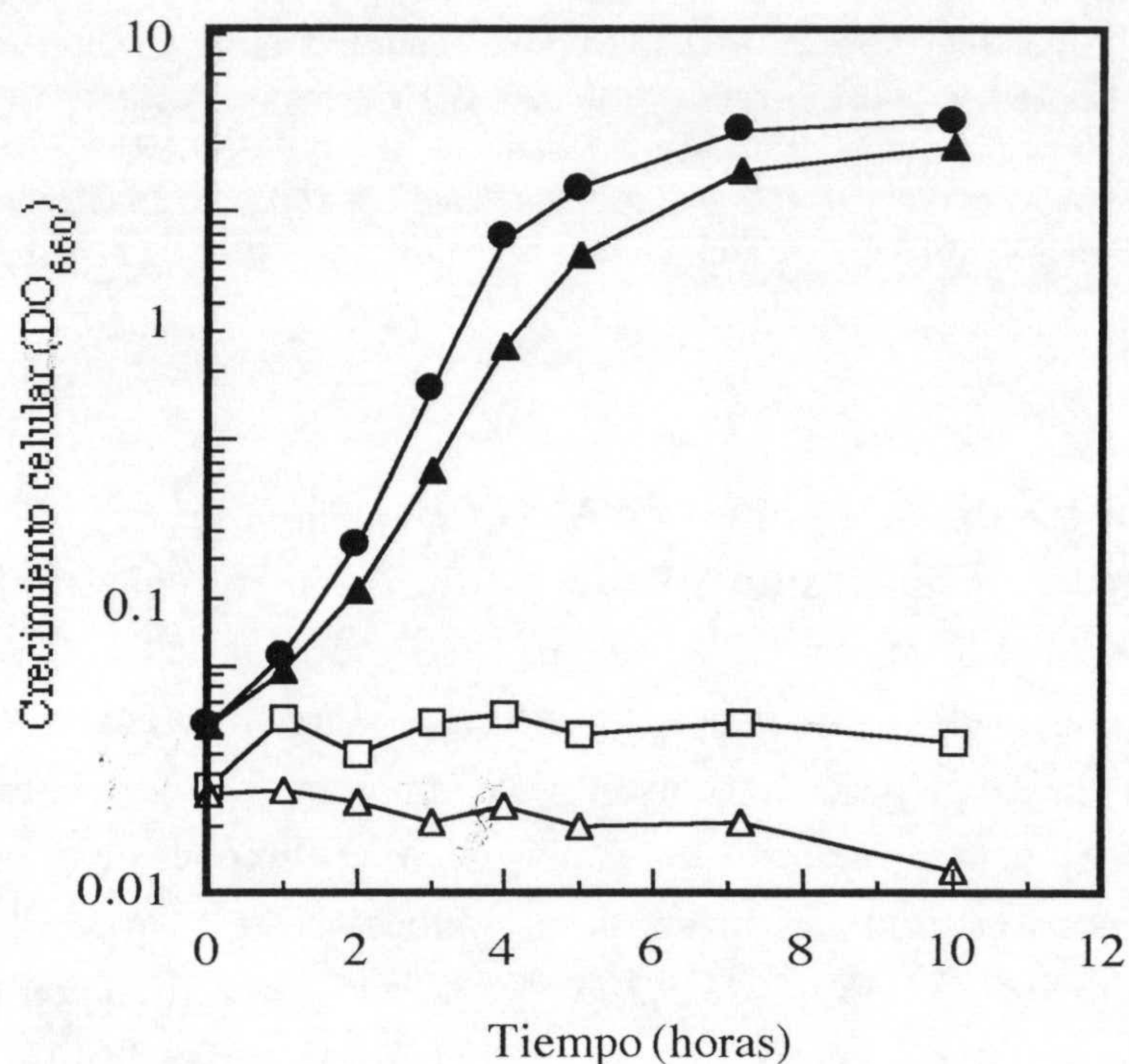


FIGURA 21. Crecimiento de *P. putida* 14G3 complementada con pPRO50, en medio LB con 0,1% (p/v) de NaCl. *P. putida* EEZ40 (círculos cerrados), *P. putida* 14G3 (cuadrados), *P. putida* 14G3 (pLAFR3) (triángulos abiertos) y *P. putida* 14G3 (pPRO50) (triángulos cerrados) se cultivaron durante toda la noche en medio LB con 1% (p/v) de NaCl. Entonces, parte de este cultivo, se utilizó para inocular medio LB con 0,1% (p/v) de NaCl, suplementado con los antibióticos adecuados, a una DO_{660} inicial de 0,02 - 0,04. La turbidez del cultivo se determinó a los tiempos indicados. DO_{660} , densidad óptica a 660 nm.

dando lugar a pPRO200. Comparando los patrones de restricción entre pPRO63 y pPRO200 se determinó que el sitio *Sph*I que en pPRO63 se hayaba corriente abajo del gen de resistencia a kanamicina, correspondía al sitio *Sph*I adyacente al sitio *Hind*III de pPRO200 (Fig. 22). A partir de este sitio *Sph*I de pPRO200 se secuenciaron aproximadamente 1,6 kb del inserto (Fig. 23). El punto donde se insertó el minitransposón se determinó secuenciando la zona correspondiente del inserto de pPRO63. El transposón se localizó entre las posiciones 463 y 464 de la secuencia indicada en la Fig. 23. El fragmento secuenciado poseía un 59,3% de G+C, porcentaje similar al determinado para el ADN de *P. putida* (60% G+C). En dicha secuencia se encontraron dos posibles regiones codificantes que se denominaron *orf1* y *orf2* (Fig. 23).

Corriente abajo de *orf2*, entre los nucleótidos 1.463 y 1.485, se encontró una estructura en forma de horquilla ($\Delta G^\circ = -19,2$ kcal [-80,3 kJ]) típica de terminadores de la transcripción independientes de Rho.

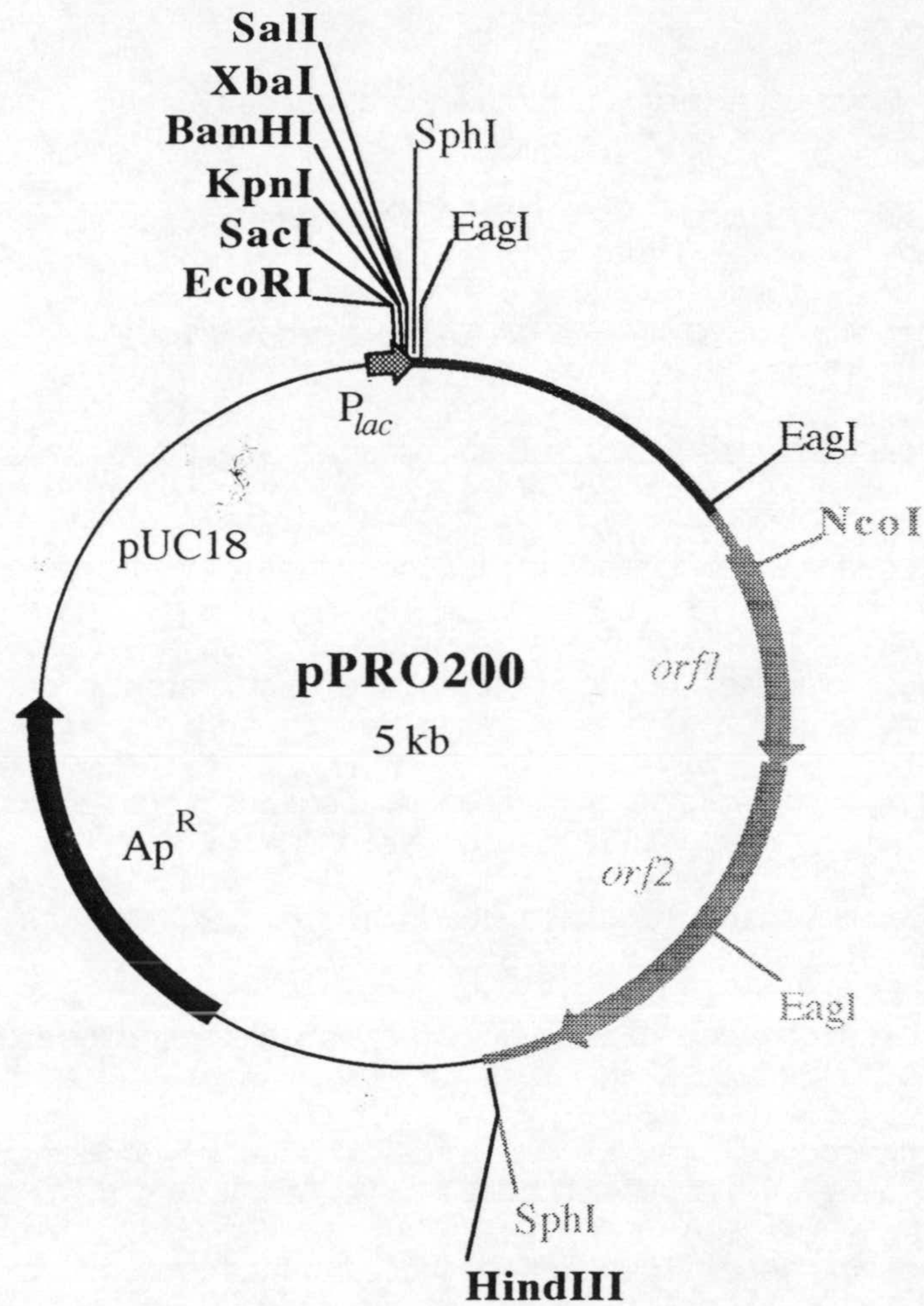


FIGURA 22. Mapa del plásmido pPRO200. En el mapa se muestran los sitios de restricción más relevantes. Los sitios resaltados en negrita son únicos en pPRO200. Las regiones pertenecientes al vector de clonación (pUC18) se indican en color negro. El inserto *SphI* de 2,3 kb de *P. putida* se indica en color azul. En color azul claro se señala la región secuenciada (que se detalla en la Fig. 23) y en azul oscuro la región sin secuenciar. También se indican el gen de resistencia a ampicilina, el promotor P_{lac} , y las dos posibles regiones codificantes (*orf1* y *orf2*) encontradas en la región secuenciada. Las flechas indican el sentido de la transcripción.

Resultados - Capítulo I

1 GTGAGGCTCCCACTTCTACCGCTCAAGGCGAAGTCAGAGAACCGTCCTGGTCCCCTTACCTGAACTGATTGCGGCGTAA

81 TACATTTTGCTTAACACACTGGGGTTTCATTAGGAGTTTCACGATGGAAATGCTGAAGTTTGGTAAATTTGCTGCGCTGG
M E M L K F G K F A A L

NcoI

161 CTCTGGCCATGGCCGTAGCTGTAGGTTGCTCCTCGAAGGGCGGTGATAACGCAGGCGAAGGCGCTGCTGTAGACCCTAAC
A L A M A V A V G / C S S K G G D N A G E G A A V D P N

241 GCTGGCTACGGTGCCAACACTGGCGCTGTTGACGGCTCCCTGAGCGAAGAAGCCGCCCTGCGCGCAATCACCACCTTCTA
A G Y G A N T G A V D G S L S E E A A L R A I T T F Y

321 CTTCGAATACGACAGCTCGGACCTGAAGCCAGAAGCCATGCGCGCTCTGGACGTTACGCCAAGGACCTGAAAGCCAACG
F E Y D S S D L K P E A M R A L D V H A K D L K A N

401 GCAACCGTGTGTTCTGGAAGGTAACACCGACGAGCGGGCACCCGCGAGTACAACATGGCTCTGGGTGAGCGTCGTGCG
G N R V V L E G N T D E R G T R E Y N M A L G E R R A

481 AAAGCCGTTTCAGCGCTACCTGGTTCTGCAGGGCGTTTCCCCTGCTCAGCTGGAAGTGGTTTCTACGGCGAAGAGCGTCC
K A V Q R Y L V L Q G V S P A Q L E L V S Y G E E R P

561 AGTTGCTACCGGCAACGACGAGCAGTCCTGGGCTCAGAACCCTCGCGTAGAACTGCGTAAGTAAGTTCTTATGCGTATGT
V A T G N D E Q S W A Q N R R V E L R K *** M R M

641 GCCGCCGTGTAGTAACCGTCTCGCACTCAGCCTGCCGCTTGCGGCCTGGGCTGAGGTCCCTGTAGTAGATGACAACGCA
C R R V V T V L A L S L P L A A W A / E V P V V D D N A

721 GGCAGCTATCCGCTGCGGGTTATGGCACGAGCGGCGCCTATGCCGGGTCAGGGGCTTCGGCCCCTGCCTCTGCACAGGG
G S Y P P A G Y G T S G A Y A G S G A S A P A S A Q G

801 CCAGCTGTTTCATGCAGCTGCAACAGATGCAGGATCAGCTTTCCCGCCAGCAAGGCATCATCGAAGAGCTGCAAAACGATG
Q L F M Q L Q Q M Q D Q L S R Q Q G I I E E L Q N D

881 TGTCCCGCATGAAGCAGGAAAACCTGGAGCGTTACCAGGACCTGGACCGTCGCATCAACAGTGGCGCTGCGCCTGCCGCA
V S R M K Q E N L E R Y Q D L D R R I N S G A A P A A

961 ACCCCTGACAATTCCTCCGGTGGTGGCGCGTCCAATGCCGCCCCGATGCCGCAGCAGGTGCTGCTGCGCAACAACCGGC
T P D N S S G G G A S N A A P D A A A G A A A Q Q P A

1041 CCGCAGTAGCCAGCCCGGTGATCCGGCGAAAGAGAAGCTCTATTACGACGCAGCTTTCGACCTGATCAAACAGAAAGACT
G S S Q P G D P A K E K L Y Y D A A F D L I K Q K D

1121 TCGACAAGGCCAGCCAGGCGTTCAACGCCTTCCTGCGCAAGTACCCCAACAGCCAGTACGCCGGTAATGCCCAATACTGG
F D K A S Q A F N A F L R K Y P N S Q Y A G N A Q Y W

1201 TTGGGTGAAGTGAACCTGGCCAAGGGTGACCTGCAAGGCGCCAGCCAGGCCTTTGCCAGGTCAGCCAAAAGTACCCGAA
L G E V N L A K G D L Q G A S Q A F A Q V S Q K Y P K

1281 GCACAGCAAGGTGCCAGATTCGCTGTACAACTGGCTGATGTCGAGCGCCGTATGGGCCATAACCGACAAGGTAAAAGGCA
H S K V P D S L Y K L A D V E R R M G H T D K V K G

1361 TCCTTCAGCAGGTCGTGACCCAGTACCCCGGCACCTCTGCCGCTCAACTGGCCCAGCGTGACCTGCAGAAGCTCTAGGCG
I L Q Q V V T Q Y P G T S A A Q L A Q R D L Q K L ***

1441 TTGTCGCTGTACCGCTCGAAAGAAACCCGCGCCAGTCGCGGGTTTTTTTCGTTAGAATCACTGCCCTTTTTTCGTAAACAC
→ ←

1521 GCTGCTGCGGATAACGCTATGTGCGAGTCCGCGACAGTGCCTGACGGAGGCGGACAGCCTGTTTAGCTGTCACGCCCGTGG

1601 CGAGCATGC
SphI

FIGURA 23. Secuencia de la región de ADN donde se insertó el transposón mini-Tn5 $phoA$ en *P. putida* 14G3 y traducción de la misma. Se muestran la secuencia de ADN de *orf1* y *orf2* junto con sus secuencias de aminoácidos correspondientes (cada aminoácido se indica debajo de la base central del codón que lo codifica). El sitio *SphI* (posición 1.604) está situado contiguo al sitio *HindIII* de pPRO200 (ver Fig. 22). El sitio *NcoI* (posición 167) se utilizó para provocar la aparición de un codón de terminación prematuro en el gen *orf1* que, posteriormente, se usó en ensayos de transcripción y traducción *in vitro*. El triángulo de color negro indica el punto donde se produjo la fusión con PhoA tras la mutagénesis. El triángulo sombreado indica el punto utilizado para la construcción de la fusión Orf2- PhoA . Las barras inclinadas, "/", entre los aminoácidos G y C de Orf1, y A y E de Orf2, indican los sitios de corte propuestos para el procesamiento de los correspondientes péptidos señal. El símbolo "***" indica un codón de terminación. El número de acceso para esta secuencia en la base de datos GenBank es X74218.

La región *orf1*, localizada entre los nucleótidos 124 y 624 (Fig. 23), codificaría un polipéptido de 166 aminoácidos con un peso molecular estimado de 17.821 Da. El polipéptido propuesto poseía alanina como aminoácido más abundante (15,1% del total), y era relativamente rico en aminoácidos cargados (D, E, K y R), que sumaban el 26,4% del total. El perfil de hidrofobicidad de dicho polipéptido, predecía la presencia de un segmento hidrofóbico amino terminal, siendo el resto de la proteína de carácter marcadamente hidrofílico (Fig. 24). En el extremo amino terminal, el programa SignalP (ver sección *Materiales y Métodos*) predijo la existencia de un péptido señal de 21 aminoácidos con características muy similares a las de los péptidos señal típicos de lipoproteínas (Braun y Wu, 1994; Pugsley, 1993). Así, los aminoácidos de la región -1 a

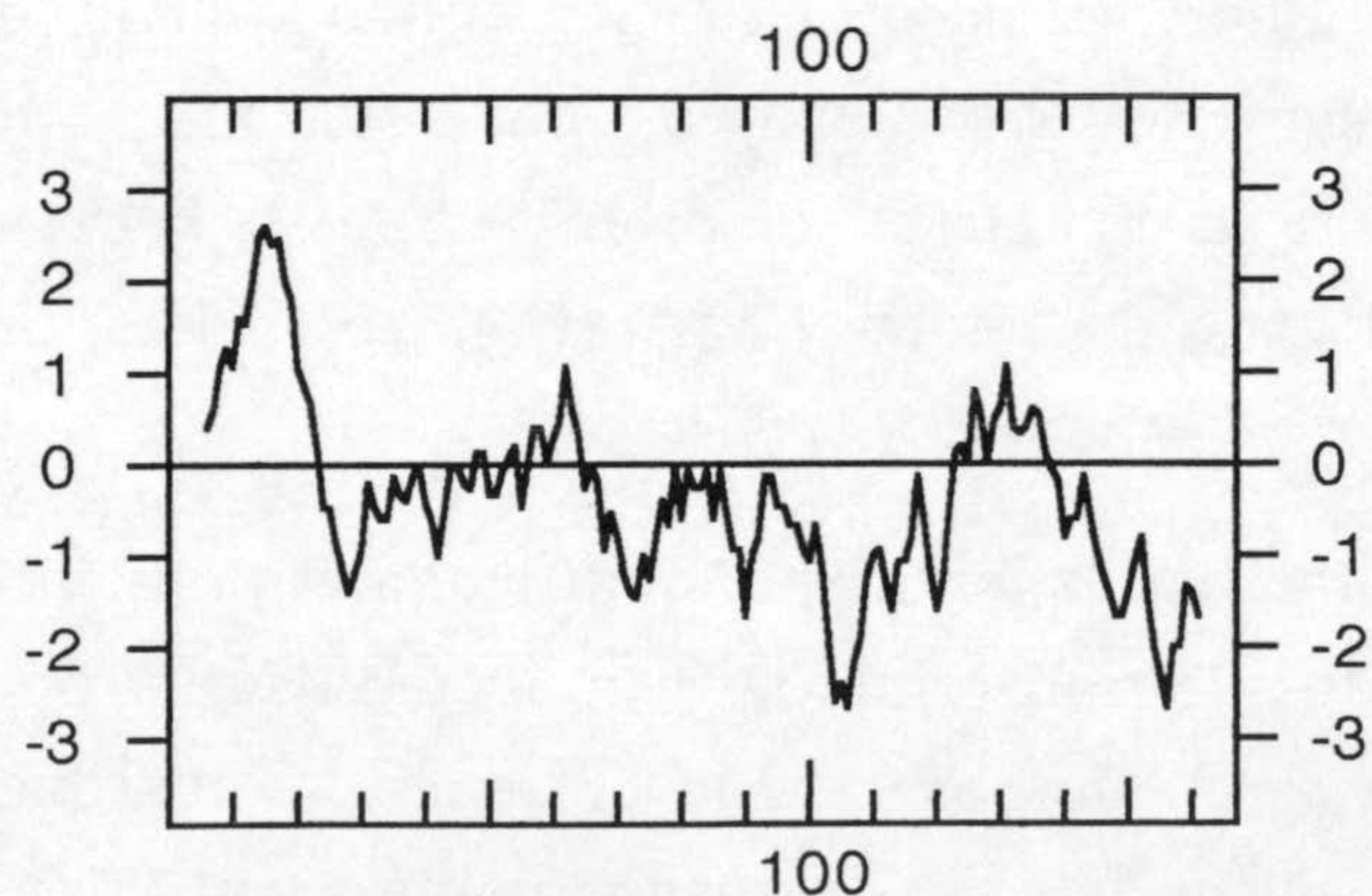


FIGURA 24. Perfil de hidropatía de Orf1. El perfil de hidrofobicidad de Orf1 se generó siguiendo el método de Kyte y Doolittle (1982). En el eje horizontal se indica la posición de los residuos de aminoácidos, mientras que en el eje vertical se indica la hidrofobicidad relativa. Los valores positivos indican hidrofobicidad y los negativos hidrofilicidad.

+3 (GCSS) coinciden con los de la secuencia consenso. Por otro lado, aunque la posición -3 está muy conservada (suele ser leucina en el 81% de los casos), también puede ser alanina con un 3% de probabilidad (Braun y Wu, 1994). El punto de procesamiento propuesto estaría entre la glicina de la posición 21 y la cisteína de la 22 (Fig. 25). Tras dicho procesamiento, la proteína tendría un tamaño de 145 aminoácidos con un peso molecular de 15.671 Da.

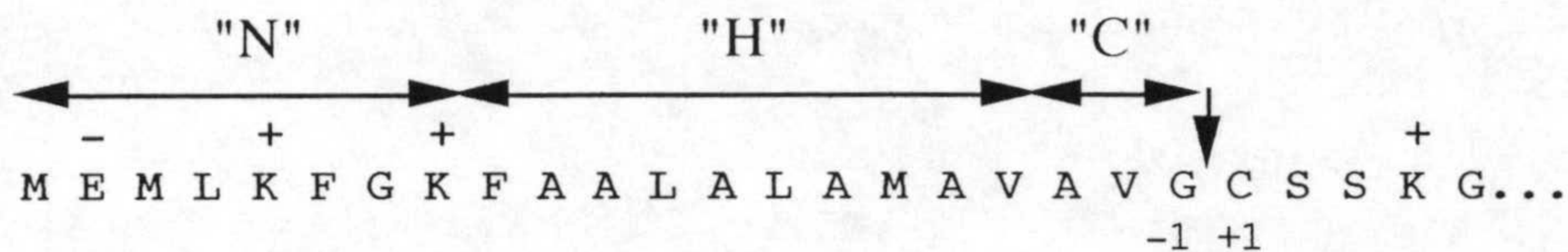


FIGURA 25. Estructura primaria de la región amino terminal de Orf1 y del supuesto péptido señal. Sobre la secuencia de aminoácidos se indican los tres dominios que se diferencian en un péptido señal: un dominio polar con carga neta positiva (el dominio "N"), una región central hidrofóbica (el dominio "H") y un dominio "C", normalmente menos hidrofóbico, que contiene las señales que reconoce la peptidasa encargada del corte. Los símbolos "+" y "-" que se encuentran encima de algunos aminoácidos indican que éstos poseen carga neta positiva o negativa a pH fisiológico, respectivamente. La flecha vertical indica el sitio de procesamiento propuesto. La numeración "-1", "+1" se refiere a la posición de los aminoácidos con respecto a dicho sitio de corte. Así, el aminoácido de la posición "+1" se convertiría en el primer aminoácido de la proteína madura.

En el mutante *P. putida* 14G3, como resultado de la inserción del mini-Tn5*phoA* se habría formado una proteína de fusión Orf1-PhoA con los 113 primeros aminoácidos de Orf1 y los 462 restantes de PhoA. El peso molecular estimado de la proteína de fusión fue de 60.284 Da sin procesar y de 58.134 una vez procesada. Dicha proteína de fusión se detectó inmunológicamente en un extracto de proteína total de la cepa mutante usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra PhoA (Fig. 26). El tamaño aparente del producto detectado fue similar al esperado.

Para confirmar que *orf1* verdaderamente codificaba el polipéptido predicho, se realizaron ensayos acoplados de transcripción y traducción *in vitro* con el plásmido pPRO200. En la figura 27 se puede observar la presencia de una banda con un peso molecular aparente de 18 kDa en la calle correspondiente a pPRO200. Esta banda no estaba presente en la calle correspondiente al control negativo pUC18. Con el fin de confirmar que verdaderamente la banda de 18 kDa correspondía al producto del gen *orf1*, el plásmido pPRO200 se linearizó cortando en un sitio *NcoI* único, dentro de *orf1* (ver Fig. 22 y 23). Después, los extremos de cadena sencilla generados tras el corte se

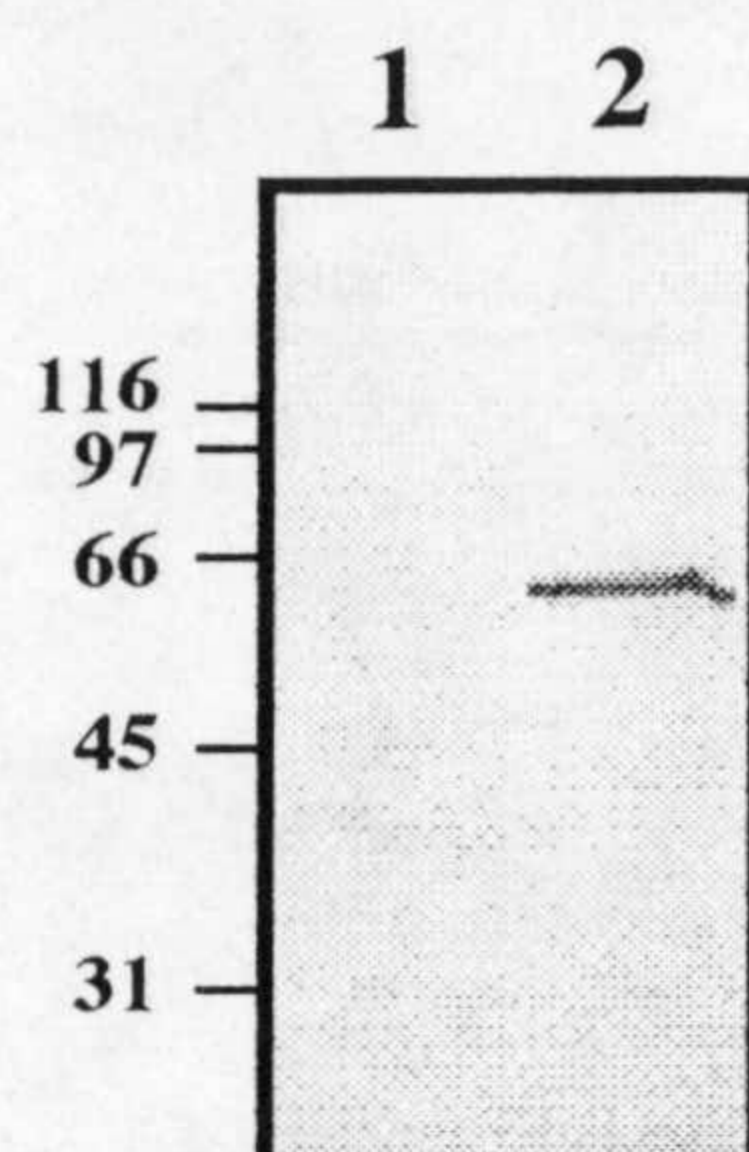


FIGURA 26. Inmunodetección de Orf1-PhoA en lisado celular total de *P. putida* 14G3. *P. putida* 14G3 y su cepa parental se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0,6. Las células se recogieron por centrifugación y se prepararon extractos de proteína celular total. Las proteínas se separaron por EGPA-SDS en un gel al 10% (p/v) de poliacrilamida. Después, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se detectaron utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína PhoA de *E. coli*, como se describió en el apartado 14 de la sección *Materiales y Métodos*. (1) *P. putida* EEZ40, (2) *P. putida* 14G3. En el margen izquierdo se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular en kDa.

rellenaron con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, y el plásmido lineal se ligó sobre sí mismo originándose el plásmido pPRO200SN. Los 4 pb extras introducidos al rellenar provocaron un cambio de fase de lectura que condujo a la aparición de un codón de terminación prematuro, a consecuencia del cual *orf1* codificaría ahora un péptido de 28 aminoácidos. Como se esperaba, en la calle correspondiente a pPRO200SN no se detectó la banda de 18 kDa (Fig. 27).

La supuesta región codificante *orf2* se localizó entre las posiciones 631 y 1.437 (Fig. 23), y codificaría un polipéptido de 268 aminoácidos con un peso molecular estimado de 28.712 Da. Dicho polipéptido poseía un 15,7% de alanina y un 10,8% de glutamina como aminoácidos más abundantes, además de un 19,8% de aminoácidos cargados (D, E, K y R). El perfil de hidropatía de Orf2 predijo una proteína de carácter hidrofílico con un segmento amino terminal hidrofóbico (Fig. 28). En este segmento, el programa SignalP (ver sección *Materiales y Métodos*) predijo la existencia de un péptido señal de 21 aminoácidos de acuerdo con la regla -3, -1 (von Heijne, 1986). En dicho péptido se podía diferenciar claramente un dominio "N" con carga neta positiva, un dominio "H" hidrofóbico y un dominio "C" que se ajustaba a las características del péptido señal estándar, con residuos neutros de pequeño tamaño en las posiciones -1 y -3, concretamente alanina (muy conservada en dichas posiciones, con un 86,1% y 58,7% de

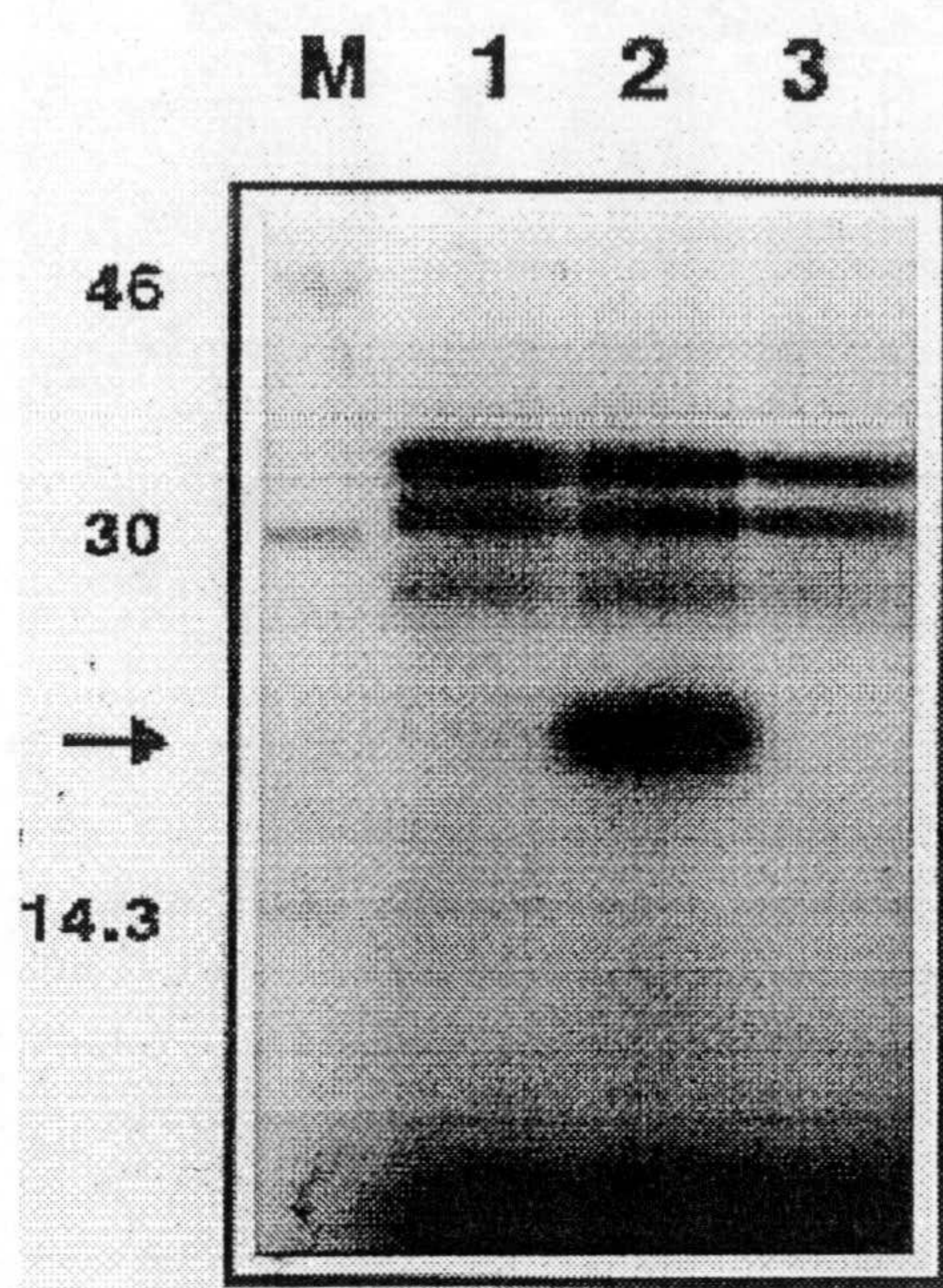


FIGURA 27. Autorradiografía de los ensayos de transcripción y traducción *in vitro* de pUC18, pPRO200 y pPRO200SN. Los ensayos se realizaron como se explicó en el apartado 9 de la sección *Materiales y Métodos*, usando aproximadamente 1 μ g de ADN de cada uno de los plásmidos antes mencionados. Para el marcaje de los polipéptidos se usó L-[35 S]metionina. Los productos resultantes se separaron por EGPA-SDS en un gel al 17,5% (p/v) de poliacrilamida. (M) Marcadores de peso molecular; los tamaños correspondientes en kDa se indican en el margen izquierdo. (1) pUC18. (2) pPRO200. (3) pPRO200SN. La flecha indica el producto de 18 kDa.

probabilidad, respectivamente). Además, en la posición -6 suele haber un residuo que induce giros β (P o G), y en Orf2 hay una prolina. El punto de procesamiento se situaría entre la alanina de la posición 21 y el ácido glutámico de la posición 22 (Fig. 29). La proteína procesada tendría un tamaño de 247 aminoácidos con un peso molecular de 26.374 Da.

Debido a la ausencia de un producto de 29 kDa en los ensayos de transcripción y traducción *in vitro* (Fig. 27), y para comprobar que *orf2* era realmente una región codificante, se construyó con ayuda del plásmido pUCH218 una fusión Orf2-PhoA. De esta forma, se comprobaría además si, como se deducía de la presencia de un péptido señal, *orf2* codificaba una proteína que se exportaba a la envoltura celular. Así, el plásmido pUCH218 se digirió con *KpnI* y los extremos 3' colgantes generados por esta enzima, se convirtieron en romos usando la ADN polimerasa del fago T4. Este ADN se ligó con el fragmento *EagI* de 1,04 kb de pPRO200 (ver Fig. 22) cuyos extremos se

orf2 es una región codificante cuyo producto es un polipéptido que se exporta a la envoltura celular y que, además, el residuo de la posición 137 está situado en el periplasma. En base a estos datos y al perfil de hidropatía se predice que *orf2* codifica una proteína periplásmica.

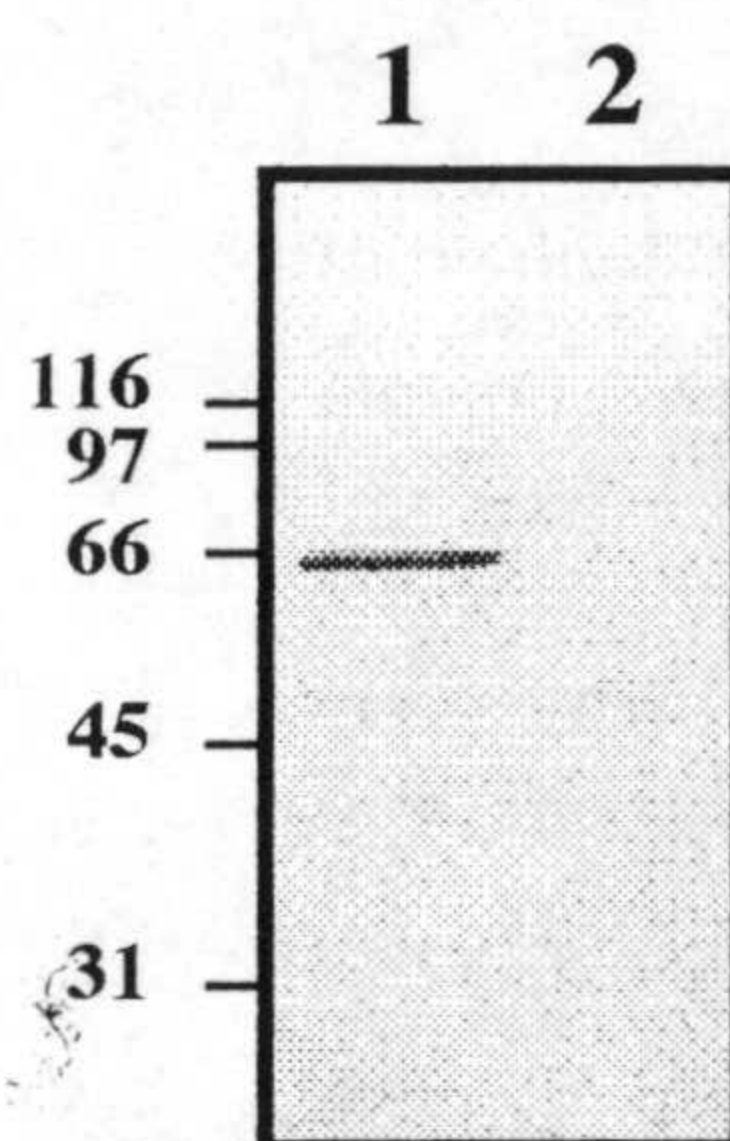


FIGURA 30. Inmunodetección de Orf2-PhoA en extracto celular total. *E. coli* CC118 (pUCHORF2) se cultivó en medio LB líquido hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0,6. Las células se recogieron por centrifugación y se preparó un extracto de proteína celular total. Las proteínas se separaron por EGPA-SDS en un gel al 10% (p/v) de poliacrilamida. Después, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se detectaron utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína PhoA de *E. coli*, como se describió en el apartado 14 de la sección *Materiales y Métodos*. (1) *E. coli* CC118 (pUCHORF2), (2) *E. coli* CC118. En el margen izquierdo se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular en kDa.

5. COMPARACIÓN DE Orf1 y Orf2 CON LAS SECUENCIAS DISPONIBLES EN LAS BASES DE DATOS

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a Orf1 y Orf2 se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos de proteínas Swiss-Prot y con secuencias de ADN traducidas de la base de datos del EMBL, usando el programa FASTA3 basado en el algoritmo de Pearson y Lipman (1988). También se usó el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), para la búsqueda de similitudes en las bases de datos de proteínas Swiss-Prot y PIR, y con secuencias de ADN traducidas de GenBank.

5.1. Comparación de Orf1 con secuencias de las distintas bases de datos

Cuando se comparó Orf1 con las secuencias de las distintas bases de datos (Agosto, 1995), se encontró que mostraba una alta similitud con las lipoproteínas asociadas al

peptidoglicano (PAL) de cuatro bacterias gram negativas: *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Brucella abortus* y *E. coli*. Además, también mostró similitud parcial con los dominios carboxilo terminales de proteínas tipo porinas, como OmpA de distintos microorganismos y OprF de varias pseudomonadáceas. Hoy día, existen al menos 19 genes *pal* secuenciados total o parcialmente. En la Tabla 4 se muestran dichos genes, junto con el porcentaje de identidad (a nivel de secuencia de aminoácidos) que presentaron con Orf1 de *P. putida*. Además, también se muestran otras proteínas que presentaron una similitud relevante con Orf1.

En la Figura 31 se muestra un alineamiento múltiple de Orf1 con parte de las proteínas listadas en la tabla anterior. La región carboxilo terminal, donde se ha propuesto la presencia del dominio de unión al peptidoglicano, fue la zona que presentó mayor grado de similitud. Además, la proteína Orf1 de *P. putida* también posee otros aminoácidos que se han señalado como altamente conservados entre los distintos miembros de la familia de proteínas asociadas al peptidoglicano (de Mot y Vanderleyden, 1994) (Fig. 31). Como se mostró en la Tabla 4, Orf1 también presentó similitud con proteínas tipo porinas como OprF y OmpA, que también están asociadas al peptidoglicano. La zona de similitud se restringió a la región C-terminal (Fig. 32). Todos estos resultados sugieren que el gen mutado en la cepa *P. putida* 14G3 codifica la lipoproteína asociada al peptidoglicano de *P. putida* (según las recomendaciones de nomenclatura para pseudomonadáceas, el gen se llamaría *oprL* [Hancock *et al.*, 1990]).

5.2. Comparación de Orf2 con secuencias de las bases de datos

Al comparar Orf2 con las secuencias de las bases de datos, se encontró que presentaba similitud con los productos codificados por los genes localizados corriente abajo del gen *pal* en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *L. pneumophila*. Además también presentó homología con dos proteínas hipotéticas de *Aquifex aeolicus* y *Rickettsia prowazekii* (Tabla 5). El alineamiento de las proteínas codificadas por los genes corriente abajo de *pal*, mostró una zona más conservada alrededor del sitio de procesamiento del supuesto péptido señal (aminoácidos 15 al 29) (Fig. 33). El hecho de que *orf2* de *E. coli* codifique una proteína periplásmica (Vianney *et al.*, 1996), apoya la idea de que Orf2 de *P. putida* también lo sea.

Tabla 4. Proteínas con las que Orf1 de *P. putida* presenta similitud†

Nombre de la proteína y microorganismo de origen	aa ^a	% identidad (solapamiento) ^b	Nº acceso en GenBank o en Swiss-Prot/Referencia ^c
OprL <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	168	91,1 (168)	Q51489 / Lim <i>et al.</i> (1997)
PAL <i>Legionella pneumophila</i>	176	44,5 (173)	P26493 / Engleberg <i>et al.</i> (1991) Ludwig <i>et al.</i> (1991)
PAL (P6) <i>Haemophilus influenzae</i>	153	42,9 (163)	P10324 / Nelson <i>et al.</i> (1988) Deich <i>et al.</i> (1988)
'PAL' (P6) <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	(91)	46,0 (87)	Q48265 / Ueyama <i>et al.</i> Sin pub.
PAL <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	152	40,7 (162)	Q44157 / Frey <i>et al.</i> (1996)
PAL <i>Brucella abortus</i>	168	40,6 (155)	Q44662 / Tibor <i>et al.</i> (1994)
PAL (P6) <i>Pasteurella multocida</i>	150	40,2 (164)	Q51886 / Kasten <i>et al.</i> (1995)
PAL <i>Escherichia coli</i>	173	39,8 (171)	P07176 / Chen y Henning (1987), Lazzaroni y Portalier (1992)
PAL <i>Haemophilus ducreyi</i>	157	39,6 (164)	Q47958 / Spinola <i>et al.</i> (1996)
PAL (Omp18) <i>Campylobacter coli</i>	165	35,7 (168)	Q46099 / Konkel <i>et al.</i> (1996)
PAL <i>Campylobacter jejuni</i>	165	35,1 (168)	Q46123 / Burnens <i>et al.</i> (1995)
Proteína de resistencia a tolaasina <i>Pseudomonas tolaasii</i>	163	35,0 (163)	Q52584 / Hutchison y Johnstone. Sin pub.
OmpA <i>Bordetella avium</i>	194	33,7 (187)	Q05146 / Gentry-Weeks <i>et al.</i> (1992)
Proteína 18,5kDa <i>Bartonella bacilliformis</i>	171	44,8 (125)	Q45017 / Arévalo <i>et al.</i> Sin pub.
PAL <i>Rickettsia prowazekii</i>	155	41,4 (111)	E1343043 / Andersson <i>et al.</i> (1998)
PAL <i>Chlamydia trachomatis</i>	188	41,2 (114)	O84605 / Stephens <i>et al.</i> (1998)
PAL (Omp18) <i>Helicobacter pylori</i>	179	36,5 (104)	O25750 / Tomb <i>et al.</i> (1997)
'PAL' <i>Chromatium vinosum</i>	(62)	46,8 (62)	O31220 / Dincturk y Knaff. Sin pub.
PAL <i>Aquifex aeolicus</i>	203	36,9 (84)	AE000775 / Deckert <i>et al.</i> (1998)
OprF <i>Pseudomonas fluorescens</i>	317	41,4 (99)	Q51780 / de Mot <i>et al.</i> (1994)
OprF <i>Pseudomonas syringae</i>	344	40 (100)	P22263 / Ullstrom <i>et al.</i> (1991)
OprF <i>Pseudomonas tolaasii</i>	317	39,8 (98)	Q52465 / de Mot <i>et al.</i> (1994)
OprF <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	350	39,4 (99)	P13794 / Duchêne <i>et al.</i> (1988)
MotB <i>Pseudomonas putida</i>	285	37,7 (114)	O52264 / Ditty <i>et al.</i> (1998)
OmpA <i>Escherichia coli</i>	346	34,5 (110)	P02934 / Beck y Bremer (1980)

^a Número de aminoácidos de la proteína. Los números entre paréntesis indican que la secuencia disponible en la base de datos está incompleta.

^b Se indica el porcentaje de residuos idénticos encontrados en el fragmento de solapamiento. En el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento (indicado entre paréntesis) se incluyen los "huecos" que introduce el programa de búsqueda de similitudes para optimizar el alineamiento.

^c "Sin pub." indica que dicha secuencia se encuentra depositada en la base de datos pero que no existe ningún artículo publicado sobre ella hasta la fecha del análisis.

† El análisis comparativo se realizó en diciembre de 1998.

	10	20	30	40	50
Orfl <i>P. putida</i>	...MEML	...FKG	...FAALALAMAVAVG	...CSSKGGDNAGEGA...	AVDPNAGY.
OprL <i>P. aeruginosa</i>	...MEML	...FKG	...FAALALAMAVAVG	...CSSKGGDASGEGANG..	GVDPNAGY.
'PAL' <i>C. vinosum</i>
'PAL' <i>H. parainfluenzae</i>
PAL (Ompl8) <i>C. coli</i>M	...KKILFSSIAAFALVISGC	...STKSTSVSGDTSVD.....	S..
PAL (Ompl8) <i>H. pylori</i>M	...KRSSVFSFLVAFLLVAGCS	...HKMDNKTVAGDVSAKTVQ	TAPVTT
PAL (P6) <i>H. influenzae</i>M	...NKFFVKSLLVAGSVAALAACS	...SSNDAAGNG.....	AA.
PAL (P6) <i>P. multocida</i>M	...KKLTKVLLVAGSVAVLAACG	...SSKKDES.....	AG.
PALA <i>A. pleuropneumoniae</i>M	...KKLAKVLMIAAPAFVLAACSS	...SSSDNANANANANA.....
PAL <i>B. abortus</i>M	...RRIQSIARSPIAIALFMSLAVAGC	...ASKKNLPPNAGDLG.....	LGA.
PAL <i>C. jejuni</i>M	...KKILFTSIALAVVISGC	...STKSTSVSGDSSVD.....	S..
PAL <i>C. trachomatis</i>M	...RKTIFKAFNLLFSLFLSSCS	...YPCRDWECHGCD SARPRKSS	FGFV
PAL <i>E. coli</i>M	...QLNKVLKGLMIALPVMIAAACS	...SNKNASNDGSEGMLGAGT	GMDAN.
PAL <i>H. ducreyi</i>M	...KKIAKVLMIAPAFVLTACSS	...SSSGKTDANANMNGDAM...	AV.
PAL <i>L. pneumophila</i>M	...KAGSFYKLLGLLVASAVLVAACS	...KTPGSADGGAAGVD.G	DATAQGL.
PAL <i>R. prowazekii</i>M	...KTKITLAFALFMLAGCNTTK	...KTTQMAG.....	MVH.
Resistencia-tolaasina <i>P. tolaasii</i>M	...PYNKFFVKSLLVAGSVAALAACS	...SRNDAAGNG.....	AA.
Consenso	-----	-K--K----	-A-----	-A-CS-----	-----

	60	70	80	90	100
Orfl <i>P. putida</i>	GANTGAVD	GSLSEEA.....	ALRAITT..	FYFEYDSSDLKPEAM
OprL <i>P. aeruginosa</i>	GANS	GAVDGSLSDEA.....	ALRAITT..	FYFEYDSSDLKPEAM
'PAL' <i>C. vinosum</i>	PGLLA
'PAL' <i>H. parainfluenzae</i>T	...FGGYSVEDLQ.....	...QRYNTVYF	GFDPKFNIEGEYV
PAL (Ompl8) <i>C. coli</i>N	...RGTGGSDGWDIDSKI.....	...SQLNDTLGKVYFDF	DFKFNIRPDMQ
PAL (Ompl8) <i>H. pylori</i>E	...PAPEKEEPKQEPAPVVEKP...	...AVESGTIIAS	IYFDFDKYEIKESDQ
PAL (P6) <i>H. influenzae</i>Q	...TFGGYSVADLQ.....	...QRYNTVYF	GFDPKYDITGEYV
PAL (P6) <i>P. multocida</i>Q	...MFGGYSVQDLQ.....	...QRYNTVYF	GFDPKYNIEGEYV
PALA <i>A. pleuropneumoniae</i>Q	...QFGGMTAEDLQ.....	...TRYNTVYF	GFDSYAVEGEYQ
PAL <i>B. abortus</i>G	...AATPGSSQDFT.....	...VNVGDRIF	FDLSSLRIRADAQ
PAL <i>C. jejuni</i>N	...RSGGSDGWDIDSKI.....	...SQLNDTLN	KNVYFDFDKFNIRPDMQ
PAL <i>C. trachomatis</i>P	...FYSDEEIQQAFVE	DFDSKEEQLYKTS	AQSTSFERNITFATDSYSIKGEDN
PAL <i>E. coli</i>G	...NGNMSSEEQARLQ.....	...MQLQQNNIV	YFDFDKYDIRSDFA
PAL <i>H. ducreyi</i>N	...QFGGMTTEDLQ.....	...TRYNTVYF	NFDSYAVEGEYR
PAL <i>L. pneumophila</i>Q	...METHFAGQEPGESY.....	...TQAPHNQ	LYLFAYDSTLASKYL
PAL <i>R. prowazekii</i>G	...QCESTSLIKDFE.....	...KHAGNAVWF	AFDSSLSPKAK
Resistencia-tolaasina <i>P. tolaasii</i>N	...TFGEYSVANLG.....	...QRYNNVYF	GYNKYNLNEGJV
Consenso	-----	-GG----	-D-----	-N-VYF--	FD--I-----

	110	120	130	140	150
Orfl <i>P. putida</i>	RALDV.	HAKDLKAN.	GNRVVLEGNTDERGTREYNMALGERRAKAVQRYLV		
OprL <i>P. aeruginosa</i>	RALDV.	HAKDLKGS.	GQRVVLEGHTDERGTREYNMALGERRAKAVQRYLV		
'PAL' <i>C. vinosum</i>	DLDA.	HASYLRERPSVKV	LIEGHADERGTPEYNIALGERRAKAVAKYLV		
'PAL' <i>H. parainfluenzae</i>	QILDA.	HAYLNATPASKV	VVEGNTDERGTPEYNIALGQRRADAVKGFIL		
PAL (Ompl8) <i>C. coli</i>	NVNTNANIFNNE	VS	GVSVITVEGNCDEWGTDEYNQALGLKRAKAVKEALI		
PAL (Ompl8) <i>H. pylori</i>	ETLDE.	IVQKAKEN.	HMQVLLLEGNTDEFGSSEYNQALGVKRTLSVKNALV		
PAL (P6) <i>H. influenzae</i>	QILDA.	HAYLNATPAAKV	LVEGNTDERGTPEYNIALGQRRADAVKGYLA		
PAL (P6) <i>P. multocida</i>	QILDA.	HAAFLNATPATK	VVEGNTDERGTPEYNIALGQRRADAVKHYLS		
PALA <i>A. pleuropneumoniae</i>	QLLDA.	HAYLTSAN.	GKVTVAGHADERGTPEYNIALGQRRADAVKNYLA		
PAL <i>B. abortus</i>	QTLK.	QAQWLQRYPQ	SITIEGHADERGTREYNLALGQRRAAATRDFLA		
PAL <i>C. jejuni</i>	NVSTNANIFNTE	VSV	GVSVITVEGNCDEWGTDEYNQALGLKRAKAVKEALI		
PAL <i>C. trachomatis</i>	LTILASLVRHLH	KSPKATLYIE	GHTDERGAAAYNLALGARRANAVKQYLI		
PAL <i>E. coli</i>	QMLDA.	HANFLRSNPS	KVTVEGHADERGTPEYNISLGERRANAVKMYLQ		
PAL <i>H. ducreyi</i>	QLLDA.	HAYLTSSN.	SKVTVTGHADERGTPEYNIALGQRRADAVKNYLA		
PAL <i>L. pneumophila</i>	PSVNA.	QAEYLKTHP	GARVMIAGHTDERGSREYNVALGERRADTVAEILR		
PAL <i>R. prowazekii</i>	EELER.	QACWLSKH	PEVKVTVEGHADERGTREYNLALGERRAAAKQFLA		
Resistencia-tolaasina <i>P. tolaasii</i>	NLLNAGHAA	YLDANPAGL	VLVGGNNDENENPEYNIALEERAADVLRGYYA		
Consenso	--LDA-HA--	L---P---	V-VEGH-DE	RG-T-EYN-ALG-RR	A-AVK-YL-

	160	170	180	190
Orfl <i>P. putida</i>	LQG..	VSPAQLELV	SYGEERP	VATCNDEQSWAQNRRVELRK.....
OprL <i>P. aeruginosa</i>	LQG..	VSPATLELV	SYGKERP	VATGHEQSWAQNRRVELKK.....
'PAL' <i>C. vinosum</i>	TSG..	LP..	KLK.....
'PAL' <i>H. parainfluenzae</i>	GKG..	VDAGKLG	T.....
PAL (Ompl8) <i>C. coli</i>	AQG..	VNSDRIAVKS	YGETNPVCTE	TKACDAQNRRAEFKLSR...
PAL (Ompl8) <i>H. pylori</i>	IKG..	VEKDIKTIS	FGETKPKCAQ	KTRECYKENRRVDVKLMK...
PAL (P6) <i>H. influenzae</i>	GKG..	VDAGKLG	TVSYGEEKPA	VLGHDEAAYSKNRRRAVLAY.....
PAL (P6) <i>P. multocida</i>	AKG..	VQAGQVST	VSYGEEKPA	VLGHDEAAYSKNRRRAVLAY.....
PALA <i>A. pleuropneumoniae</i>	TKG..	AN..	QVSTVSYGEEKPA	VLGHTEADYAKNRRRAVLEY.....
PAL <i>B. abortus</i>	SRG..	VPTNRMRTIS	YGNERPVA	VCADATCWSQNRRAVTVLNGAGR
PAL <i>C. jejuni</i>	AKG..	VNADRIAVKS	YGETNPVCTE	TKACDAQNRRAEFKLSR...
PAL <i>C. trachomatis</i>	KQG..	IAADRLFTIS	YGKEHPVHP	GHNELAQNRRTFKIHAR..
PAL <i>E. coli</i>	GKG..	VSADQISIV	SYGEEKPA	VLGHDEAAYSKNRRRAVLVY.....
PAL <i>H. ducreyi</i>	TKG..	VS..	QVSTVSYGEEKP	SVLGHTEADYAKNRRRAVLEY.....
PAL <i>L. pneumophila</i>	MAG..	VSRQQIRV	VSYGKERPA	NYGHDEASHAQNRRAVEFIYEATR.
PAL <i>R. prowazekii</i>	NKG..	IAHNLNTIS	YGKDKPAM	IGNTEAFSYNRRRAVTVLHK...
Resistencia-tolaasina <i>P. tolaasii</i>	GKKG	V	DAGLLGNV	SNGEELPAVLGHDEAACSKNRRRAVLACSSSI.
Consenso	-KG--V-	-----	TVSYGEE-P---	GH-EA-----

(Ver leyenda en la página siguiente)

FIGURA 31. Alineamiento múltiple de Orf1 con otras proteínas PAL. El alineamiento entre Orf1 de *P. putida* y las secuencias de 16 proteínas PAL se realizó con el programa ClustalW (ver sección *Materiales y Métodos*). Para que un aminoácido forme parte de la secuencia consenso debe estar presente al menos en 9 de las 17 secuencias alineadas. Dichos aminoácidos se indican en color azul claro. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se señalan en color rojo. Para estos cálculos no se han considerado las regiones desconocidas de las proteínas truncadas PAL de *Chromatium vinosum* y *Haemophilus parainfluenzae*. La secuencia consenso y el color de los aminoácidos se generaron con ayuda del programa MacBoxShade (ver sección *Materiales y Métodos*). La zona amino terminal de color verde en la secuencia consenso, indica la región correspondiente al péptido señal. En color azul oscuro se señala también la zona propuesta como posible dominio de unión al peptidoglicano (Koebnik, 1995). Los residuos de la secuencia consenso que aparecen subrayados, son aminoácidos que se encuentran absolutamente conservados en otras 29 proteínas, tanto de bacterias gram negativas como de gram positivas, de la familia de proteínas asociadas al peptidoglicano (de Mot y Vanderleyden, 1994). El número de acceso a la base de datos y la referencia para cada secuencia, se indican en la Tabla 4.

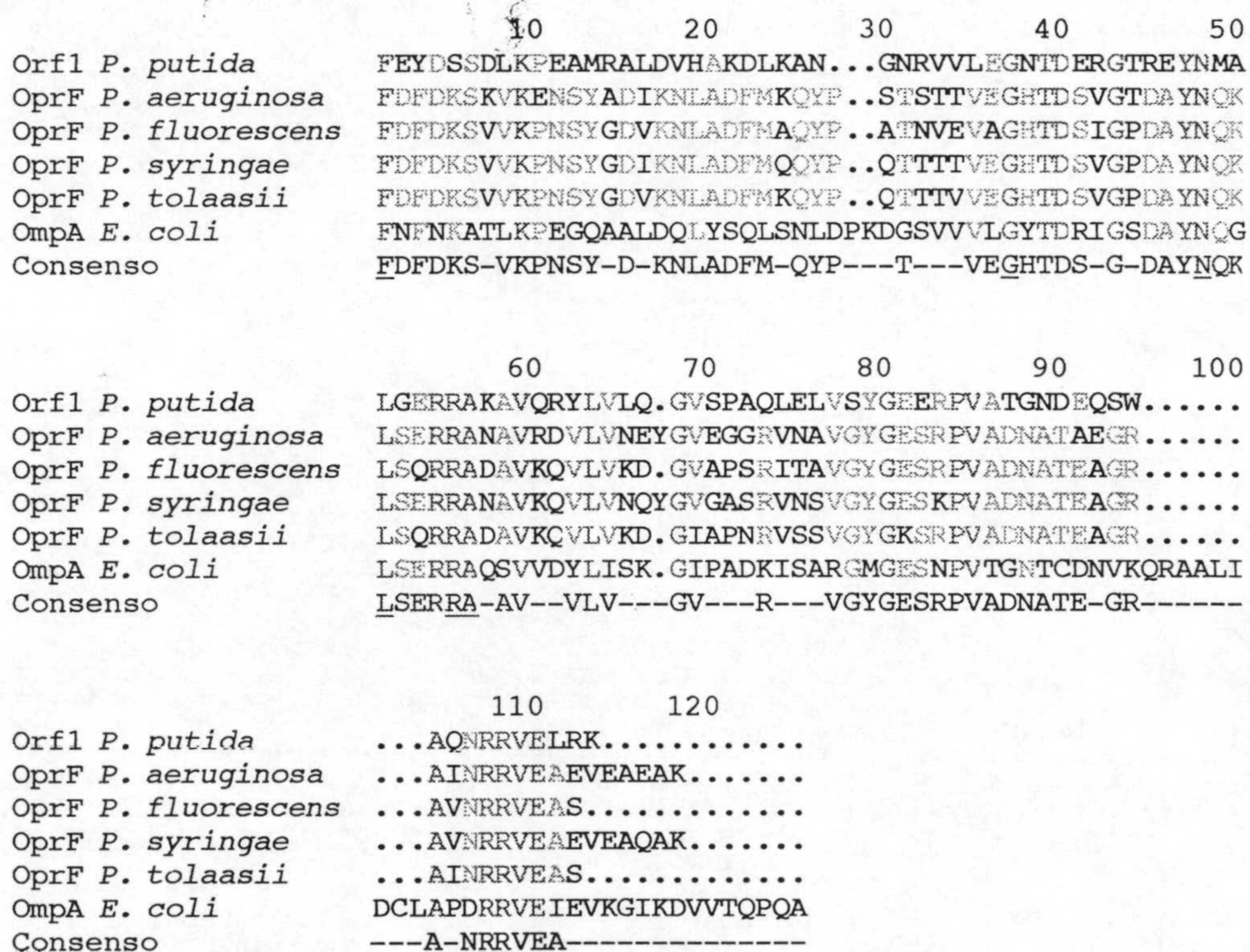


FIGURA 32. Alineamiento múltiple de las regiones C-terminales de Orf1 de *P. putida*, OprF de distintas *Pseudomonas* y OmpA de *E. coli*. La nomenclatura utilizada y el método seguido para generar el alineamiento son los mismos que se indicaron en la Figura 31. El porcentaje de identidad entre Orf1 y las distintas proteínas alineadas se indica en la Tabla 4.

Tabla 5. Proteínas con las que Orf2 de *P. putida* presenta similitud†

Nombre de la proteína y microorganismo de origen	aa ^a	% identidad (solapamiento) ^b	Nº acceso en GenBank o en Swiss-Prot/Referencia
Orf2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	107	57,3 (89)	Q51490 / Lim <i>et al.</i> (1997)
Orf2 <i>Escherichia coli</i>	263	32,0 (266)	P45955 / Lazzaroni y Portalier (1992)
OrfD' <i>Legionella pneumophila</i>	(201)	18,8 (256)	P26881 / Engleberg <i>et al.</i> (1991)
Proteína 25,6 kDa <i>Aquifex aeolicus</i>	217	24,3 (239)	O67290 / Deckert <i>et al.</i> (1998)
Proteína 28,9 kDa <i>Rickettsia prowazekii</i>	250	22,6 (270)	E1342537 / Andersson <i>et al.</i> (1998)

^a Número de aminoácidos de la proteína. Los números entre paréntesis indican que la secuencia disponible en la base de datos está incompleta.

^b Se indica el porcentaje de residuos idénticos encontrados en el fragmento de solapamiento. En el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento (indicado entre paréntesis) se incluyen los "huecos" que introduce el programa de búsqueda de similitudes para optimizar el alineamiento.

† El análisis comparativo se realizó en diciembre de 1998.

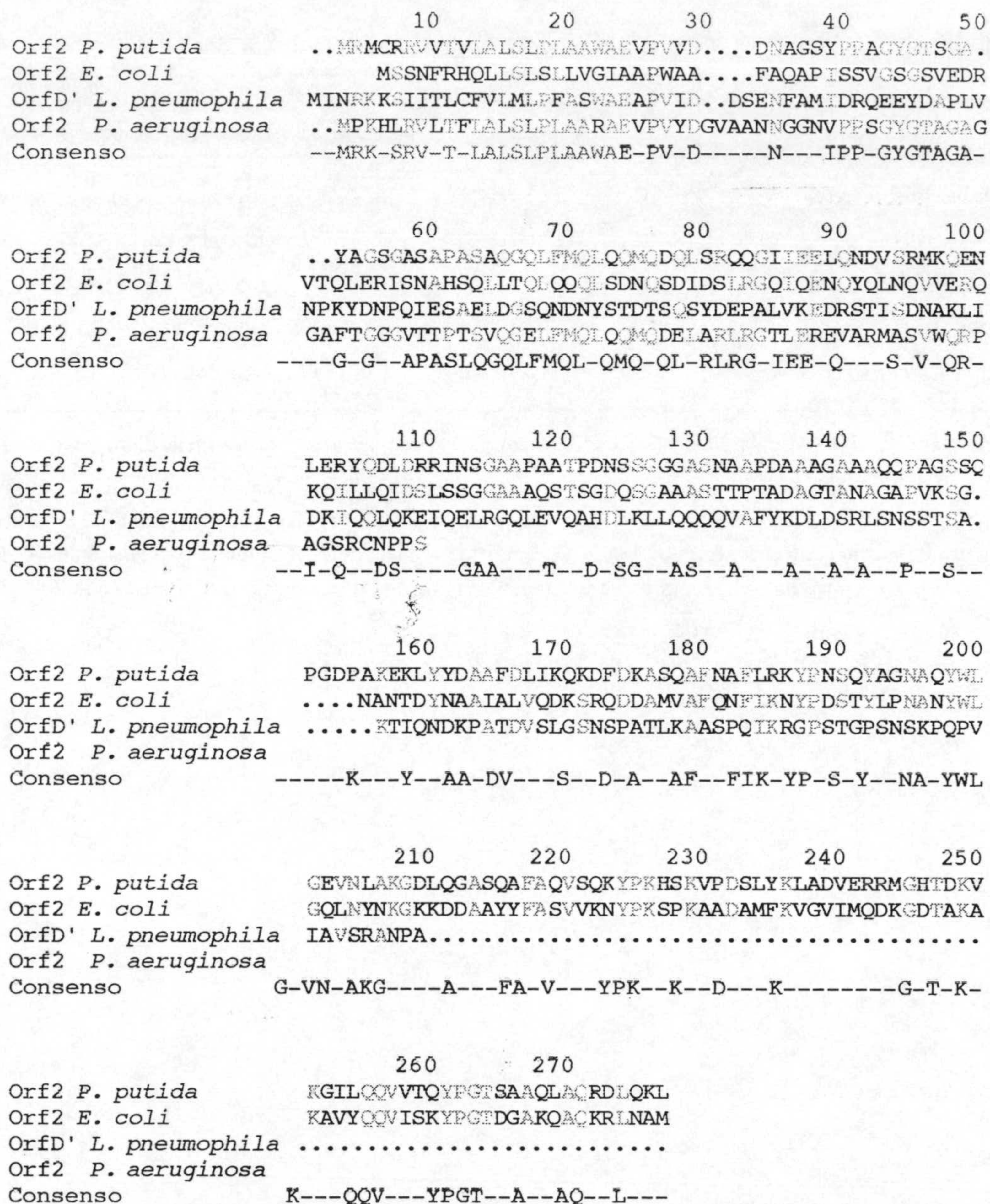
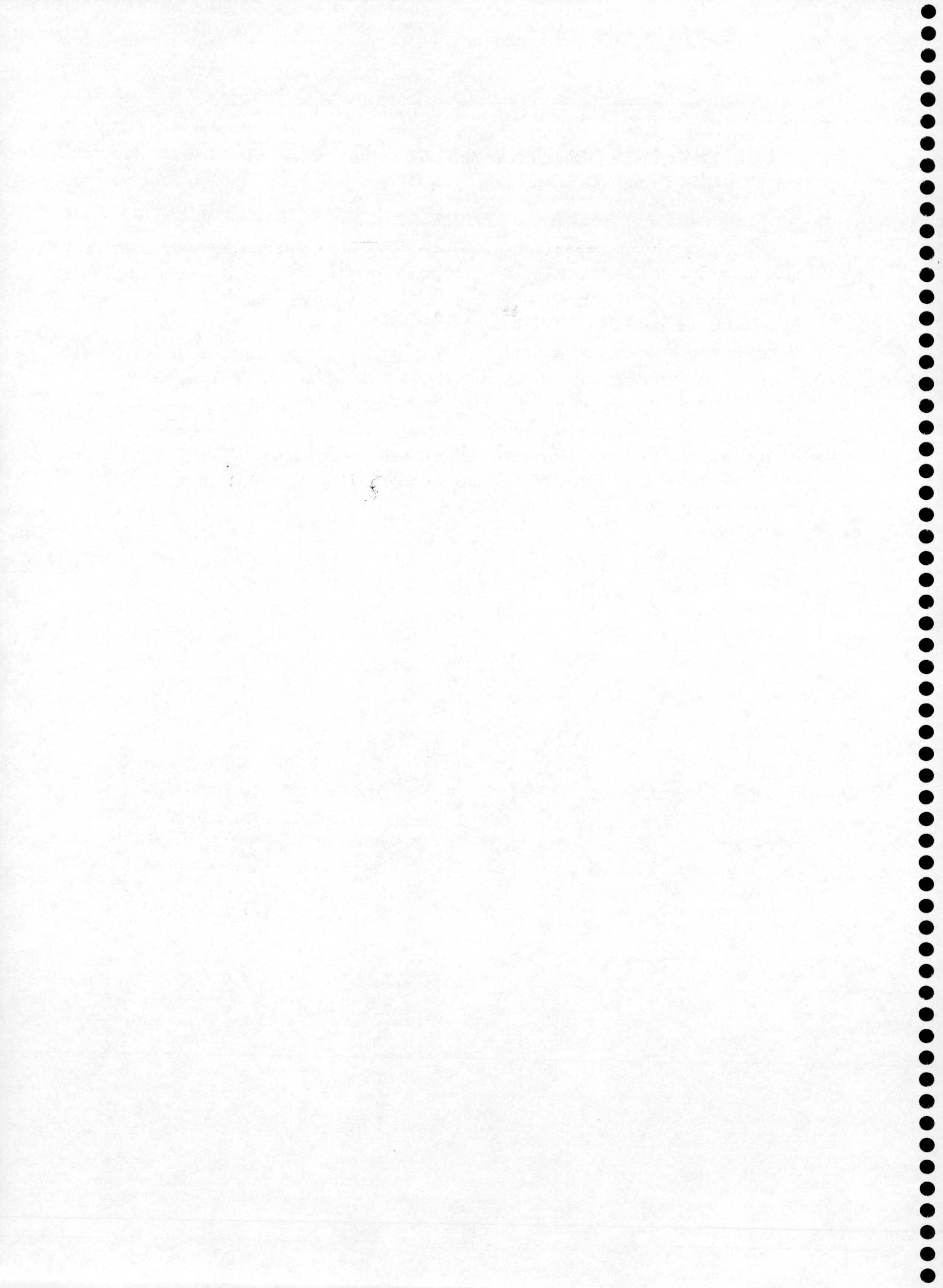


FIGURA 33. Alineamiento múltiple de Orf2 con los productos de los genes adyacentes a PAL. El alineamiento y la secuencia consenso se generaron como se indicó en la Fig. 31. Para que un aminoácido forme parte de la secuencia consenso es suficiente con que esté presente en 2 de las 4 secuencias alineadas. Dichos aminoácidos se indican en color azul claro. Los aminoácidos conservados en las 4 secuencias se señalan en color rojo. La zona amino terminal de color verde en la secuencia consenso representa la región propuesta como péptido señal. El número de acceso a la base de datos y la referencia para cada secuencia, se indican en la Tabla 4.

6. CONSERVACIÓN DEL GEN *orf1* ENTRE DISTINTOS MIEMBROS DE LA FAMILIA *Pseudomonadaceae*

Para estudiar el grado de conservación del gen *orf1* entre pseudomonadáceas pertenecientes a los diferentes grupos de ARN ribosómico, muestras de ADN total aisladas de las siguientes bacterias: *P. putida* 29 y *P. putida* 43 -serológicamente diferenciables de *P. putida* KT2440-, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, y *P. syringae* (todas cepas del grupo Ib de ARN ribosómico [Palleroni, 1986]); *P. stutzeri* (grupo Ia); *Ralstonia solanacearum* (anteriormente *Pseudomonas solanacearum*, perteneciente al grupo II); *Delftia acidovorans* (anteriormente *Pseudomonas acidovorans*, perteneciente al grupo III); y *Brevundimonas diminuta* (anteriormente *Pseudomonas diminuta*, perteneciente al grupo IV), se digirieron con *EcoRI*, y se utilizaron en experimentos de hibridación, usando un fragmento de ADN de *orf1* como sonda. El gen *orf1* de *P. putida* sólo hibridó con ADN obtenido de las cepas pertenecientes el grupo Ib de ARN ribosómico (datos no mostrados).



Capítulo II

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE DE *Pseudomonas putida* QUE NO EXPRESA LA PROTEÍNA OprL

RESUMEN

Mediante técnicas de intercambio alélico por recombinación homóloga, se construyó un mutante *orf1* nulo de *P. putida* KT2440, denominado *P. putida* PX. Para confirmar que Orf1 no se sintetizaba en el mutante, se analizó la fracción de proteínas asociadas al peptidoglicano de dicha cepa, lo que reveló la ausencia de una banda de proteína con un peso molecular aparente de 19 kDa. El producto que faltaba se identificó por técnicas de inmunodetección como la proteína OprL (PAL) de *P. putida*, mediante el uso de un anticuerpo generado contra la proteína OprL de *P. aeruginosa*, y su naturaleza lipoproteica se confirmó mediante ensayos de inhibición del procesamiento del péptido señal con globomicina. En líneas generales, el fenotipo del mutante *P. putida* PX fue similar al de la cepa *P. putida* 14G3. Ambas crecieron formando filamentos y mostraron tendencia a formar grumos al final de la fase de crecimiento exponencial durante su cultivo en medio LB. La cepa PX también fue más sensible que la cepa silvestre a detergentes y a EDTA, y mostró una morfología celular alterada cuando se observó al microscopio electrónico. Sin embargo, al contrario que el mutante 14G3, el mutante nulo fue capaz de crecer en medio LB con 0,1% (p/v) de cloruro sódico, y fue más sensible que la cepa silvestre a los antibióticos: ácido nalidíxico, estreptomina, kanamicina, neomicina, piperacilina, rifampicina y tetraciclina. Además, se observó que *P. putida* PX liberaba enzimas periplásmicas al medio extracelular. Por otra parte, un mutante *oprL* de la cepa *P. putida* DOT-T1 fue incapaz de tolerar concentraciones de tolueno mayores del 0,3% (v/v) en medio LB líquido, en contraste con la cepa parental que toleraba concentraciones superiores al 10% (v/v).

1. CONSTRUCCIÓN DE UN MUTANTE *oprL* NULO DE LA CEPA *P. putida* KT2440

La construcción de un nuevo mutante *oprL* de *P. putida* obedeció a varios motivos. En primer lugar, serviría para comprobar si el fenotipo del mutante 14G3 se debía únicamente a la mutación por transposición del gen *oprL* o también a mutaciones secundarias en otros *loci* del cromosoma, como podría sugerir la imposibilidad de lograr una complementación fenotípica completa con el cósmido pPRO50 que portaba el gen silvestre (ver apartado 3 del *Capítulo I*). En segundo lugar, se sabe que con frecuencia las fusiones traduccionales con el gen '*phoA* son tóxicas para las bacterias que las portan (Manoil y Traxler, 1995). De esta forma, con el nuevo mutante se descartarían posibles efectos secundarios debidos a la fusión con el gen '*phoA*. Por último, la falta de éxito hasta ese momento en la obtención de mutantes *pal* nulos en otras bacterias gram negativas había llevado a la creencia de que la proteína PAL era esencial para la supervivencia bacteriana (Chen y Henning, 1987; Hayashi y Wu, 1990). Si se lograba construir un mutante *oprL* (*pal*) nulo, se demostraría que este gen no es esencial al menos en *P. putida*.

Para la construcción por recombinación homóloga del mutante *oprL* nulo de *P. putida*, se utilizó el plásmido pKNG101XYLE (Fig. 34), un derivado del plásmido suicida pKNG101 (ver sección *Materiales y Métodos*) que contiene parte del gen *oprL* interrumpido por el gen indicador *xylE*, además de secuencias flanqueantes de ADN cromosómico de *P. putida*. A consecuencia de la inserción del gen *xylE*, el polipéptido de 166 aminoácidos codificado por el gen *oprL* se acortó a 19 aminoácidos (perdiéndose por tanto el sitio de procesamiento). Para la construcción del mutante por recombinación homóloga se siguió el procedimiento que se detalla en el apartado 11 de la sección *Materiales y Métodos*. El plásmido pKNG101XYLE se transfirió desde *E. coli* CC118 λ *pir* a *P. putida* KT2440 por conjugación "tripartita". Los transconjugantes en los cuales el plásmido se había integrado en el cromosoma, se seleccionaron en medio mínimo con benzoato (5 mM) y estreptomycinina (100 μ g/ml). Éstos aparecieron con una frecuencia de 2×10^{-6} por receptor. Los clones así seleccionados (denominados merodiploides o cointegrados) mostraron el fenotipo C23O⁺ conferido por el gen *xylE*. Se seleccionaron al azar varias cepas merodiploides y se comprobó que no crecían en medio LB suplementado con estreptomycinina (100 μ g/ml) y sacarosa al 6% (p/v). Entonces, dichas cepas se cultivaron por separado durante 10 h en medio LB sin estreptomycinina para permitir la aparición de un segundo hecho de recombinación que condujese a la resolución del cointegrado. Al cabo de este tiempo se sembraron diluciones seriadas en medio LB con 6% (p/v) de sacarosa. Las colonias resistentes a sacarosa aparecieron con una frecuencia de $1,6 \times 10^{-3}$. Entre éstas se seleccionaron aquellos clones que fueron sensibles

a estreptomycin y que presentaron un fenotipo C23O⁺. En la Figura 35A se muestra un esquema del procedimiento seguido para el reemplazamiento génico, el cual, se comprobó en un primer momento mediante análisis por PCR. La amplificación de la muestra de la cepa silvestre, generó un producto de 638 pb correspondiente al gen *oprL*. En las muestras correspondientes a las cepas mutantes *oprL*, apareció un producto de 1.238 pb, resultado de la amplificación de *oprL::xylE*. Al amplificar la muestra de la cepa merodiploide se pudieron observar ambos productos (Fig. 35B). Entre los clones que dieron un resultado positivo se eligió uno al azar, que se denominó *P. putida* PX. En esta cepa, mediante hibridaciones de ADN, se confirmaron tanto la pérdida de las secuencias del vector y del gen silvestre, como la presencia de la copia mutada (Fig. 35C, D y E). Para ello, en una primera hibridación (Fig. 35C), se utilizó como sonda el fragmento *PstI-HincII* de 0,65 kb de pPRO200, que hibridó en la cepa silvestre con una banda de 0,9 kb que contenía el gen *oprL*, mientras que en la cepa mutante hibridó con una banda de 2,4 kb correspondiente a la construcción *oprL::xylE*. En la cepa merodiploide se pudieron observar ambas bandas (ver explicación de los tamaños en el esquema 35A). Como confirmación adicional se realizó otra hibridación (Fig. 35D), usando como sonda el fragmento *SmaI* de 1 kb de pXYLE10 que contenía el gen *xylE*. Como era de esperar, sólo aparecieron señales de hibridación positiva en las calles correspondientes a *P. putida* PX y al control positivo pKNG101XYLE, a la altura del fragmento *PstI* de 2,4 kb. Por último, para comprobar que no quedaba ningún resto del plásmido pKNG101 en la cepa mutante, se realizó una hibridación usando como sonda el plásmido pKNG101 cortado con *SmaI* (Fig. 35E). No apareció ninguna señal de hibridación con el cromosoma de la cepa mutante. Además, para verificar que los eventos de recombinación no habían afectado a la zona de unión entre los genes *oprL* y *xylE*, se determinó parte de la secuencia del producto de PCR de 1.238 pb, resultante de la amplificación del cromosoma de *P. putida* PX con los oligonucleótidos 5PAL y BEL2 (Fig. 35B). Dicha secuencia coincidió con lo esperado.

2. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL PEPTIDOGLICANO

Como confirmación última de que el gen *oprL* estaba mutado en la cepa *P. putida* PX, se purificaron las proteínas asociadas al peptidoglicano de las cepas *P. putida* KT2440, *P. putida* PX, *P. putida* 14G3 y *P. aeruginosa*. Tras la electroforesis, se encontró que las cepas silvestres producían un polipéptido con un peso molecular aparente de 19 kDa que no se encontraba en las preparaciones de los mutantes *oprL* (Fig. 36A). El hecho de que en la muestra correspondiente a *P. putida* 14G3 no se

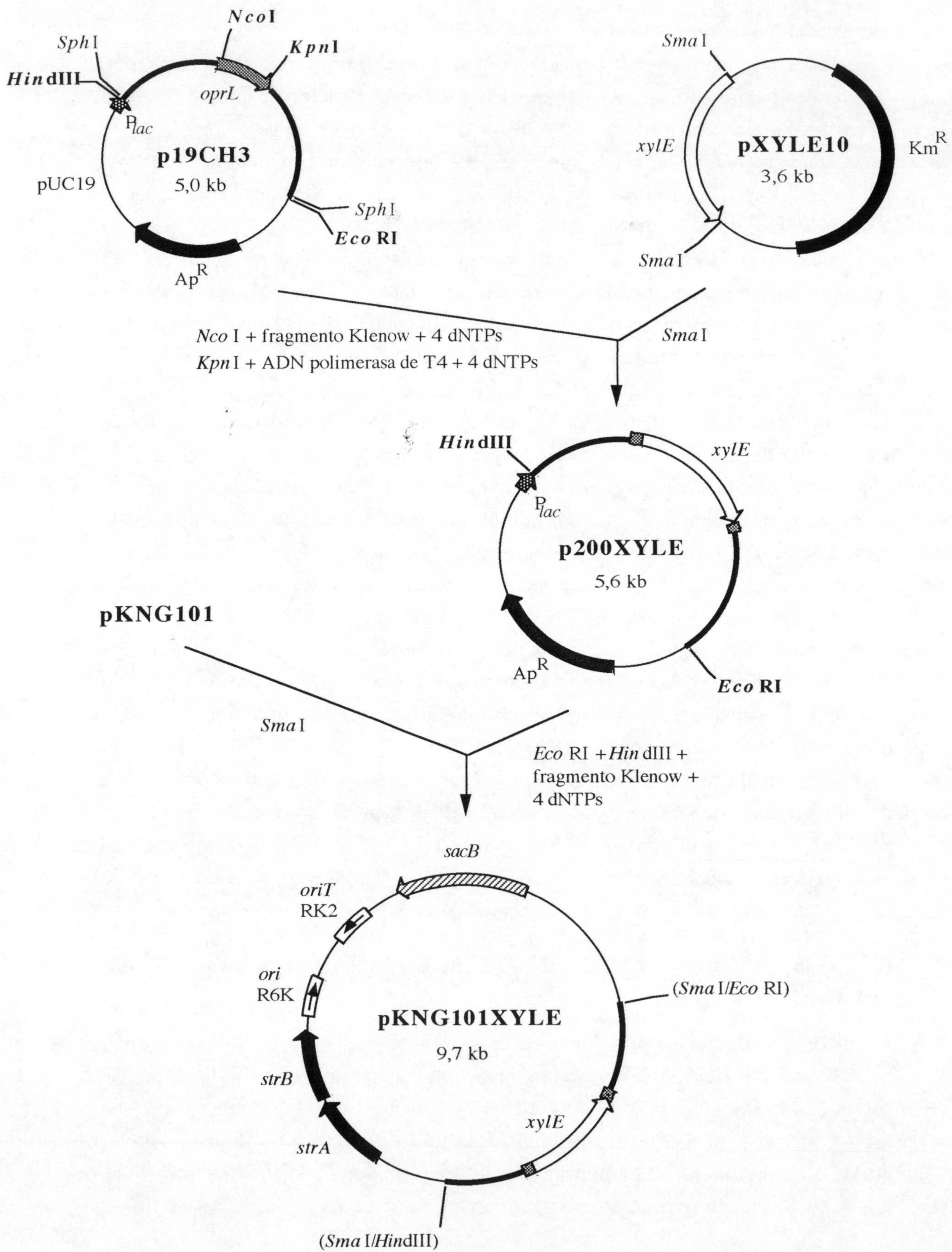


FIGURA 34. Esquema de la construcción del plásmido pKNG101XYLE. El plásmido p19CH3 es un derivado de pUC19 que carece del sitio de restricción *KpnI* en el MCS, y que porta el inserto *SphI* de 2,3 kb de pPRO200 en el que se ha creado previamente, por mutagénesis dirigida *in vitro* (cambiando la C de la posición 566 [ver Fig. 23] por una G), un sitio *KpnI* dentro del gen *oprL*. El plásmido p19CH3 se digirió con *KpnI* y los extremos cohesivos se convirtieron en romos con la ADN polimerasa del fago T4. Después, se digirió con *NcoI* y los extremos 5' colgantes resultantes se rellenaron con ayuda del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. De esta forma, se eliminó un fragmento interno de *oprL* de 398 pb. El otro fragmento obtenido tras la digestión se ligó con el fragmento *SmaI* de 1 kb del plásmido pXYLE10 que portaba el gen indicador *xyle* sin promotor, obteniéndose el plásmido p200XYLE. Este plásmido se digirió posteriormente con *HindIII* y *EcoRI*, y los extremos colgantes se convirtieron en romos con ayuda del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. El fragmento que portaba la construcción *oprL::xyle* se ligó con el plásmido pKNG101 cortado con *SmaI*, y la mezcla de ligación se transformó en la cepa *E. coli* CC118 λ pir. De la selección de un clon resistente a estreptomicina y con actividad catecol-2,3-dioxigenasa se obtuvo el plásmido pKNG101XYLE, que poseía 909 pb de ADN de *P. putida* corriente arriba del gen *xyle* y 1.039 pb corriente abajo. En la figura se indican los sitios de restricción relevantes para la construcción de los plásmidos. Los sitios señalados en negrita son únicos en el plásmido correspondiente. Entre paréntesis se indica la posición que tendrían determinados sitios de restricción que ya no existen debido a tratamientos enzimáticos posteriores y/o al evento de ligación. Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes. Las líneas negras de trazo más grueso que el resto del plásmido indican las regiones de ADN pertenecientes a *P. putida*. El mapa del plásmido pKNG101 se detalla en la sección *Materiales y Métodos*.

observase la presencia de ninguna banda de proteína con el peso molecular correspondiente a OprL-PhoA (alrededor de 58 kDa), apoyaba la idea de que los 53 aminoácidos carboxilo terminales de OprL son necesarios para que se produzca la interacción con el peptidoglicano. En el gel también se pudieron observar otras proteínas asociadas al peptidoglicano, como por ejemplo OprF (36-38 kDa), que estaba presente tanto en las cepas silvestres como en las mutantes.

Por otro lado, se había descrito que el anticuerpo monoclonal MA1-6, generado contra la proteína OprL de *P. aeruginosa*, reconocía un polipéptido de tamaño similar en otras pseudomonadáceas, incluida *P. putida* (Hancock *et al.*, 1982). Cuando este anticuerpo se usó contra la preparación de proteínas asociadas al peptidoglicano, reaccionó con un polipéptido de 19 kDa de peso molecular en la cepa silvestre, y no reconoció ningún producto en las cepas mutantes (Fig. 36B), lo que corroboraba que, efectivamente, el gen clonado (*orf1*) y mutado en *P. putida* PX codificaba la proteína OprL de *P. putida*. Esto demostraba que OprL no era un gen esencial para la supervivencia en *P. putida*. Por último, también se confirmó la ausencia de OprL en preparaciones de proteína total de *P. putida* PX usando el anticuerpo MA1-6 (Fig. 36C).

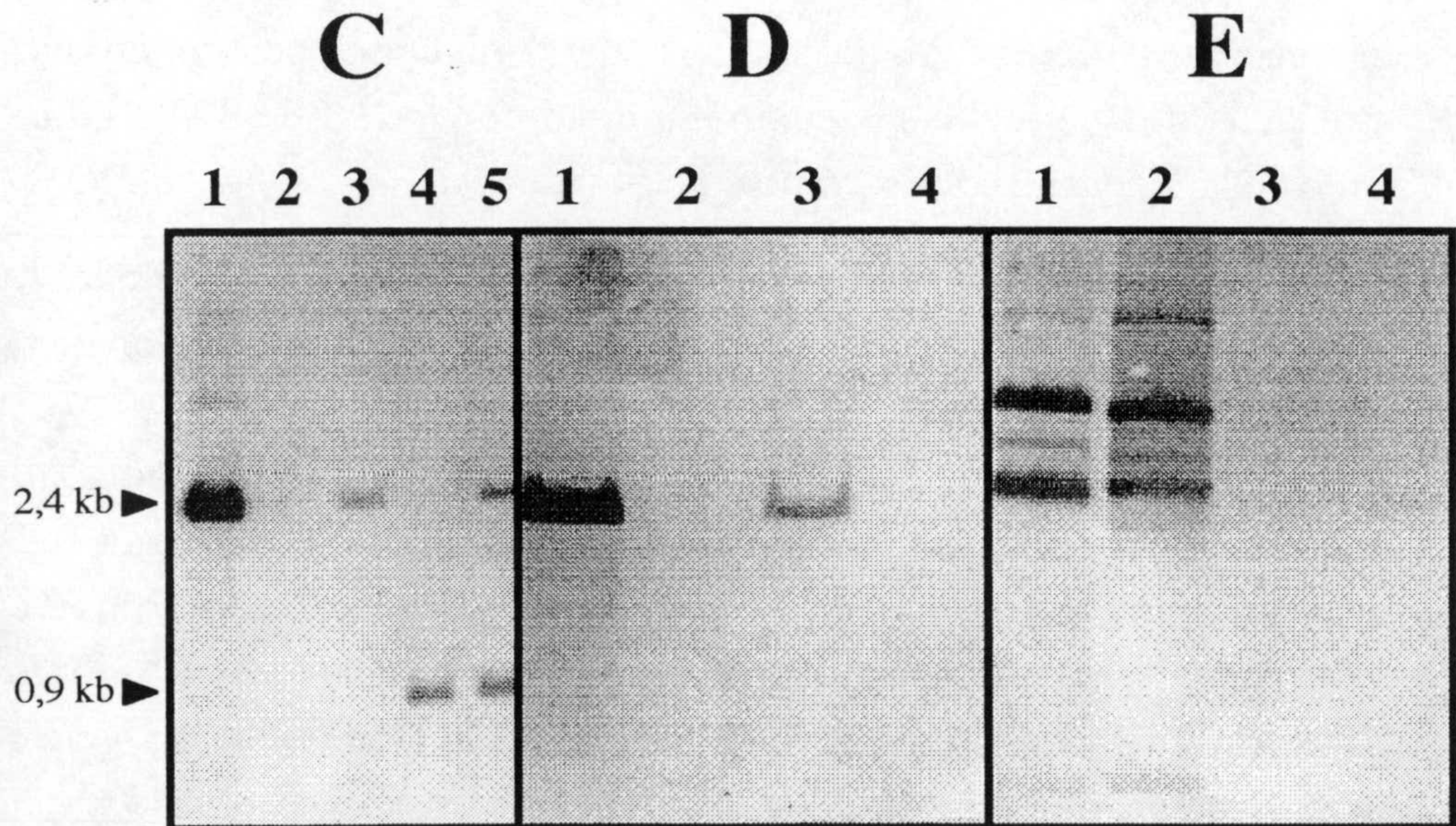
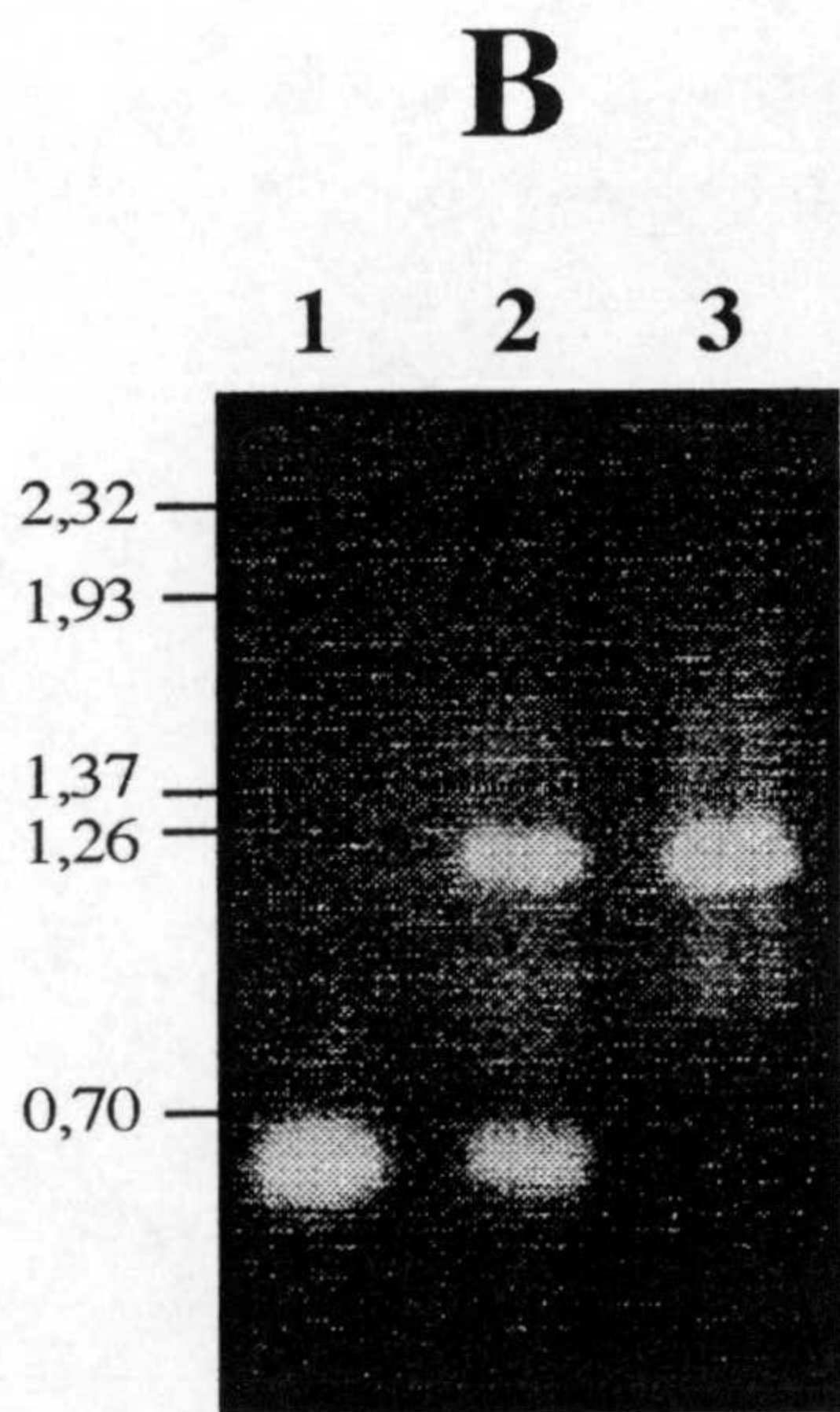
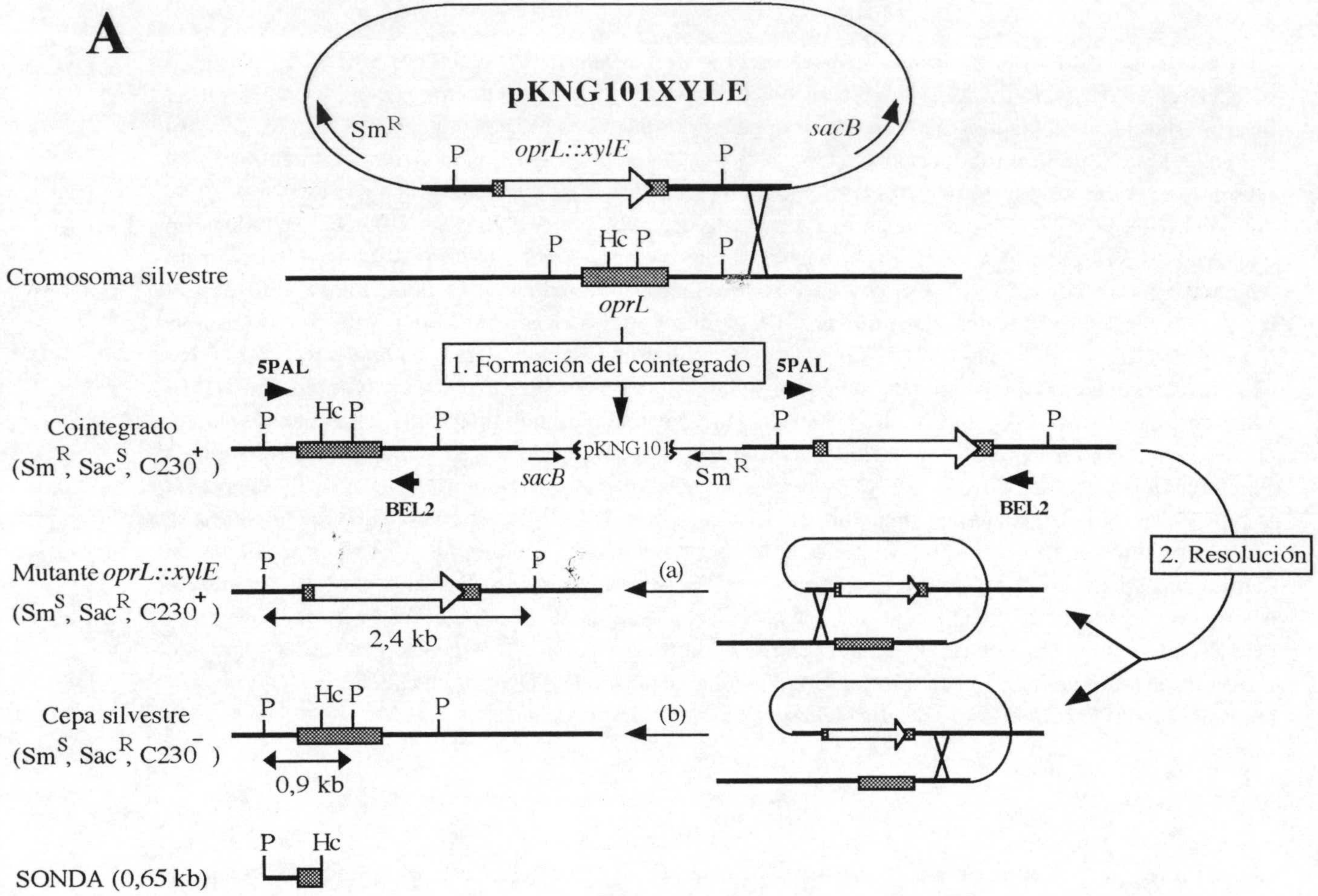


FIGURA 35. Pasos seguidos para construir el mutante *P. putida* PX y análisis por hibridación de ADN y por PCR de la región donde se encuentra el gen *oprL*. (A) El primer evento de recombinación ocurre entre las secuencias de aproximadamente 1 kb de longitud que flanquean al gen marcador *xyle* en el plásmido pKNG101XYLE, y sus secuencias homólogas en el cromosoma de *P. putida* KT2440 (paso 1). Esto tiene como consecuencia la formación de un cointegrado (o cepa merodiploide) con el fenotipo que se indica. En un paso posterior, un segundo hecho de recombinación conduce a la resolución del cointegrado (paso 2). Si este nuevo entrecruzamiento se produce en un lado del gen *xyle* distinto a donde tuvo lugar el primer hecho de recombinación se producirá la formación de una cepa mutante *oprL::xyle* (a), pero si se produce en el mismo lado, resultará nuevamente en la formación de una cepa con genotipo silvestre (b). La presencia o ausencia del fenotipo C230⁺ que confiere el gen *xyle* permite distinguir entre ambos casos. En la figura también se indica el tamaño de los fragmentos *Pst*I que hibridan con la sonda *Pst*I-*Hinc*II de 0,65 kb utilizada para estudiar la organización de esta región en las distintas cepas en experimentos de hibridación de ADN. Además, los símbolos negros en forma de punta de flecha (5PAL y BEL2) indican los oligonucleótidos utilizados para los análisis por PCR. Los sitios de restricción se indican como: P, *Pst*I y Hc, *Hinc*II. Sm^R/Sm^S, indica que la cepa es resistente o sensible a estreptomocina (100 µg/ml), respectivamente. Sac^R/Sac^S, indica que la cepa es resistente o sensible a sacarosa al 6% (p/v), respectivamente. C230⁺/C230⁻, indica que la cepa expresa o no expresa actividad catecol-2,3-dioxigenasa, respectivamente. El rectángulo gris indica el gen *oprL*, y la flecha blanca el gen *xyle*. Las líneas negras de trazo fino indican las regiones de ADN que pertenecen al plásmido pKNG101, y las de trazo más grueso indican las regiones de ADN pertenecientes a *P. putida*. Los dibujos no están a escala. (B) PCR de colonias de uno de los mutantes *oprL* obtenido tras el intercambio alélico. Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos 5PAL (5'-GCTTAACACACTGGGGT-3') y BEL2 (5'-AGCTGCCTGCGTTGTCATCTAC-3') que hibridan a ambos lados del gen *oprL* (ver esquema 25A). En la amplificación se usaron las condiciones estándar y una temperatura de hibridación de 52°C. *P. putida* KT2440 (calle 1); *P. putida* PX (calle 2); cepa merodiploide (calle 3). En el margen izquierdo se indican los tamaños correspondientes a los patrones de peso molecular, en kilobases. (C, D y E) Análisis por hibridación de la región de ADN donde se encuentra el gen *oprL*. Los plásmidos pKNG101XYLE (calle 1), pKNG101 (calle 2), y el ADN total de las cepas *P. putida* PX (calle 3), *P. putida* KT2440 (calle 4) y de la cepa merodiploide (calle 5), se digirieron con *Pst*I, se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se transfirieron a membranas de nailon. Como sondas de ADN (marcadas con dUTP-digoxigenina) se utilizaron: el fragmento *Pst*I-*Hinc*II de 0,65 kb de pPRO200 (Fig. 35C); el fragmento *Sma*I de 1 kb de pXYLE10 que contenía el gen *xyle* (Fig. 35D) y el plásmido pKNG101 cortado con *Sma*I (Fig. 35E). En las dos primeras hibridaciones se usaron los plásmidos pKNG101XYLE y pKNG101 como controles positivo y negativo, respectivamente. En la última hibridación se usaron los plásmidos pKNG101XYLE y pKNG101 como control positivo. Como control negativo se usó la cepa silvestre.

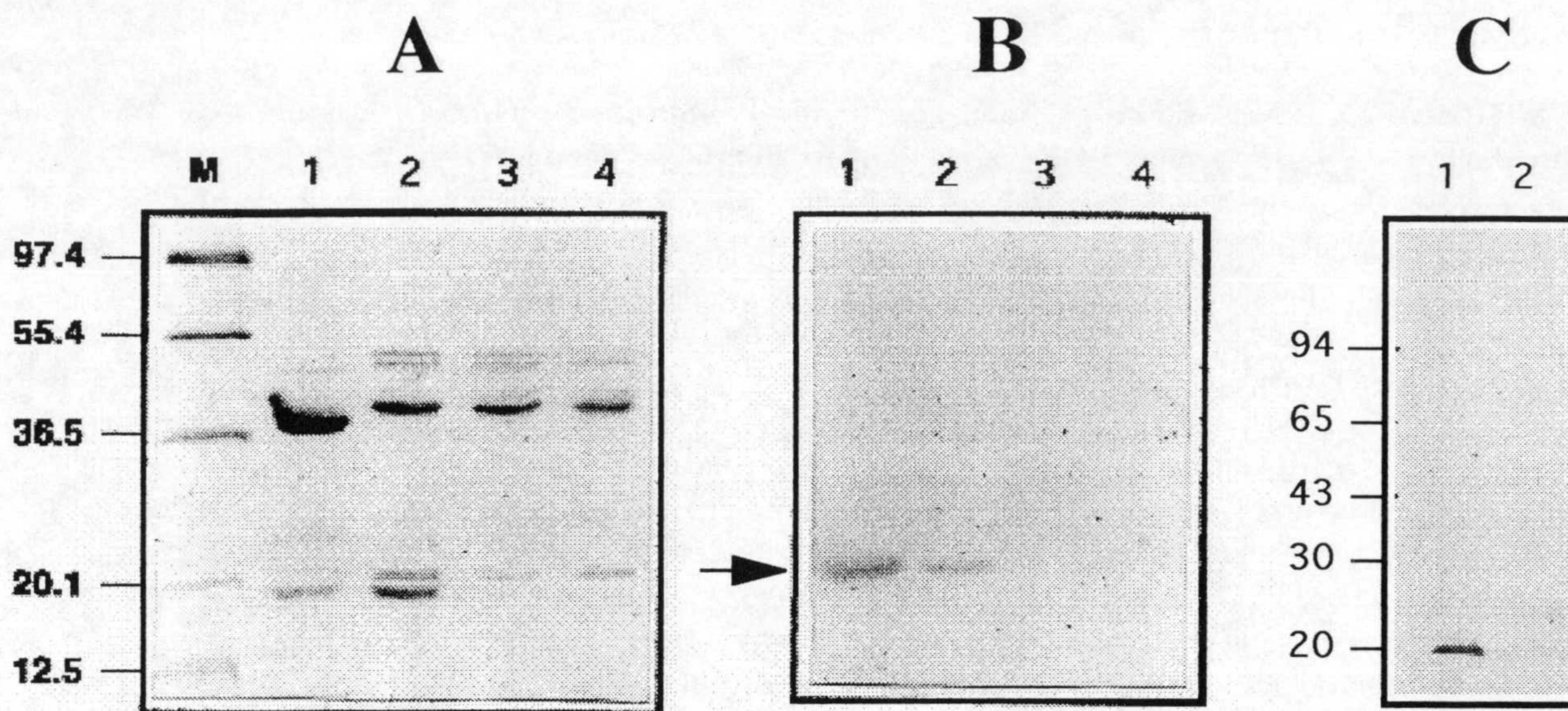


FIGURA 36. Análisis de la fracción de proteínas asociadas al peptidoglicano e inmunodetección de OprL con el anticuerpo monoclonal MA1-6. (A) Las proteínas asociadas al peptidoglicano de *P. aeruginosa* PAO 1162 (1), *P. putida* KT2440 (2), *P. putida* PX (3) y *P. putida* 14G3 (4) se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 14% (p/v) con SDS y se tiñeron con azul de Coomassie. M, patrones de peso molecular. El tamaño en kDa se indica en el margen izquierdo. Las muestras de proteína se obtuvieron como se indicó en el apartado 16 de la sección *Materiales y Métodos*. Las muestras no se trataron con β -mercaptoetanol, ya que en presencia de este agente reductor, el producto de 21 kDa presentaba una movilidad electroforética idéntica a OprL. (B) Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a nitrocelulosa, y OprL se detectó inmunológicamente usando el anticuerpo monoclonal MA1-6. *P. aeruginosa* se utilizó como control positivo. El orden de las muestras es el mismo que en el panel A. La flecha indica la posición de la banda de 19 kDa correspondiente a OprL. (C) Inmunodetección de OprL en extracto celular total. *P. putida* KT2440 (1) y *P. putida* PX (2) cultivadas en medio LB líquido, se recogieron por centrifugación al final de la fase exponencial y se prepararon extractos de proteína celular total como se describió en el apartado 14.1 de la sección *Materiales y Métodos*. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 12,5% (p/v) con SDS, se transfirieron a nitrocelulosa, y OprL se detectó con el anticuerpo MA1-6 mediante revelado quimioluminiscente. En el margen izquierdo se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular en kDa.

3. TRATAMIENTO DE *P. putida* KT2440 CON GLOBOMICINA

Los péptidos señal de todas las prolipoproteínas celulares son escindidos por la enzima peptidasa señal II, una proteína integral de la membrana interna codificada por el gen *lspA* (Braun y Wu, 1994; Pugsley, 1993). Esta enzima es inhibida específicamente por el antibiótico peptídico cíclico globomicina (Inukai *et al.*, 1978), que no está disponible comercialmente (cedido por M. Inouye, Piscataway, New Jersey, USA). La inhibición del procesamiento de una determinada proteína con este antibiótico es una

prueba de su naturaleza lipoproteica. Con este fin, extractos de proteína celular total obtenidos de células de *P. putida* KT2440 cultivadas en presencia de globomicina, se analizaron usando el anticuerpo monoclonal MA1-6 y se determinó si existía o no inhibición del procesamiento de OprL. Como se puede observar en la Figura 37, en las células tratadas con globomicina apareció una banda adicional de proteína de menor movilidad electroforética que seguramente corresponde a OprL provista aún de su péptido señal. Así pues, el hecho de que la globomicina, a la concentración usada en el ensayo, inhibiese en mayor o menor medida el procesamiento de OprL, demostraba que *oprL* verdaderamente codificaba una lipoproteína.

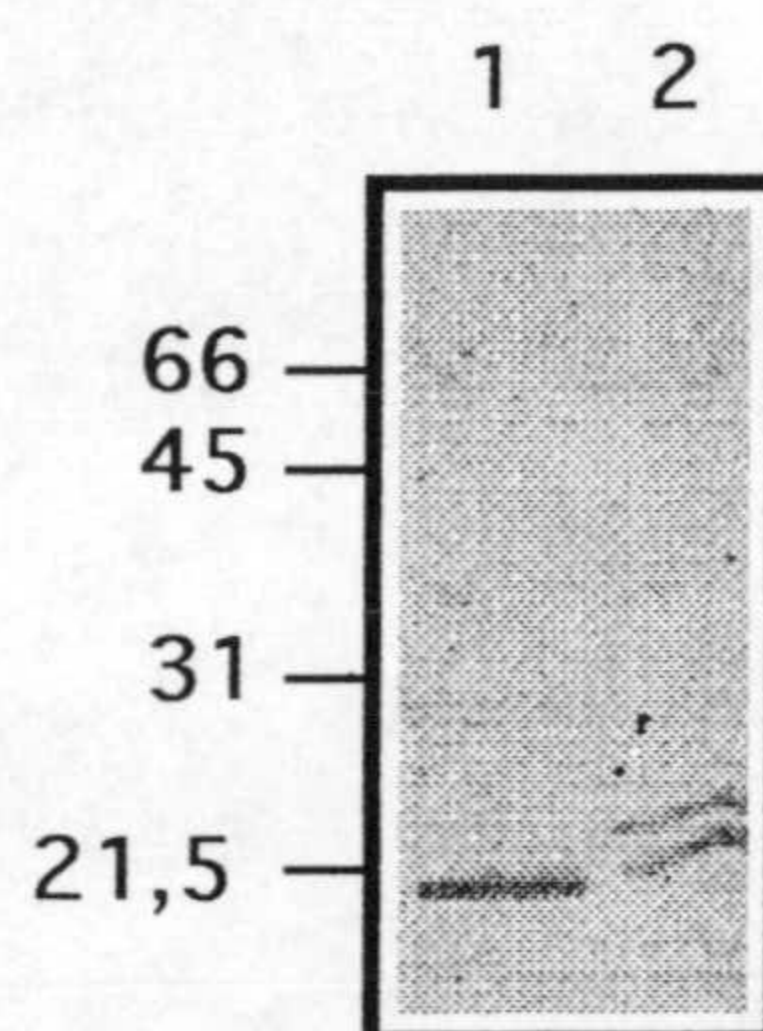


FIGURA 37. Tratamiento de *P. putida* KT2440 con globomicina. Células de *P. putida* KT2440 se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar una DO_{660} de 0,5. En este momento, como se describió en el apartado 15 de la sección *Materiales y Métodos*, a una parte del cultivo se le añadió globomicina a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$, y la incubación se continuó durante 45 min (calle 2). Otra parte del cultivo se continuó incubando sin globomicina (calle 1). Después de dicho periodo, se prepararon muestras de proteína celular total y se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (p/v) con SDS, se transfirieron a nitrocelulosa y la proteína OprL se detectó inmunológicamente con el anticuerpo MA1-6. En el margen izquierdo se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular en kDa.

4. ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL MUTANTE *oprL* NULO *P. putida* PX

El mutante *P. putida* PX se caracterizó fenotípicamente comparándolo con su cepa parental *P. putida* KT2440 y con el anterior mutante *oprL P. putida* 14G3.

4.1. Crecimiento en medio rico con distintas concentraciones de NaCl

El tiempo de generación en medio LB líquido (1% [p/v] de NaCl) fue similar para las tres cepas estudiadas. La cepa silvestre *P. putida* KT2440 presentó un tiempo de

generación de 37 ± 2 min mientras que el tiempo de generación de los mutantes fue de 42 ± 3 min. *P. putida* PX, al contrario que *P. putida* 14G3, formó menos cantidad de grumos tras la fase de crecimiento exponencial, y fue capaz de crecer en medio LB líquido con 0,1% (p/v) de NaCl a una tasa similar a la de la cepa silvestre.

4.2. Ensayos de resistencia/sensibilidad a diversos compuestos

Se comparó el patrón de resistencia/sensibilidad de *P. putida* PX a diferentes antibióticos, con el de la cepa silvestre. El crecimiento de la cepa mutante, al igual que el de la parental, no se inhibió con los antibióticos ampicilina, cloramfenicol, eritromicina y vancomicina, a las concentraciones suministradas en los discos. La cepa mutante, al contrario que la cepa 14G3, fue más sensible que la cepa KT2440 a los antibióticos estreptomicina, kanamicina, ácido nalidíxico, neomicina, piperacilina, rifampicina y tetraciclina, con halos de inhibición del crecimiento que variaron entre 1,3 veces (para la neomicina) y 1,7 veces (para la estreptomicina) los de la cepa silvestre (Fig. 38).

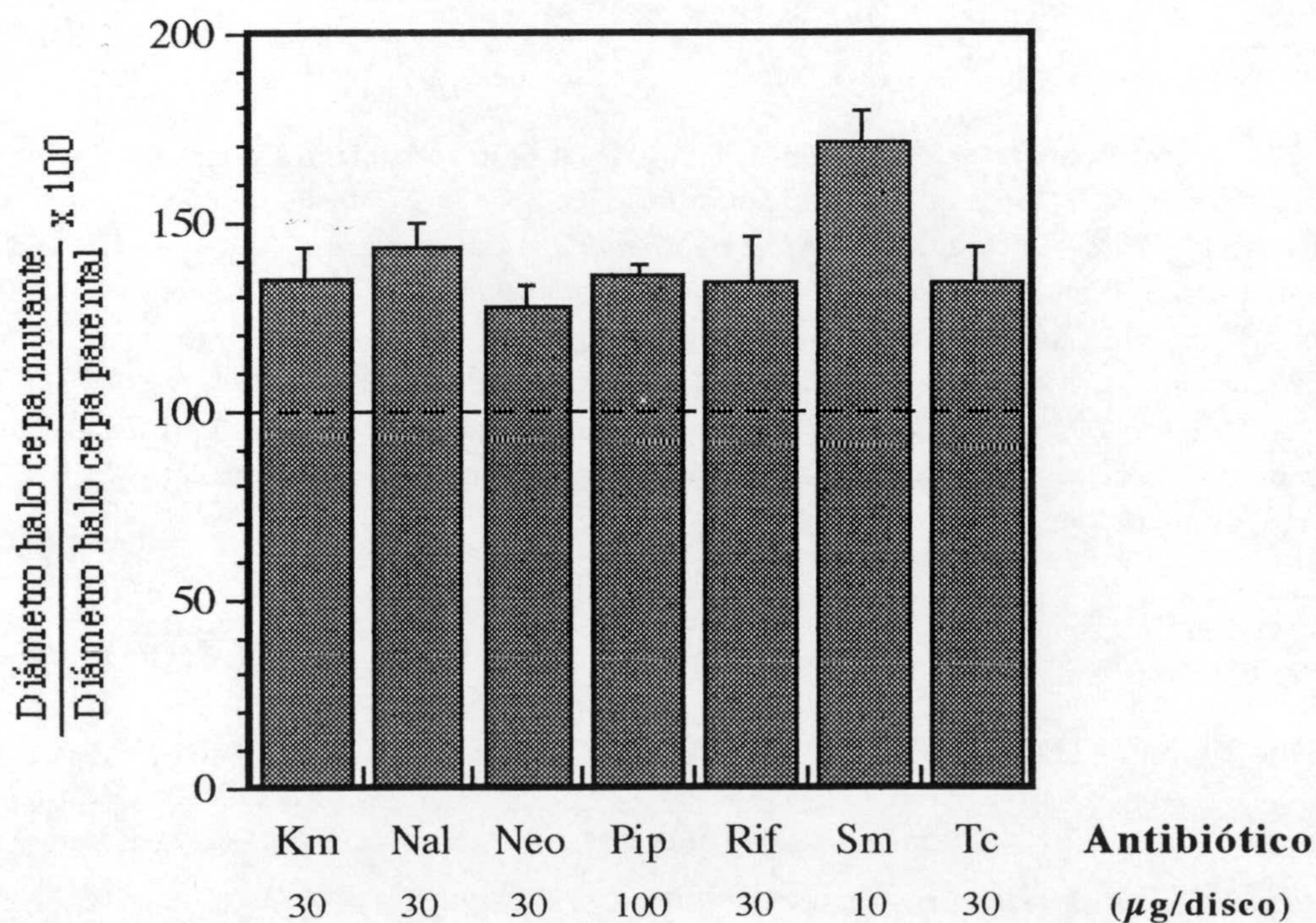


FIGURA 38. Comportamiento comparativo de *P. putida* PX y *P. putida* KT2440 frente a distintos antibióticos. Los ensayos de resistencia/sensibilidad se realizaron como se indicó en el apartado 13.1 de la sección *Materiales y Métodos*. El grado de resistencia/sensibilidad de la cepa mutante se refirió al de la cepa silvestre y se expresó en forma de porcentaje. De esta forma, un porcentaje del 100% implica que ambas cepas mostraron el mismo grado de resistencia/sensibilidad. Porcentajes inferiores (por debajo de la línea punteada) indican que la cepa mutante fue más resistente que la silvestre y porcentajes superiores al 100% (por encima de la línea punteada) indican un mayor grado de sensibilidad de la cepa mutante. Se muestran los valores medios obtenidos a partir de siete experimentos independientes. Las líneas que aparecen encima de cada barra representan las desviaciones de la media.

Por otro lado, el comportamiento de *P. putida* PX frente a los compuestos SDS y EDTA fue similar al descrito para la cepa 14G3 (Fig. 39A y B). En el caso del deoxicolato, el mutante nulo fue más sensible que la cepa 14G3 a este compuesto, que a una concentración de 25 mM ya inhibió el crecimiento de la cepa *P. putida* PX (Fig. 39C).

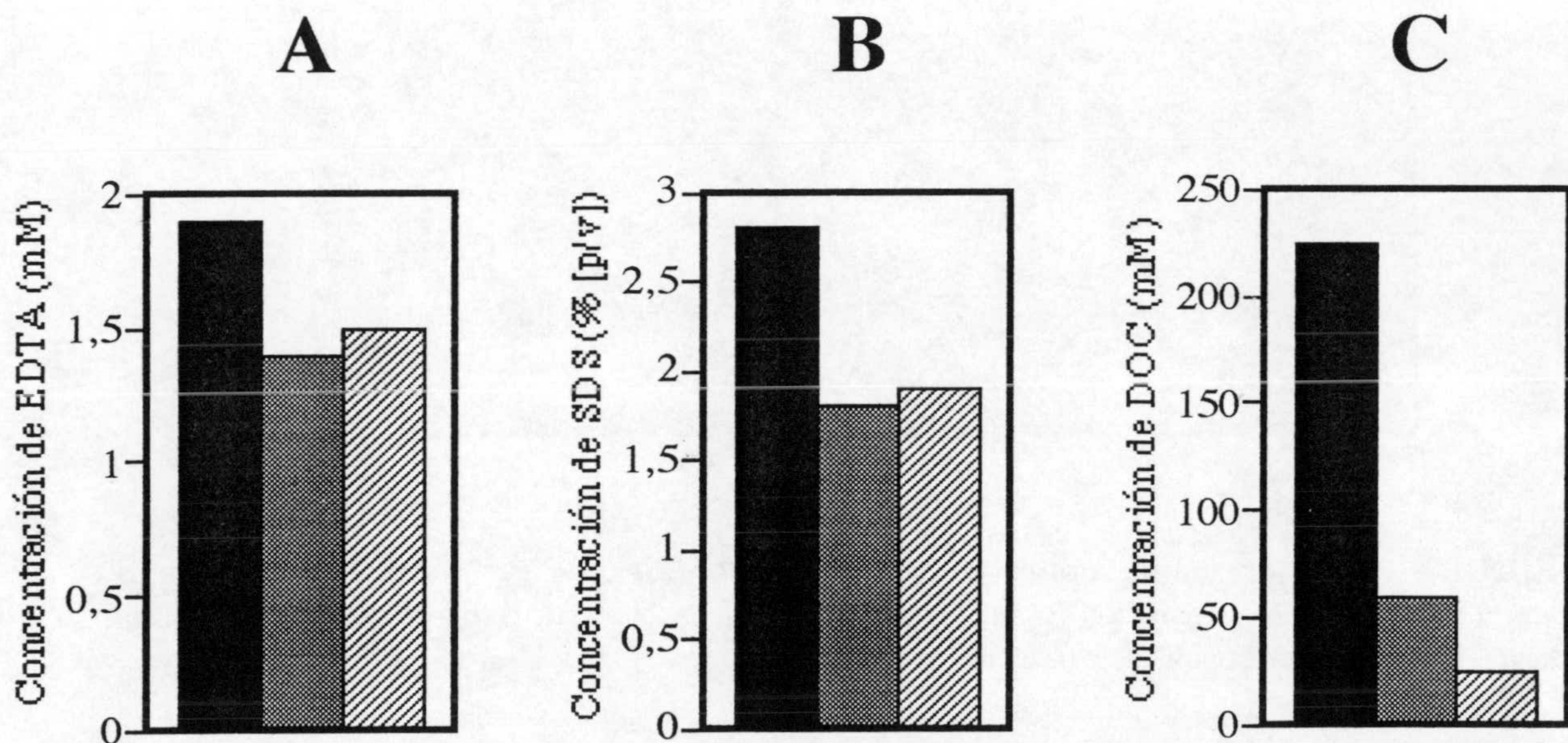


FIGURA 39. Comportamiento de *P. putida* KT2440 y los mutantes *oprL* frente a distintos compuestos. Los ensayos de resistencia/sensibilidad frente a EDTA (A), SDS (B) y deoxicolato (C) se realizaron según se indicó en el apartado 13.3 de la sección *Materiales y Métodos*. La capacidad de *P. putida* KT2440 (color negro), *P. putida* 14G3 (color gris) y *P. putida* PX (rallado) para formar colonias aisladas en presencia de los distintos compuestos a la concentración indicada, se estimó tras 16 horas de incubación a 30°C.

4.3. Observación de *P. putida* PX al microscopio óptico y al electrónico

Células de *P. putida* PX y de la cepa parental cultivadas en medio LB, se observaron al microscopio óptico de contraste de fases. El aspecto del cultivo de la cepa *P. putida* KT2440 (no mostrado) fue prácticamente idéntico al de la cepa *P. putida* EEZ40 (ver Fig. 18A). Las células de *P. putida* PX presentaron un aspecto similar al de la cepa silvestre aunque, al igual que ocurría en el caso de la cepa *P. putida* 14G3, se observó la presencia de numerosos filamentos celulares (Fig. 40).

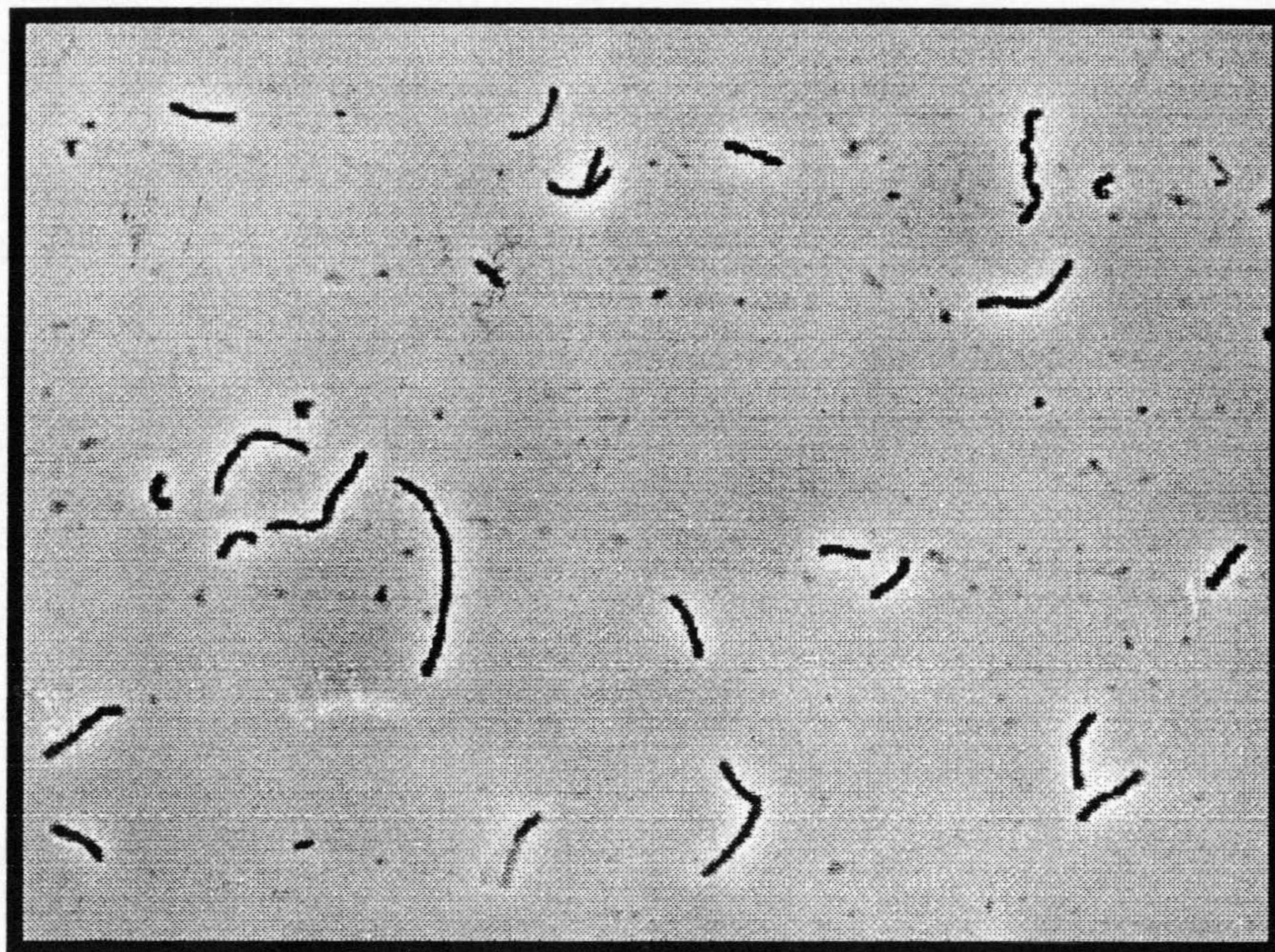


FIGURA 40. Microscopía óptica de contraste de fases de *P. putida* PX. Células de *P. putida* PX se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar una DO_{660} de 0,6 y después se observaron mediante microscopía de contraste de fases. Aumentos, x 640.

Al microscopio electrónico de barrido, las células de la cepa KT2440 presentaron un aspecto similar al descrito para la cepa *P. putida* EEZ40 (no mostrado). En el caso de *P. putida* PX se observó la presencia de filamentos celulares formados principalmente por unidades celulares definidas, aunque en ocasiones no se apreciaba ninguna señal externa de separación entre células (Fig. 41A y B). Al contrario de lo que ocurría con *P. putida* 14G3, en el caso de *P. putida* PX no se observaron evaginaciones membranosas en la superficie celular. A mayores aumentos se observó con frecuencia que las células que componían un mismo filamento tenían tamaños dispares (Fig. 41C y D).

Además, la división celular parecía estar afectada en una fase muy avanzada, ya que los tabiques de septación entre células eran por lo general evidentes (Fig. 41C y D).

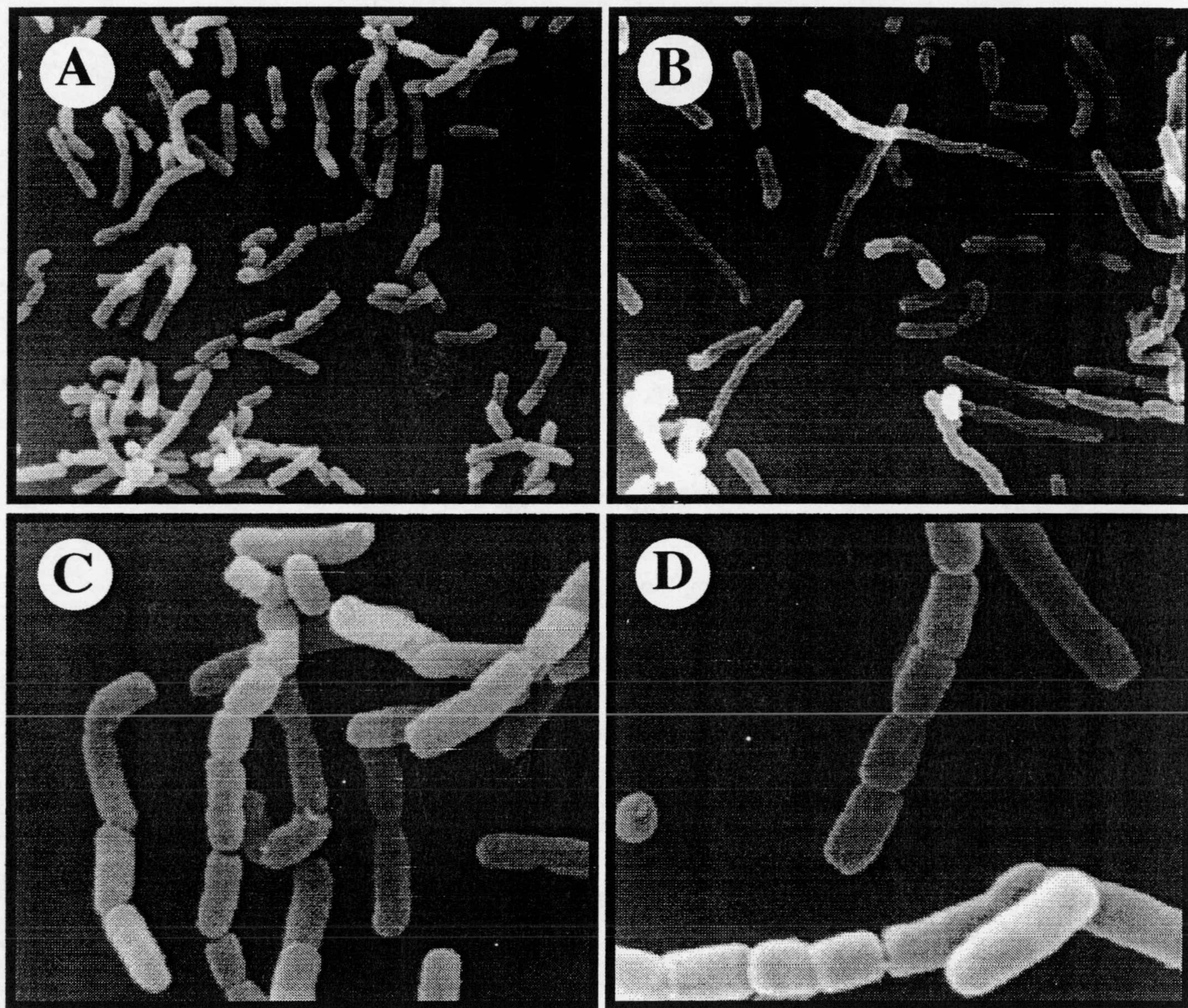


FIGURA 41. Microscopía electrónica de barrido de células de *P. putida* PX. Células de *P. putida* PX se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar una DO_{660} de 0,6. Entonces, se prepararon como se indicó en el apartado 8.3 de la sección *Materiales y Métodos*, y se observaron al microscopio electrónico de barrido. Aumentos: (A) x 2.500, (B) x 3.000, (C) x 7.000, (D) x 10.000.

La ultraestructura de *P. putida* PX y de *P. putida* KT2440 también se analizó al microscopio electrónico de transmisión, en las distintas fases del crecimiento. Independientemente de la fase de crecimiento, las células de la cepa silvestre presentaron un aspecto homogéneo, típico de las bacterias del género *Pseudomonas* (no mostrado), similar al presentado por la cepa *P. putida* EEZ40 (ver Fig. 20A y B). Las células de la cepa mutante, en lugar de la característica morfología redondeada, aparecieron deformadas (Fig. 42A y B), aunque su membrana externa no presentó las discontinuidades observadas en el caso de la cepa 14G3 (ver Fig. 20E). Cuando el corte coincidió adecuadamente también se pudieron visualizar los filamentos celulares (Fig. 42A). A veces, las zonas de unión entre las células que formaban parte de un filamento eran muy estrechas, e incluso en ocasiones las dos membranas de la envoltura celular parecían estar formadas casi por completo, lo que corroboraba las observaciones hechas al microscopio electrónico de barrido (Fig. 42C). En la fase de crecimiento exponencial no se observó, como ocurrió en el caso de la cepa 14G3, la presencia de "fantasmas celulares", aunque en la fase de crecimiento estacionario sí se pudieron apreciar numerosas células transparentes al paso de los electrones (Fig. 42D).

4.4. Liberación de enzimas periplásmicos al medio extracelular

La liberación de proteínas periplásmicas al medio extracelular fue uno de los primeros fenotipos descritos para los mutantes *pal* de *E. coli* (Bernadac *et al.*, 1998; Fognini-Lefebvre *et al.*, 1987; Lazzaroni y Portalier, 1992). Para estudiar si el mutante *P. putida* PX también presentaba dicho fenotipo, primero se transfirió el plásmido pJB3Km1 mediante sendas conjugaciones "tripartitas" desde *E. coli* JM109 a *P. putida* KT2440 y a *P. putida* PX. Este plásmido porta el gen *bla* que codifica la enzima β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina y piperacilina, entre otros antibióticos β -lactámicos. Se analizó entonces la presencia de dicha enzima β -lactamasa en la fracción sobrenadante de cultivos de las cepas silvestre y mutante *oprL* de *P. putida* que portaban el plásmido pJB3Km1. Los cultivos se recogieron en la fase de crecimiento exponencial para evitar en lo posible las interferencias debidas a la lisis celular que ocurre en fases posteriores del crecimiento. En la fracción sobrenadante de la cepa mutante PX se pudieron observar bandas de proteína que no estaban presentes en el caso de la cepa silvestre (Fig. 43A). Además, la cepa mutante PX liberó β -lactamasa al medio extracelular, como demostraba el hecho de que un anticuerpo anti- β -lactamasa reconociese un producto de un tamaño similar al esperado (29 kDa) (Fig. 43B). Por el contrario, en el caso de la cepa silvestre no se observó liberación de este enzima. Para comprobar si dicha liberación era específica de la fracción de proteínas periplásmicas o si era un resultado indirecto de fenómenos de lisis celular, se estudió la presencia de la proteína citoplásmica

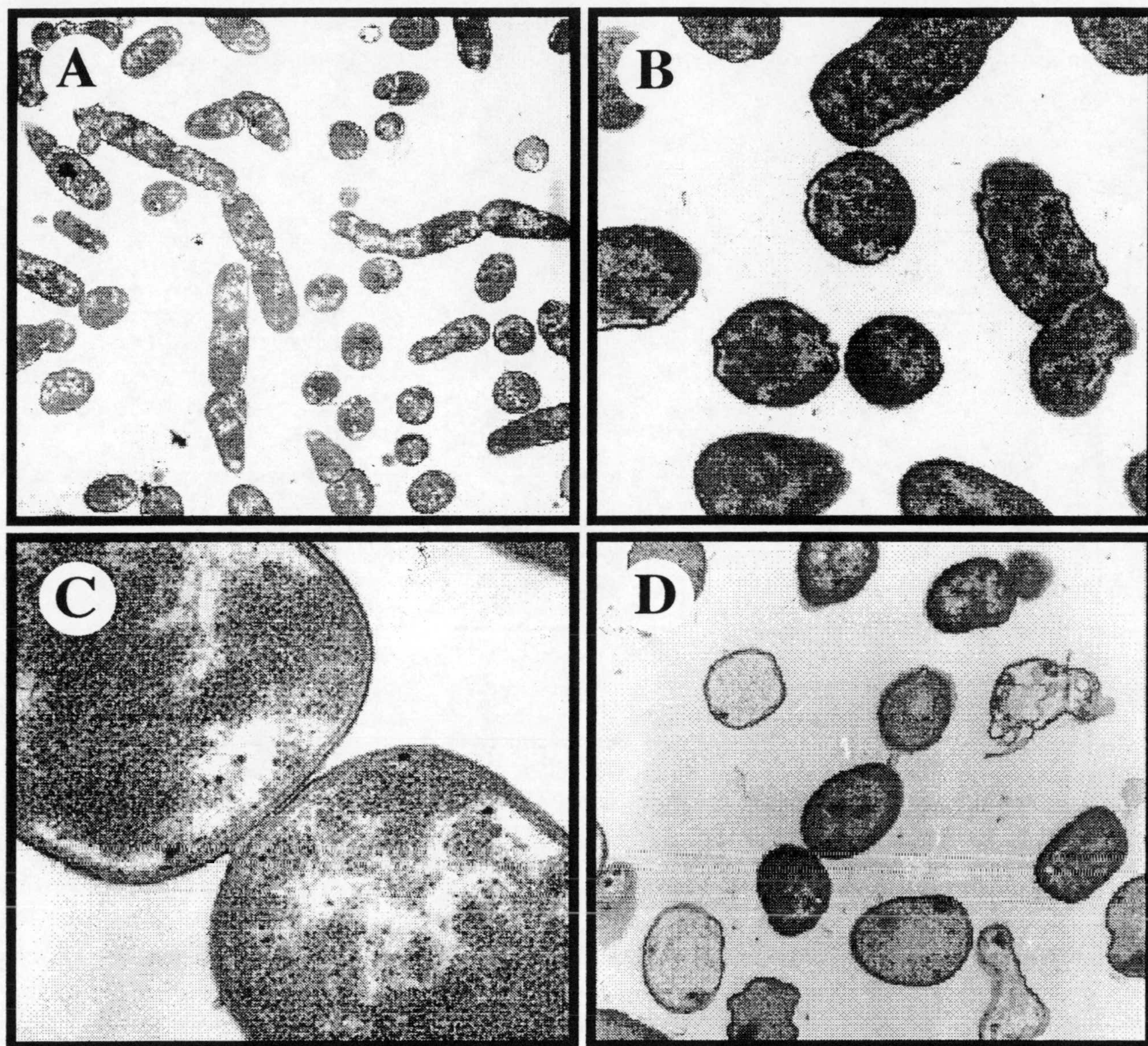


FIGURA 42. Microscopía electrónica de transmisión de células de *P. putida* PX. Las células de *P. putida* PX se cultivaron en medio LB líquido y se recogieron en las fases exponencial y estacionaria. Después, las muestras se prepararon como se indicó en el apartado 8.2 de la sección *Materiales y Métodos*, y se observaron al microscopio electrónico de transmisión. (A) Fase exponencial, x 4.400. (B) Fase exponencial, x 16.000. (C) Detalle de la zona de separación entre dos células que forman parte de un filamento; fase exponencial, x 50.000. (D) Fase estacionaria, x 16.000.

RpoS (σ^{38}) en la fracción sobrenadante de dichos cultivos. No se observó la presencia de dicho marcador citoplásmico en el medio extracelular de ninguna de ambas cepas (Fig. 43C). Además, se comprobó que la proteína RpoS era suficientemente estable como para detectarse en la fracción sobrenadante de cultivos celulares que presentaban

células lisadas (no mostrado). Así, se demuestra que el mutante *oprL* de *P. putida* libera β -lactamasa periplásmica al medio extracelular durante la fase de crecimiento exponencial.

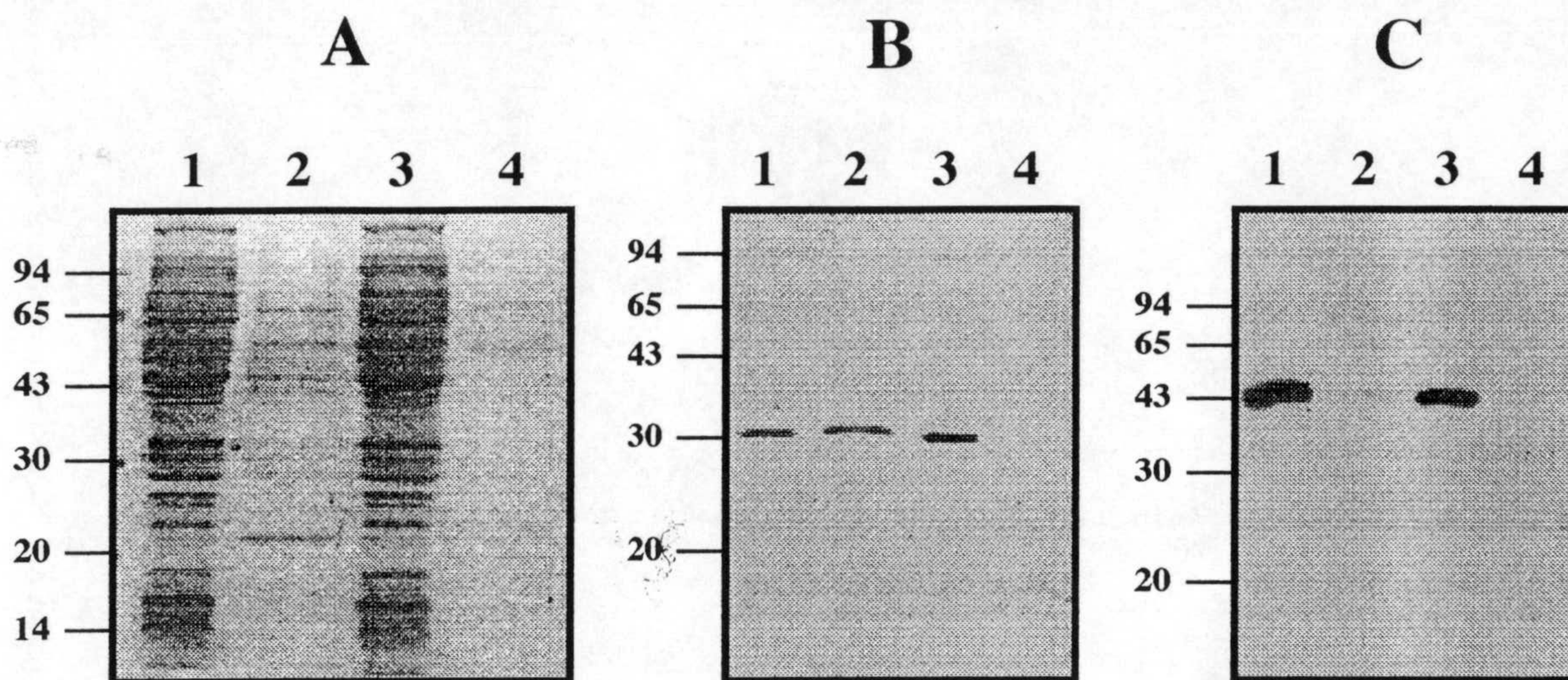


FIGURA 43. Liberación de β -lactamasa periplásmica en el mutante *P. putida* PX. Células de *P. putida* PX (pJB3Km1) (calles 1 y 2), y *P. putida* KT2440 (pJB3Km1) (calles 3 y 4), se cultivaron en medio LB líquido con kanamicina hasta alcanzar una DO_{660} de 0,64 y 0,55, respectivamente. Entonces, se recogieron por centrifugación y se prepararon extractos de proteína celular total (calles 1 y 3) como se describió en el apartado 14.1 de la sección *Materiales y Métodos*. También se analizó la fracción sobrenadante de dichos cultivos (calles 2 y 4) como se indicó en el apartado 17 de dicha sección. Las distintas muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% (p/v) con SDS y se tiñeron con azul de Coomassie (A). Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a nitrocelulosa, y se realizó una detección inmunológica usando un anticuerpo policlonal contra la enzima β -lactamasa (B). Al mismo tiempo, la proteína RpoS utilizada como marcador citoplásmico, se detectó inmunológicamente usando un anticuerpo policlonal generado contra la proteína RpoS de *E. coli* (C). Los revelados se realizaron por métodos quimioluminiscentes. Para el análisis de las muestras de sobrenadante celular se utilizaron 0,5 equivalentes de DO_{660} -ml/calle y para el de los extractos de proteína celular total, 0,3 equivalentes/calle. En el margen izquierdo de cada figura se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular en kDa.

5. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DEL MUTANTE *P. putida* PX CON EL GEN *oprL* SILVESTRE

Para los ensayos de complementación de la mutación de la cepa *P. putida* PX se utilizó un minitransposón que llevaba el gen *oprL* clonado bajo el control del promotor P_{irc} . Para su construcción, el fragmento *EagI* de 1.043 pb de pPRO200 conteniendo el

gen *oprL* (ver Fig. 22), se clonó en el sitio *NotI* del plásmido pCNB5 (Fig. 15), que portaba un mini-Tn5*lacI*^q/*P*_{trc} resistente a kanamicina. Entre los distintos clones que se obtuvieron se seleccionó uno que poseía el gen *oprL* en la orientación adecuada para su expresión desde el promotor *P*_{trc}. Posteriormente, dicho transposón se transfirió mediante conjugación "tripartita" a *P. putida* PX. De los distintos transconjugantes obtenidos tras la selección en medio sólido LB suplementado con kanamicina, se eligió uno al azar que se denominó *P. putida* PX *oprL*. Como control, también se construyó una cepa *P. putida* PX que llevaba el mismo mini-Tn5 pero sin el gen *oprL*. El fenotipo de la cepa *P. putida* PX *oprL* se comparó con el de las cepas mutante y silvestre. Al contrario de lo que ocurría en el caso de *P. putida* PX, la cepa *P. putida* PX *oprL* nunca formó grumos durante su cultivo en medio LB líquido. Además, al analizar dicha cepa por microscopía óptica de contraste de fases, no se observaron los filamentos celulares característicos de la cepa mutante. Por último, en lo que se refiere al patrón de resistencia/sensibilidad a antibióticos, la cepa complementada, en relación con la mutante, recuperó en un 60-70% los niveles de resistencia mostrados por la cepa silvestre, excepto en el caso de la estreptomicina que sólo se recuperó en un 20%. La cepa control *P. putida* PX con el mini-Tn5, se comportó en todos los casos de manera similar a la cepa *P. putida* PX. En ningún caso fue necesario añadir IPTG para inducir la expresión a partir de *P*_{trc}.

6. CONSTRUCCIÓN Y ESTUDIO DE LA TOLERANCIA A TOLUENO DE UN MUTANTE *oprL* DE LA CEPA *P. putida* DOT-T1

Para comprobar si la mutación del gen *oprL* producía un fenotipo similar en otras cepas de *P. putida*, se optó por construir un mutante *oprL* de *P. putida* DOT-T1, una cepa capaz de crecer en presencia de concentraciones de tolueno superiores al 10% (v/v) (Ramos *et al.*, 1995). De esta forma, se podría analizar también si la proteína OprL desempeñaba algún papel en el proceso de tolerancia a tolueno.

6.1. Construcción de un mutante *oprL* nulo de la cepa *P. putida* DOT-T1

La cepa mutante *oprL* de *P. putida* DOT-T1 se construyó de la misma forma que el mutante *oprL* de la cepa *P. putida* KT2440, usando el plásmido pKNG101XYLE (Fig. 34) a excepción de que, para permitir la resolución del cointegrado, la cepa merodiploide se sembró en medio LB sólido sin antibióticos y se incubó durante una noche a 30°C. Después, tras mantener la placa de cultivo durante 3 días a 4°C, células provenientes de colonias de este cultivo se sembraron directamente en placas de medio LB sólido suplementado con 6% (p/v) de sacarosa, y se analizó el fenotipo de las colonias que aparecieron. Una de ellas, que poseía el fenotipo esperado, se analizó por PCR y mediante hibridaciones de ADN, como se hizo en el caso de *P. putida* PX. El resultado

fue positivo y la cepa mutante *oprL* se denominó *P. putida* T1PX. La ausencia de producción de proteína OprL en la nueva cepa mutante, se confirmó usando el anticuerpo monoclonal MA1-6 (Fig. 44).

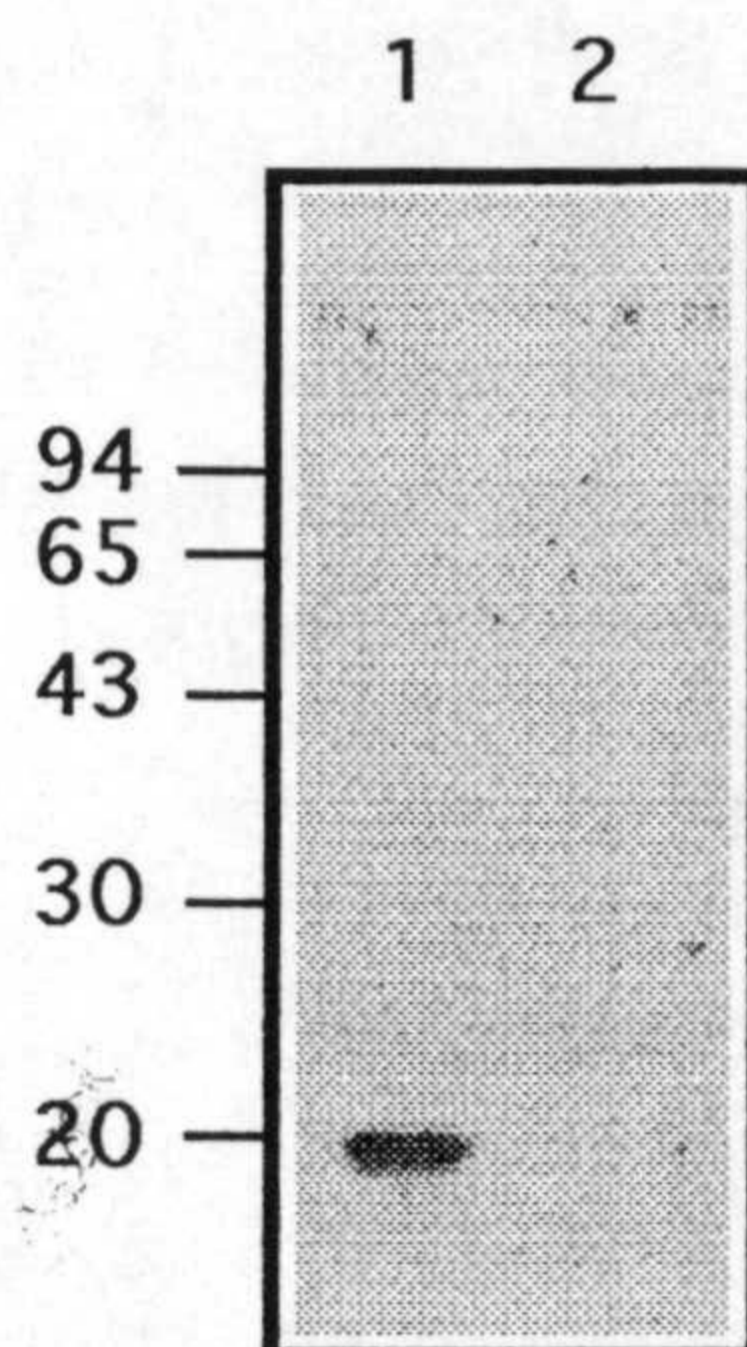


FIGURA 44. Inmunodetección de OprL en extracto celular total de *P. putida* DOT-T1. Células de *P. putida* DOT-T1 (1) y *P. putida* T1PX (2) cultivadas en medio LB líquido, se recogieron por centrifugación al final de la fase exponencial y se prepararon extractos de proteína celular total como se describió en el apartado 14.1 de la sección *Materiales y Métodos*. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 12,5% (p/v) con SDS, se transfirieron a nitrocelulosa, y OprL se detectó con el anticuerpo MA1-6 mediante un revelado quimioluminiscente. En el margen izquierdo se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular en kDa.

6.2. Observación de *P. putida* T1PX al microscopio óptico

Células de *P. putida* T1PX y de la cepa parental DOT-T1 cultivadas en medio LB, se observaron al microscopio óptico de contraste de fases. Las células de *P. putida* T1PX presentaron un aspecto similar al de la cepa *P. putida* PX (ver Fig. 40) observándose también la presencia de numerosos filamentos celulares (Fig. 45).

6.3. Comportamiento de *P. putida* T1PX frente al tolueno

En colaboración con la Dra. Estrella Duque, se estudió el comportamiento de *P. putida* T1PX en presencia de tolueno. Mientras que la cepa parental toleraba concentraciones de tolueno superiores al 10% (v/v), la cepa mutante fue incapaz de crecer en LB suplementado con 0,3% (v/v) de tolueno. Se sabe que la cepa *P. putida* DOT-T1 posee varios sistemas dependientes de energía para la exclusión de solventes orgánicos, que reducen la concentración de dichos compuestos en las membranas, hasta alcanzar

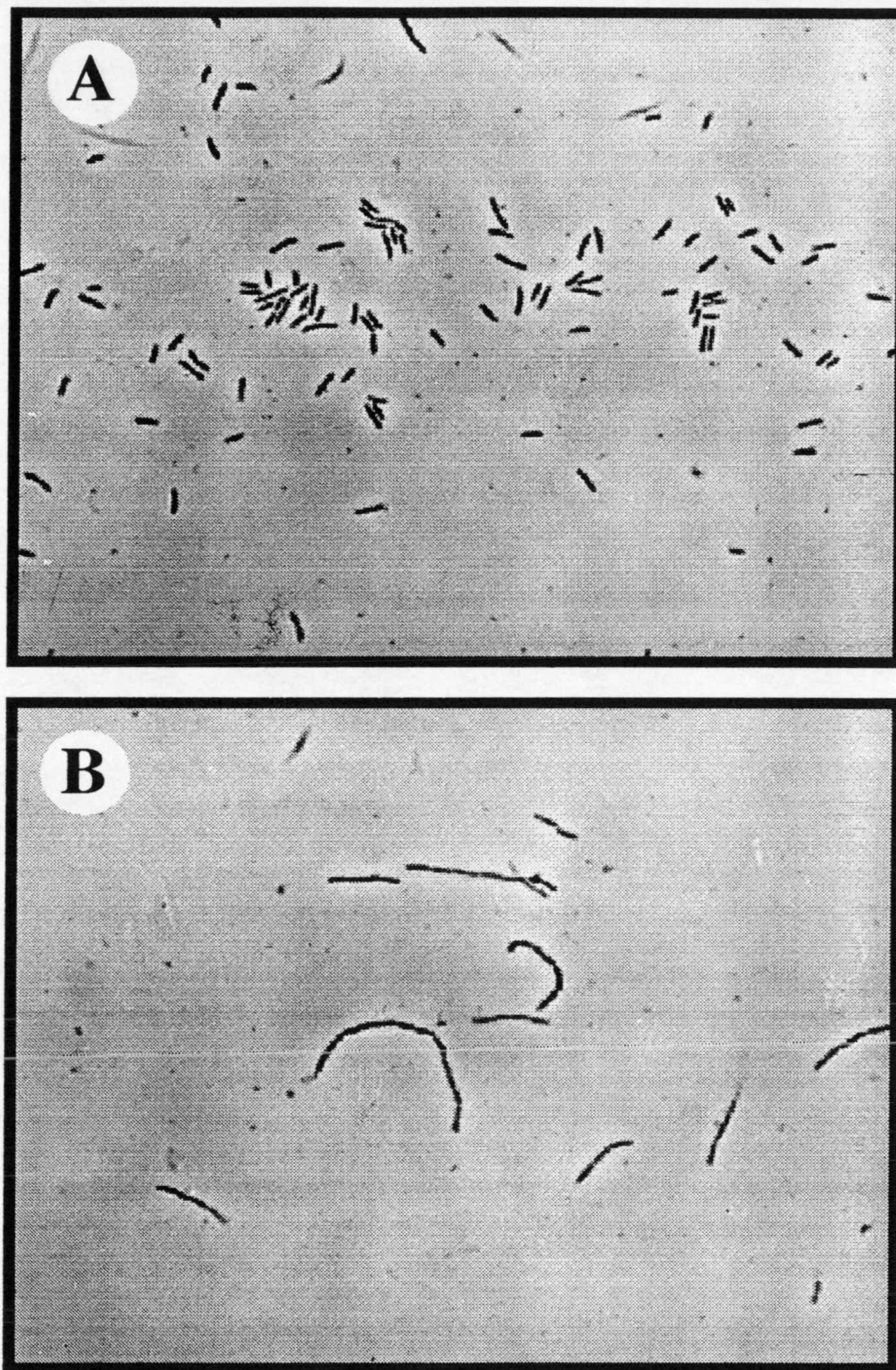


FIGURA 45. Microscopía óptica de contraste de fases de *P. putida* DOT-T1 y *P. putida* T1PX. Células de *P. putida* DOT-T1 (A) o *P. putida* T1PX (B) se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar una DO_{660} de 0,5 en el caso de la cepa mutante y de 0,6 en el caso de la parental, y después se observaron mediante microscopía de contraste de fases. Aumentos, x 640.

unos niveles que permiten el crecimiento de la bacteria (Ramos *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998). El grado de incorporación de tolueno en las membranas de la cepa *P. putida* T1PX se estudió como se describió en el apartado 20 de la sección *Materiales y Métodos*, y se comparó con el de la cepa parental. Para ello, se determinó la incorporación de 1,2,4-[¹⁴C]triclorobenceno, un análogo no metabolizable del tolueno, en las membranas de las cepas mencionadas. Las células se cultivaron en medio LB o en medio LB suplementado con tolueno a través de la fase gaseosa y, al alcanzar la fase de crecimiento exponencial, se incubaron durante 10 min en presencia del mencionado compuesto. Después, se determinó la cantidad de radiactividad asociada al sedimento celular. En ambas cepas, la cantidad de 1,2,4-[¹⁴C]triclorobenceno incorporada a las células cultivadas en presencia de tolueno fue 5 veces menor que en el caso de las células cultivadas en su ausencia. Sin embargo, *P. putida* T1PX acumuló 25 veces más radiactividad que la cepa parental, independientemente de si previamente se había cultivado en presencia o ausencia de tolueno. Esto sugiere que, para el adecuado funcionamiento de los sistemas de exclusión mencionados anteriormente, se requiere un cierto grado integridad de la envoltura celular, que no existe en el caso del mutante *oprL*.

Capítulo III

CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LAS REGIONES DE ADN QUE FLANQUEAN A LOS GENES *oprL*, *orf2*

RESUMEN

En este estudio se han secuenciado las regiones de ADN flanqueantes a los genes *oprL* y *orf2* previamente secuenciados. En primer lugar, se secuenció la región de ADN corriente arriba del gen *oprL* en el plásmido pPRO200. En dicha región, se encontró una fase de lectura abierta, incompleta en el extremo 5', que codificaría un polipéptido con similitud a la proteína TolB de *E. coli* y *H. influenzae*. Con objeto de completar la secuencia de esta fase de lectura, se subclonó en pUC18 un fragmento de 4,1 kb del cósmido pPRO50, que incluía el inserto de pPRO200 junto con ADN flanqueante adicional. La secuenciación se continuó tanto corriente arriba de *oprL* como corriente abajo del gen *orf2*. Posteriormente, para continuar secuenciando corriente arriba de *oprL*, se subclonó en pUC18 un fragmento de 8,2 kb proveniente del cósmido pPRO6 y se secuenciaron un total de 4,7 kb. En esta región se encontraron, en el mismo sentido de transcripción que *oprL*, diversas fases de lectura abierta cuyos hipotéticos productos presentaron similitud con las proteínas Orf1, TolQ, TolR, TolA y TolB de *E. coli* y *H. influenzae*, codificadas por la agrupación de genes *tol* de estos microorganismos. Además, corriente arriba de estos genes se encontró parte de una fase de lectura abierta que presentaba gran similitud con el gen *ruvB* de *P. aeruginosa*, que codifica una ADN helicasa de las uniones de Holliday. Corriente abajo de *orf2* se encontraron dos fases de lectura abierta, denominadas *orf3* y *orf4*, cuyos supuestos productos presentaban similitud con las proteínas ExsD y ExsB, respectivamente, de *Rhizobium meliloti*, implicadas en la biosíntesis de succinoglicano. La región de ADN que contenía los genes *orfU*, *tolQ*, *tolR*, *tolA*, *tolB*, *oprL* y *orf2* de *P. putida*, se subclonó en los plásmidos pUC18 y pJB3Km1 y se realizaron experimentos de complementación de cepas de *E. coli* mutadas en varios de estos genes. Sólo en el caso del gen *tolR* se pudo establecer la existencia de complementación de manera concluyente.

Con objeto de estudiar más en detalle la región de ADN donde se había insertado el minitransposón en la cepa *P. putida* 14G3, se procedió a la clonación, secuenciación y análisis de las regiones de ADN que flanqueaban a los genes *oprL* y *orf2* anteriormente analizados. En la Fig. 46 se muestra un esquema de la región secuenciada al completo, junto con las diferentes regiones de ADN portadas por los plásmidos utilizados en el presente estudio. Los detalles sobre la construcción de los plásmidos y el análisis de las secuencias correspondientes se detallan en las siguientes secciones de este capítulo.

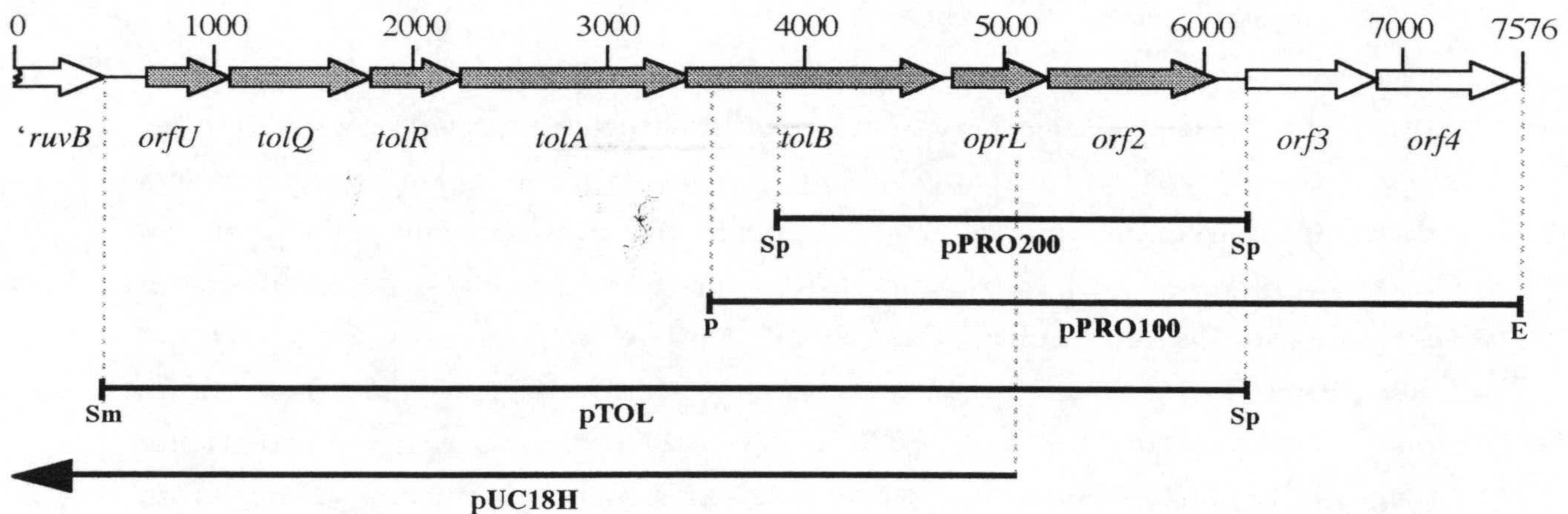


FIGURA 46. Esquema de la región secuenciada en el cromosoma de *P. putida*. En total se secuenciaron 7.576 pb. En color gris se indican los genes del sistema *tol*. En blanco se señalan los genes flanqueantes. El gen *ruvB* sólo se secuenció parcialmente. La escala numérica superior está en pares de bases. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Debajo del mapa génico se indica la región de ADN portada por los plásmidos pPRO200, pPRO100, pTOL y pUC18H. Éste último posee aproximadamente 1,5 kb adicionales corriente arriba de la secuencia parcial del gen '*ruvB*', y porta, además, la fusión *oprL-phoA* del mutante *P. putida* 14G3 (ver Fig. 66). Los sitios de restricción se indican como: E, *EcoRI*; P, *PstI*; Sm, *SmaI* y Sp, *SphI*.

1. CLONACIÓN Y ANÁLISIS DE LA REGIÓN DE ADN EN 5' CON RESPECTO AL GEN *oprL*

1.1. Clonación de la región en 5' con respecto al gen *oprL*

Cuando se analizó la región de 743 pb que quedaba por secuenciar corriente arriba del gen *oprL* en el plásmido pPRO200, se encontró una fase de lectura abierta truncada en el extremo 5' (Fig. 46), cuyo hipotético producto mostró una alta similitud con las proteínas TolB de *E. coli* y *H. influenzae*, que en estos microorganismos también se

hayan situadas adyacentes al extremo 5' del gen *pal*. Con objeto de secuenciar por completo este supuesto gen, se procedió a la clonación de un nuevo fragmento del cósmido pPRO50 que portase dicha secuencia adicional. Esta clonación la realizó la doctora María Isabel Ramos González y se describió en su tesis doctoral (1993). Para ello, el fragmento *NotI-SphI* de 1,2 kb del plásmido pPRO63, que portaba el gen *orf2* y parte del gen *oprL* (ver apartado 2 del Capítulo I), se usó como sonda en una hibridación contra el cósmido pPRO50 digerido con *EcoRI* y *HindIII*. Se encontró una señal de hibridación positiva con un fragmento *EcoRI-HindIII* de 4,1 kb (no mostrado), que se subclonó en el vector pUC18 previamente digerido con *EcoRI* y *HindIII*, dando lugar al plásmido pPRO100 (Fig. 46). La secuenciación se continuó corriente arriba de *'tolB*, pero se encontró que este plásmido sólo portaba 358 pb adicionales, adyacentes al sitio *HindIII* de pPRO100 e insuficientes para completar la secuencia del gen. Además, junto a este sitio *HindIII* y separado por dos "G" apareció un sitio *PstI*. Estos dos sitios también están presentes en el MCS del cósmido pLAFR3 y separados por la misma secuencia. Esto, junto con el hecho de que el inserto de pPRO50 provenía de una restricción parcial con *PstI* del cromosoma de *P. putida* nos hizo sospechar que dicho sitio *HindIII* no pertenecía en realidad al ADN de *P. putida*, sino al MCS del cósmido pLAFR3, como se confirmó posteriormente mediante hibridaciones con el cromosoma de *P. putida* y con el cósmido pPRO50 (no mostrado). Esto significaba que en pPRO50 no existía más secuencia nueva corriente arriba de *'tolB*, al localizarse el inserto de pPRO100 en uno de los extremos del inserto de pPRO50. Así pues, se optó por buscar dicha secuencia de ADN en el cósmido pPRO6, que portaba la mutación de la cepa *P. putida* 14G3 (ver apartado 2 del Capítulo I). Utilizando como sonda el fragmento *SalI-NcoI* de 921 pb del plásmido pPRO200 (ver Fig. 22) se realizó una hibridación contra el cósmido pPRO6 digerido con *HindIII* (no mostrado). Apareció una señal de hibridación positiva con un fragmento *HindIII* de 8,2 kb, que se subclonó en el vector pUC18 previamente digerido con *HindIII*, dando lugar al plásmido pUC18H (Fig. 46 y Fig. 66). Mediante análisis de restricción se determinó que en este plásmido existían aproximadamente 5,1 kb de secuencia desconocida corriente arriba del sitio *PstI* mencionado anteriormente. Parte de esta región se secuenció hasta completar un total de 4728 pb corriente arriba del gen *oprL*.

1.2. Análisis de la secuencia de ADN corriente arriba de *oprL* y comparación con las secuencias existentes en las distintas bases de datos

La nueva región secuenciada presentó un 60,5% de G+C, porcentaje muy similar al estimado para el ADN de *P. putida* (60%). En ella se encontraron 5 fases de lectura abierta con posible carácter codificante, cuyo uso de codones se ajustaba al de *P. putida*. La fase de lectura más cercana al gen *oprL*, denominada *tolB*, se localizó entre los nucleótidos 2.909 y 4.210 (Fig. 47) y codificaría un polipéptido de 433 aminoácidos con

Resultados - Capítulo III

	10	20	30	40	50	60	70	80
1	CCCCGGGCGCT	TGGGGGAGGG	GGGCGATTTT	TCCGAGCCAG	GCGATGAATG	ACAGATCGAA	AGCGACTTTT	TGTGGTCCCTA 80
81	CCGCTGGCAT	GCCCCTGGTG	CGCTGGCAAT	AAGACATTAA	TGAAGAAAAA	ACAGTTGCCA	CAGCGGATTG	GCAAGCTGAG 160
161	GAGTAAGCAC	TAGAGTATGC	GCGCGCAAAA	TCAGCTCGAA	CCGTTTCGCAC	ATCGGTGTTCG	CGTCTATTAC	GAAGATACCG 240
241	ATGCGGGCGG	CGTGGTGTAT	TACGTCAACT	ACCTGAAATT	CATGGAGCGC	GCGCGCACCG	AACGCCTGCG	GCACCTGGGC 320
321	TTTTCCAGT	CGCAACTGGC	TGAAGACAAC	CTGCTGTTCG	TGGTCCATTC	CAGCGAAGCG	CGCTATCACG	CGCCGGCGCG 400
401	GCTGGATGAC	GAATTGCGGG	TGACCGCGCA	GGTCCTTGAA	CTCAATCGCG	CCAGCTTGGC	TTTCGTACAG	CAGGTCTGGC 480
481	GGGAAAAGGA	TGAAACGCTG	CTTTGCGAAG	GGCAGTTCCT	GGTGGCTGCC	GTGCGCGCCG	ACACTTTCAA	ACCCCGAGCC 560
561	CTACCCCGCC	AGCTGCGCGA	CGCCTTTGCG	GCGGACGGCT	CGGGTAATCA	ATCGAATGCA	GGAGAATAAG	CGTGGAAAGCT 640
641	AACGTCGTCG	ACCATACCTC	CATGTGGAGT	CTGGTCAGCA	ATGCCAGCGT	GGTGGTACAG	CTGGTAATGC	TGACCCTGGT 720
721	GGCCGCCTCG	GTCACCTCAT	GGATCATGAT	CTTCCAGCGC	AGCACCATGC	TGCGCGCCCG	TCGTCTGCG	CTGGATGCCT 800
801	TCGAAGAGCG	CTTCTGGTCG	GGTATCGACC	TGTCCAAGCT	GTACCGCCAG	GCAGGCAGCA	ACCCAGACCC	GGACTCCGGC 880
881	GTAGAGCAGG	TGTTCCGTGC	CGGTTTCAAG	GAGTTCCTCG	GCCTGCGCCA	GCAACCGGGT	GTTGACCCGG	ACGCCGTTCAT 960
961	GGAAGGTGTT	GGCCGTGCCA	TGCGCGTGGC	CATCTCGCGC	GAGGAAGAAA	AACTCGAGCA	GAGCTTGCCG	TTCCTGGCCA 1040
1041	CCGTTGGTTC	GACCAGCCCG	TACATCGGCC	TGTTCCGCAC	CGTGTGGGGC	ATCATGAACT	CCTTCCCGCG	CCTGGCCAGC 1120
1121	GCCCAGCAGG	CCACCTGGC	TACCGTTGCT	CCGGGCATCG	CCGAAGCACT	GATCGCTACC	GCCATCGGCC	TGTTCCGCGC 1200
1201	AATCCCGGCT	GTTATTGCCT	ACAACCGTTT	CGCCGCGCGC	AGTGAAGTAC	TGATCGGCCG	TTACTACACC	TTCGCCGACG 1280
1281	AGTTCCAGGC	GATCCTGCAC	CGCAAAGTGC	ACACCAGCGA	AGAGTAATCA	GGTAGAAGCC	CATGGCCCGA	GTTCCGCACA 1360
1361	AACGCAAGCC	CGTCGCCGAG	ATGAACGTGG	TGCCCTACAT	CGACGTGATG	CTGGTGCTGC	TGGTCATCTT	CATGGTGACG 1440
1441	GCGCCCATGC	TCAACCAGGG	CGTGAAGGTC	GACCTGCCCA	AGGTTTCCAG	CGAAGCCTTG	CCGCAGGACA	ACAACGTCCA 1520
1521	GATCCTCACC	ATCTCCATCA	AGGCCGATAA	AACCTATTAC	TGGAACCTCG	GCAGCGAAGT	CGATACCGAC	AAGCAGATGG 1600
1601	ACAAAGCCAT	GACCTTGCCG	GCCATGACCG	ACGCCGTGAC	CAAGATCATT	GCTGCCGGCC	GTGACCAGGG	CAAGCAGACC 1680
1681	CAGGTGTTCA	TTCGTGGCGA	CAAGGCTGTC	GACTATGGCG	CGGTCATGGG	TGCCATGGGC	GGGTTGCAGA	AGGCCGGTGT 1760
1761	CGGTAACGTT	GGCCTGATTA	CCGAGGCGCC	CTGATGCAAC	AGCGAGAGCC	ATCCGCCCTCG	GAAAGCTACT	TCTGGCCCAG 1840
1841	TGTCTGGGCC	ATCGGCCTGC	ATGTGCTGGT	GTTCCGCCCTG	CTGTTCGTCA	GTTTTGCCAT	GACGCCGGAG	CTGCCGCCCT 1920
1921	CCAAGCCGAT	CGTTCAGGCT	ACCTGTACC	AGCTCAAGTC	CAAGAGCCAG	GCAACCACCC	AGACCAATCA	GAAGATTGCC 2000
2001	GGGGAGGCGA	AGAAAACCGC	TTCGCGCCAG	ACCGAAGTCG	AGCAGCTGGA	ACAGAAGAAG	GTCGAGCAGG	AGGCCGTGAA 2080
2081	GGCCGCGGAA	CAAAAAGAAAG	CTGACGCCGC	TCAAAAAGGCC	GAAGAGGCC	GCGAAGCCGC	CGAGGCAGAA	AAAGCCGAGG 2160
2161	ATGCTGCCAA	GGCCGCTGAA	GCCGCCAAGG	CTGCCGAGGC	CAAGAAAGCT	GCCGAAGCCA	AGAAGGCCGA	CGAGGCCAAG 2240
2241	AAAGCTGCCG	AGAAACAGCA	GGCCGACATC	GCCAAGAAGA	AGGCCGAGGA	CGAAGCCAAG	AAAAAAGCCG	AAGAAGAGGC 2320
2321	CAAGAAAGCG	GCCGCTGAAG	AGGCGAAGAA	GAAAGCCGCC	GAGGACGCCA	AGAAAAAGGC	AGCCGAAGAG	GCCAAGAAGA 2400
2401	AAGCAGCCGA	GGACGCCAAG	AAGAAAGCGG	CGGCCGAGGA	CGCGAAGAAG	AAGGCAGCTG	AAGAGGCCAA	GAAAAAGGCC 2480
2481	GCTGCAGATG	CCCAGAAGAA	GAAGGCACAG	GAAGCGGCC	GCAAGGCCGC	AGAAGACAAG	AAAGCCAGG	CACTGGCCGA 2560
2561	GCTGTTGTCC	GATACCACCG	AGCGGCAGCA	GGCGTGGCC	GACGAGCAGG	GTGACCAGGT	GGCCGGCGAC	TTCGACGACC 2640
2641	TGATCCGCAT	GCGCGCGGCC	GAGGGCTGGG	CACGTCCGCC	TTCCGCGCGC	AAGGGCATGA	CGGTGGTCTT	GCAGATCAAC 2720
2721	ATGTTGCCCG	ACGGTACCAT	CACCAATGTC	AGCGTGGCC	GGTCCAGTGG	TGACGGCCCG	TATGACAGTT	CGGCGGTGGC 2800
2801	TGCGGTGAAG	AACATTGGTC	GTTTGACCGA	GATGCAGGGT	ATGAAGCCGA	GCGATTTCAA	CCAATATCGT	TCGTTCAAGA 2880
2881	TGACATTTAC	ACCTGAGGAT	CTAGCGTGTG	GATTAACCGT	CTGAGAGGAC	TGCTGGTCAT	GCTCTGCTGC	GTGGCAGGCA 2960
2961	TGGCGGTGGC	AGAAGAAAAG	AACATCCTGG	TTACCAGCGG	CAGCGACCGG	GCCACGCCCA	TCGCGGTAGT	GCCGTTCCGGT 3040
3041	CTGCAGGCGG	GTAGCGTGTT	GCCTGAAGAC	ATCGCCGACA	TCATCGGCAA	CGACCTGCGC	AACTCTGGCT	ATTACTCGCC 3120
3121	AATTCGCGCG	CAGAACATGA	TCAGCCAGCC	GTCGCAGGCC	AGCGAAGTGA	TCTTCCGTGA	TTGAAAAGCG	CTGGGTGCAC 3200
3201	AGTACGTGAT	GGTCGGCAGC	ATCGTGCCGT	CGGGCGGTTCG	CCTGCAGGTG	CAGTACGCGC	TGTTCAAACG	CGCCACCGAG 3280
3281	CAGCAAGTGC	TGACCGGCAG	CGTGCGGGC	AGCACCAGCC	AGTTGCGCGA	CATGGCGCAC	TACATTGCCG	ACCAGTCGTT 3360
3361	CGAGAAGCTC	ACCGGCATCA	AGGGCGCGTT	CTCTACGCGC	ATGCTGTACG	TGACGGCCGA	GCGTTCCTCC	ACCAATAACA 3440
3441	CCCGCTACAC	CCTCCAGCGT	TCCGACTACG	ACGGTGCCCG	TGCGGTGACC	CTGCTGCAAT	CGCGTGAGCC	GATCCTGTTCG 3520
3521	CCGCGCTTTG	CGCCAGATGG	CAAACGTATC	GCCTACGTTT	CGTTCGAGCA	GAAGCGCCCA	CGTATCTTCG	TGCAGAACAT 3600
3601	CGATACTGGC	CGCCGCGAGC	AGGTGACCAA	CTTCGAAGGC	CTGAACGGTG	CGCCAGCCTG	GTCGCCGGAC	GGTTCGCGCC 3680
3681	TGGCGTTTCG	ACTGTCCAAG	GACGGCAACC	CGGACATCTA	CGTGATGAAC	GTGGCCTCGC	GCCAGATCAG	CCGTGTACT 3760
3761	GCAGGCCCGG	GTATCAATAC	CGAGCCGTTT	TGGGGTAAAG	ATGGCAACAC	CCTTACTTTC	ACTTCCGACC	GTGGCCGCAA 3840
3841	ACCGCAGATC	TATAAACAGT	CGGTCAGTGG	TGGTGGTGGC	GAGCGCGTAA	CGTTCGTAGG	TAATAACAAC	GCCAACCCGA 3920
3921	AACTTTCGGC	GGACGAAAAG	ACCCTGGTAA	TGATTCATCG	CCAACAGGGC	TTTACCAACT	TCAAAGTGGC	GGCACAGGAC 4000
4001	TTGCAACCGC	GAAGTGTAAG	GATTCTGTCT	GAAACAAGTC	TTGATGAGTC	TCCCACTGTT	GCGCCAAACG	GCACCATGCT 4080
4081	AATCTACGCC	ACCCGCCAGC	AGGGCCGGGG	AGTCTTGATG	CTCGTGTCGC	TGAACGGCCG	CGTGAGGCTC	CCACTTCCCTA 4160
4161	CCGCTCAAGG	CGAAGTCAGA	GAACCGTCC	GGTCCCCTTA	CCTGAACTGA	TTGCGGCCGA	ATACATTTTG	CTAACACAC 4240
4241	TGGGTTTCA	TTAGGAGTTT	CACGATGGAA	ATGCTGAAGT	TTGGTAAATT	TGCTGCGCTG	GCTCTGGCCA	TGGCCGTAGC 4320
4321	TGTAGTTCG	TCCTCGAAGG	GCGGTGATAA	CGCAGGCGAA	GGCGTGCTG	TAGACCCTAA	CGCTGGCTAC	GGTGCCAAAC 4400
4401	CTGGCGTGT	TGACGGCTCC	CTGAGCGAAG	AAGCCGCCCT	GCGCGCAATC	ACCACCTTCT	ACTTCGAATA	CGACAGCTCG 4480
4481	GACCTGAAGC	CAGAAGCCAT	GCCGCTCTG	GACGTTTCCG	CCAAGGACCT	GAAAGCCAA	GGCAACCCTG	TTGTTCTGGA 4560
4561	AGGTAACACC	GACGAGCGCG	GCACCTCGGA	GTACAACATG	GCTCTGGGTT	AGCGTCGTGC	GAAAGCCGTT	CAGCGCTACC 4640
4641	TGGTTCGCA	GGGCGTTTCC	CCTGCTCAGC	TGGAACGTTG	TTCTTACGCG	GAAGAGCGTC	CAGTTGCTAC	CGGCAACGAC 4720
4721	GAGCAGTCC	GGGCTCAGAA	CCGTCGCGTA	GAAGTGCATA	AGTAAGTTC	TATGCGTATG	TGCCGCCGTC	TAGTAACCCT 4800
4801	CCTCGACTC	AGCCTGCCCG	TTGCGGCCCTG	GGCTGAGGTC	CCTGTAGTAG	ATGACAACGC	AGGCAGCTAT	CCGCTGCGG 4880
4881	GTTATGGCAC	GAGCGCGGCC	TATGCCGGGT	CAGGGGCTTC	GGCCCTGCC	TCTGCACAGG	GCCAGCTGTT	CATGCAGCTG 4960
4961	CAACAGATGC	AGGATCAGCT	TTCCCGCCAG	CAAGGCATCA	TCGAAGAGCT	GCAAAAACGAT	GTGTTCCGCA	TGAAGCAGGA 5040
5041	AAACCTGGAG	CGTTACCAGG	ACCTGGACCG	TGCATCAAC	AGTGGCGCTG	CGCCTGCCGC	AACCCCTGAC	AATTCCTCCG 5120
5121	GTGGTGGCG	GTCCAATGCC	GCCCCGATG	CCGCAGCAGG	TGCTGTGCG	CAACAACCGG	CCGGCAGTAG	CCAGCCGCGT 5200
5201	GATCCGGCGA	AAGAGAAAGT	CTATTACGAC	GCAGCTTTCG	ACCTGATCAA	ACAGAAAGAC	TTCGACAAGG	CCAGCCAGGC 5280
5281	GTTCAACGCC	TTCCTGCGCA	AGTACCCCAA	CAGCCAGTAC	GCCGGTAATG	CCCAATACTG	GTTGGGTGAA	GTGAACCTGG 5360
5361	CCAAGGGTGA	CCTGCAAGGC	GCCAGCCAGG	CCTTTGCCCA	GGTCAGCCAA	AAGTACCCGA	AGCACAGCAA	GGTGCCAGAT 5440
5441	TCGCTGTACA	AACTGGCTGA	TGTCGAGCGC	CGTATGGGCC	ATACCGACAA	GGTAAAAGGC	ATCCTTCAGC	AGGTCGTGAC 5520
5521	CCAGTACCCC	GGCACCTCTG	CCGCTCAACT	GGCCAGCGT	GACCTGCAGA	AGCTCTAGGC	GTTGTCGCTG	TACCGCTCGA 5600
5601	AAGAAACCCG	CGCCAGTCGC	GGGTTTTTTC	GTTAGAATCA	CTGCCCTTTT	TTCGTAAACA	CGCTGCTGCG	GATAACGCTA 5680
5681	TGTCGAGTCC	GCGACAGTGC	CTGACGGAGG	CGGACAGCCT	GTTTETAGCTG	CACGCCCGTG	GCGAGCATGC	5750

FIGURA 47. Secuencia correspondiente a los genes *orfU*, *tolQ*, *tolR*, *tolA*, *tolB*, *oprL* y *orf2* de *P. putida*. En verde se indican las regiones intergénicas. En rojo se indican los codones de iniciación y de parada de la traducción. En negro se indica el resto de la secuencia codificante para cada gen. Las posiciones de los genes (según la numeración utilizada en la figura) fueron las siguientes: *orfU*, 177-629; *tolQ*, 632-1.327; *tolR*, 1.342-1.794; *tolA*, 1.794-2.912; *tolB*, 2.909-4.210; *oprL*, 4.265-4.765; *orf2*, 4.772-5.578. Esta secuencia está delimitada por un sitio *SmaI* en el extremo 5' y por un sitio *SphI* en el 3', indicados en negrita.

un peso molecular estimado de 47.401 Da. Dicho polipéptido poseía un 9,2% de glicina como aminoácido más abundante y los aminoácidos cargados (D, E, K y R) representaban el 19,7% del total. El perfil de hidrofobicidad de dicho polipéptido, predecía la presencia de un segmento amino terminal hidrofóbico, siendo el resto de la proteína de carácter mayoritariamente hidrofílico (Fig. 48). En el extremo amino terminal, el programa SignalP (ver sección *Materiales y Métodos*) predijo la existencia de un péptido señal de 21 aminoácidos en base a la regla -3, -1 (von Heijne, 1986). De acuerdo con ésta, en las posiciones -1 y -3 aparecían residuos neutros de pequeño tamaño, concretamente alanina (que está muy conservada en dichas posiciones, con un 86,1% y 58,7% de probabilidad, respectivamente), y además, los aminoácidos de las posiciones -5 (G) y -6 (A) coincidían con los que con más frecuencia aparecen en estas posiciones, con un 15,4% y 29,3% de probabilidad, respectivamente (Fig. 49). El punto de procesamiento se situaría entre la alanina de la posición 21 y el ácido glutámico de la posición 22 (Fig. 49). La proteína procesada tendría un tamaño de 412 aminoácidos con un peso molecular de 45.172 Da.

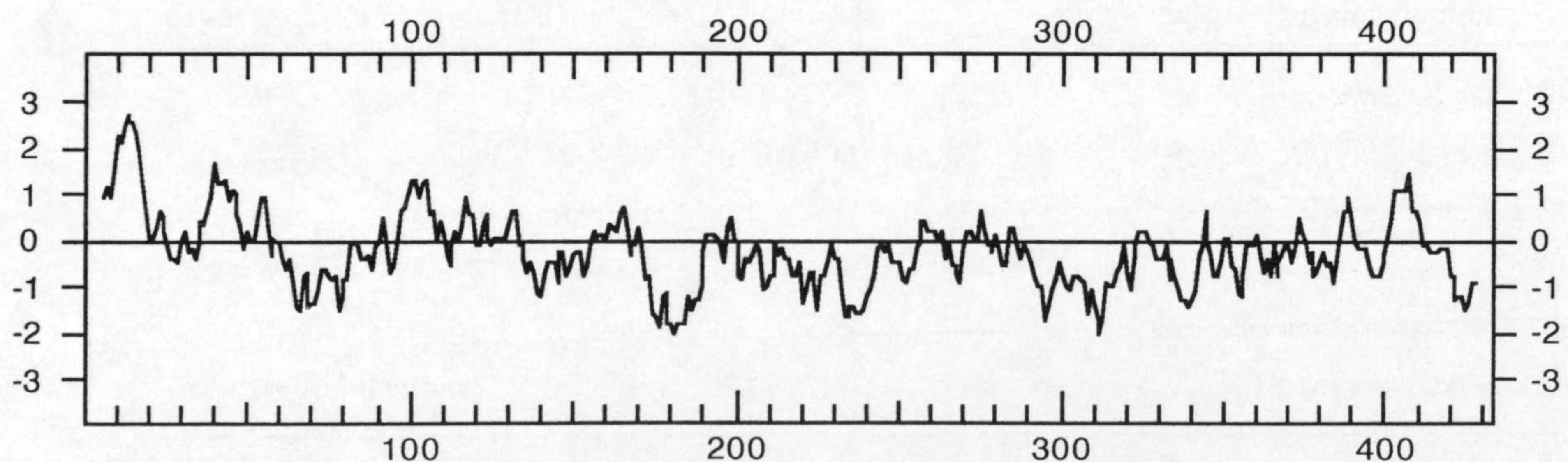


FIGURA 48. Perfil de hidropatía de la proteína TolB de *P. putida*. El perfil de hidrofobicidad de TolB se generó siguiendo el método de Kyte y Doolittle (1982). En el eje horizontal se indica la posición de los restos de aminoácidos. En el eje vertical se indica la hidrofobicidad relativa. Los valores positivos indican hidrofobicidad y los negativos hidrofilicidad.

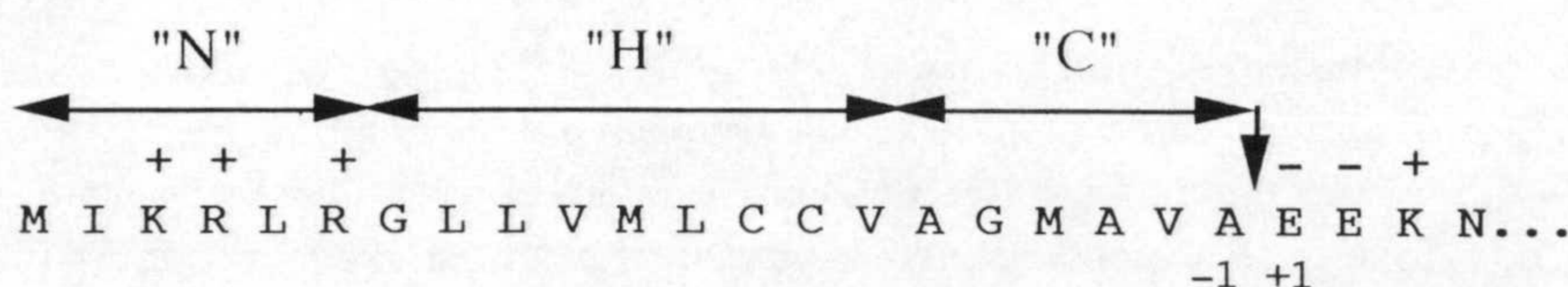


FIGURA 49. Estructura primaria de la región amino terminal de TolB y del supuesto péptido señal. La nomenclatura y los símbolos usados en esta figura son los mismos que los de la Fig. 25 y se explican en la leyenda de dicha figura. En el péptido señal predicho para TolB se observa claramente el dominio "N" con carga neta positiva y el dominio "H" hidrofóbico. El dominio "C" se ajusta muy bien a las características del péptido señal estándar.

El resultado de la comparación de la secuencia de aminoácidos codificada por *tolB* de *P. putida* con las secuencias de las distintas bases de datos (diciembre, 1998) se muestra en la Tabla 6. De los 6 genes *tolB* secuenciados hasta el momento (dos de ellos sólo parcialmente) todos, excepto *tolB* de *R. prowazekii*, se encuentran corriente arriba de su correspondiente gen *pal/oprL*. En *P. putida*, los genes *oprL* y *tolB* están separados por 54 pb (Fig. 47). En *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *H. influenzae*, estos genes están separados por 52, 34, 26 y 23 pb, respectivamente. Los genes de *P. putida* y *P. aeruginosa* poseen GUG como codón iniciador en lugar de AUG. En la Figura 50 se muestra un alineamiento múltiple de TolB con parte de las

Tabla 6. Proteínas con las que TolB de *P. putida* presenta similitud†

Nombre de la proteína y microorganismo de origen	aa ^a	% identidad (solapamiento) ^b	Nº acceso en GenBank o en Swiss-Prot / Referencia
TolB' <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(112)	68,6 (109)	P50601 / Dennis <i>et al.</i> (1996)
TolB <i>Haemophilus influenzae</i>	427	43,6 (438)	P44677 / Sen <i>et al.</i> (1996)
TolB <i>Escherichia coli</i>	430	43,4 (429)	P19935 / Levengood y Webster (1989)
TolB <i>Rickettsia prowazekii</i>	443	29,9 (448)	E1342607 / Andersson <i>et al.</i> (1998)
TolB <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	(84)	49,3 (69)	Q44156 / Frey <i>et al.</i> (1996)
TolB <i>Helicobacter pylori</i>	417	19,7 (432)	O25751 / Tomb <i>et al.</i> (1997)

^a Número de aminoácidos de la proteína. Los números entre paréntesis indican que la secuencia disponible en la base de datos está incompleta.

^b Se indica el porcentaje de residuos idénticos encontrados en el fragmento de solapamiento. En el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento (indicado entre paréntesis) se incluyen los "huecos" que introduce el programa de búsqueda de similitudes para optimizar el alineamiento.

† El análisis comparativo se realizó en diciembre de 1998.

	10	20	30	40	50
TolB <i>P. putida</i>	...MIKRLRGLLVMLCCVAGMAVAEKNILVTEGSDRATPIAVVPPFGL..				
TolB <i>P. aeruginosa</i>	...MSTLIRIALFADALMAGAAQADP.LVISSGNDRAIPIAVVPPFGF..				
TolB <i>H. influenzae</i>	MKLLKRLVSVFAIVLAVGSNAFAGDEVRIVIDEGVDGARPIAVVPPFV...				
TolB <i>E. coli</i>	MKQALRVAFGFLILWASVLHA...EVRIVEDSGVDSGRPIGVVPPFQW..				
TolB <i>R. prowazekii</i>	...VRNIVYFILTLFSLTSYA...LETINIEHGRVDPTPIAVNKNFNADS				
Consenso	-----L--LA----A-----E--IVI-SG-D-A-PIAVVPPF----				
	60	70	80	90	100
TolB <i>P. putida</i>	QGGSVLPEDIADIIGNDLRNSGYYSPIPRQNMIS.QPSQASEVIFRDWKA				
TolB <i>P. aeruginosa</i>	QGGNVLPEDMSNIIGNDLRNSGYEPLPRQNMIS.QPAQASEVIFRDWKA				
TolB <i>H. influenzae</i>	...GSAPEDISKIVADDLRNSGKFNPIAVSQMPQ.RPTSAAEVNPEAWSN				
TolB <i>E. coli</i>	AGPGAAPEDIGGIVAADLRNSGKFNPLDRARLPQ.QPGSAQEVQPAAWSA				
TolB <i>R. prowazekii</i>	SNNDLVGRDVVKVISNDLKISGLFRPISSASFIEEQTGIKYKPLFAAWRQ				
Consenso	-G----PEDI--II-NDLRNSG-F-PI-R--MI--QP--A-EV-F-AW-A				
	110	120	130	140	150
TolB <i>P. putida</i>	LGAQYVMVGSIVPSGGR.....LQVQYALFNVATEQQVLTGSAVAGSTDQ				
TolB <i>P. aeruginosa</i>	VGVNYVMVGNIVPAGGR.....LQ.....				
TolB <i>H. influenzae</i>	IGIDAIVIGQVVPNG.YSITYQLIDTVGASGTPGTVLMQNSYTVTNKW				
TolB <i>E. coli</i>	LGIDAVVVGVQVTPNPDGSSYNVAYQLVDTGGA...PGTVLAQNSYKVNKQW				
TolB <i>R. prowazekii</i>	INASLLVNGEVKTLENG.....KLIKISFILWDTFLEKQLTGALFEVPTKL				
Consenso	-G---VVVG-VVP-G-G-----L-----L---S--V----				
	160	170	180	190	200
TolB <i>P. putida</i>	LRDMAHYIADQSFELTGEIKGAFSTRMLYVTAERFSTNNTRYTLQRSYD				
TolB <i>P. aeruginosa</i>				
TolB <i>H. influenzae</i>	LRYGAHTVSDEVFEKLTAIRGAFRTRIAVYV..QKNGGSQPYEVRVADYD				
TolB <i>E. coli</i>	LRYAGHTASDEVFEKLTGEIKGAFRTRIAVYV..QTNGGQFPYELRVSDYD				
TolB <i>R. prowazekii</i>	WRAAHKIADKIYEKITGDPGYFDTKIVYVS..ESTVLPKIKRIALMDYD				
Consenso	LR--AH---D--FEKLTGI-GAF-TRI-YV-----Y-----DYD				
	210	220	230	240	250
TolB <i>P. putida</i>	GARAVTLLQSREPILSPRFAPDQKRIAYVVSPEQKRPRIFVQ.NIDTGRRE				
TolB <i>P. aeruginosa</i>				
TolB <i>H. influenzae</i>	GYNQFIVNRSAPIMSPAWSPDGQRLAYVVSFENKKSQLVVQ.DLNSGARK				
TolB <i>E. coli</i>	GYNQFVVHRSPQPLMSPAWSPDGSKLAYVTFESGRSALVIQ.TLANGAVR				
TolB <i>R. prowazekii</i>	GANNKYLTNGKSLVLTFRFAHSADKIFVVSATKSRALVYEKDLKTGKES				
Consenso	G-N-----S--P--SP---PDG---AYVSFE-K---LV-Q--L--G---				
	260	270	280	290	300
TolB <i>P. putida</i>	QVTNFECLNGAPAWSPDGSRLAFVLSKDGNDIYVMNVASRQISRVTAGP				
TolB <i>P. aeruginosa</i>				
TolB <i>H. influenzae</i>	VVASFQGHNGAPAFSPDGSRLAFASSRDGVLNIYVMGANGGTPTQLTSGA				
TolB <i>E. coli</i>	QVASFPRHNGAPAFSPDGSRLAFALSKTGSLNLYVMDLASGQIRQVTDGR				
TolB <i>R. prowazekii</i>	VVGDFVGISFAPRSPDGGKAVMSIAKNGSTHIYEIDLATKQLNKLNGF				
Consenso	-V--F-G-NGAPAFSPDGS-LAF--SK-G---IYVM--A--Q----T-G-				
	310	320	330	340	350
TolB <i>P. putida</i>	GINTEPFWKGKNTLYFTSDRGGKPKIYKQSVSGGAERVTFVGNYNANP				
TolB <i>P. aeruginosa</i>				
TolB <i>H. influenzae</i>	GNNTEPAWSPDGSNLSIFTSRSGSPQVYRMDASGGSATAVGGRS....A				
TolB <i>E. coli</i>	SNNTPEPTWFPDSQNLAFSDQAGRPOVYKVNINGGAPQRITWEGSQNQDA				
TolB <i>R. prowazekii</i>	GINTSPSYSPDCKKIVFNSDKNGVPQLYIMNSDGSVDQRIISFGVGSYASP				
Consenso	G-NTEP-W-PDG-----FTSD--G-PQ-Y-----GG---R-----G-----				
	360	370	380	390	400
TolB <i>P. putida</i>	KLSADEKTLVMIHR.....QQGFTNFKVAAQDLQRGSVKILSETSLDES				
TolB <i>P. aeruginosa</i>S				
TolB <i>H. influenzae</i>	QISADGKTLVMIN.....GNNNVVKQDLTTGVSEVLSTSFLLGES				
TolB <i>E. coli</i>	DVSSDGKFMVMVSS.....NG..GQQHIAKQDLATGGVQVLSSTFLDET				
TolB <i>R. prowazekii</i>	SWSPRGDYIAFTKIIRQDGEKTFNIGIMKAYPQDHGNSERIITSGYLVD				
Consenso	--S-DGK--VM-----A-QDL--G----LS---L-ES				
	410	420	430	440	450
TolB <i>P. putida</i>	PTVAPNGTMLIY.....ATRQQGRGVMLVSLNGRVRLPLPTAQCEVREP				
TolB <i>P. aeruginosa</i>	PSVAPNGTMLIR.....HPPAGPG.VLMLVSSSTDAYGYLSPTAQGDVREP				
TolB <i>H. influenzae</i>	PSLSPNGIMIIY.....SSTQGLKVLQVLSADGRFKASLPGSDGQVKFP				
TolB <i>E. coli</i>	PSLAPNGTMIY.....SSSQGMSVLNLVSTDGFRFKARLPATDQVKFP				
TolB <i>R. prowazekii</i>	PCWSPNGRVIMFSGKWPSEKANAPGKNKIFTIDLTGHNEREITPADASDP				
Consenso	PS-APNGTM-IY-----S--QG-G-VL-LVS--GR----LP---G-V--P				
TolB <i>P. putida</i>	SWSPYLN.				
TolB <i>P. aeruginosa</i>	SWSPYLN.				
TolB <i>H. influenzae</i>	AWSPYLTK				
TolB <i>E. coli</i>	AWSPYL..				
TolB <i>R. prowazekii</i>	EWSGILN.				
Consenso	-WSPYLN-				

(Ver leyenda en la página siguiente)

FIGURA 50. Alineamiento múltiple de TolB de *P. putida* con proteínas TolB de otros microorganismos. El alineamiento y la secuencia consenso se generaron como se indicó en la Fig. 31. Para que un aminoácido forme parte de la secuencia consenso debe estar presente en al menos 3 de las 5 secuencias alineadas. Dichos aminoácidos se indican en color azul claro. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se señalan en color rojo (para este cálculo no se ha considerado la región interna aún sin secuenciar de la proteína TolB de *P. aeruginosa*). El número de acceso a la base de datos y la referencia para cada secuencia, se indican en la Tabla 6.

proteínas listadas en la tabla anterior, en el cual se puede observar como TolB de *R. prowazekii* se encuentra alejada desde un punto de vista evolutivo de las cuatro proteínas restantes. Se sabe que la proteína TolB de *E. coli*, una vez procesada, se localiza en el periplasma (Isnard *et al.*, 1994). Los datos obtenidos sobre TolB de *P. putida*, y la similitud existente a nivel de estructura primaria con TolB de *E. coli*, sugieren que TolB de *P. putida* también es una proteína periplásmica, aunque en este trabajo no se aportan evidencias experimentales al respecto.

Corriente arriba de *tolB* se localizó otra probable región codificante, entre los nucleótidos 1.794 y 2.912 (Fig. 47) que codificaría un polipéptido de 372 aminoácidos con un peso molecular estimado de 40.108 Da. Dicho polipéptido poseía como aminoácidos mayoritarios, alanina (23,4%), lisina (15,9%) y ácido glutámico (11,3%) que sumados representaban el 50,6% del total. Estos aminoácidos son particularmente abundantes en la región central de la proteína, encontrándose entre las posiciones 161 y 237 hasta 10 repeticiones de 3 lisinas separadas entre sí por la secuencia consenso AAE(E/D)A (Fig. 51A). La alternancia de cargas positivas (fundamentalmente lisinas) y negativas (ácidos aspártico y glutámico) en la región central del polipéptido se aprecia claramente en la Fig. 51B. El perfil de hidrofobicidad del polipéptido, predecía un segmento amino terminal hidrofóbico, siendo el resto de la proteína hidrofílica (Fig. 52). En dicho extremo y coincidiendo con este segmento, el programa TMpred (ver sección *Materiales y Métodos*) predijo la existencia de un segmento transmembrana con estructura de hélice α , que abarcaría desde el aminoácido 17 al 36 (Fig. 52 y 53).

A

(160-167)	AKKK-AEDE
(168-175)	AKKK-AEEE
(176-183)	AKKA-AAEE
(184-191)	AKKK-AAED
(192-199)	AKKK-AAEE
(200-207)	AKKK-AAED
(208-216)	AKKKAAAED
(217-224)	AKKK-AAEE
(225-233)	AKKKAAADA
(234-240)	QKKK-AQE-

Consenso	AKKK-AAEE
Cargas	0+++ 00--

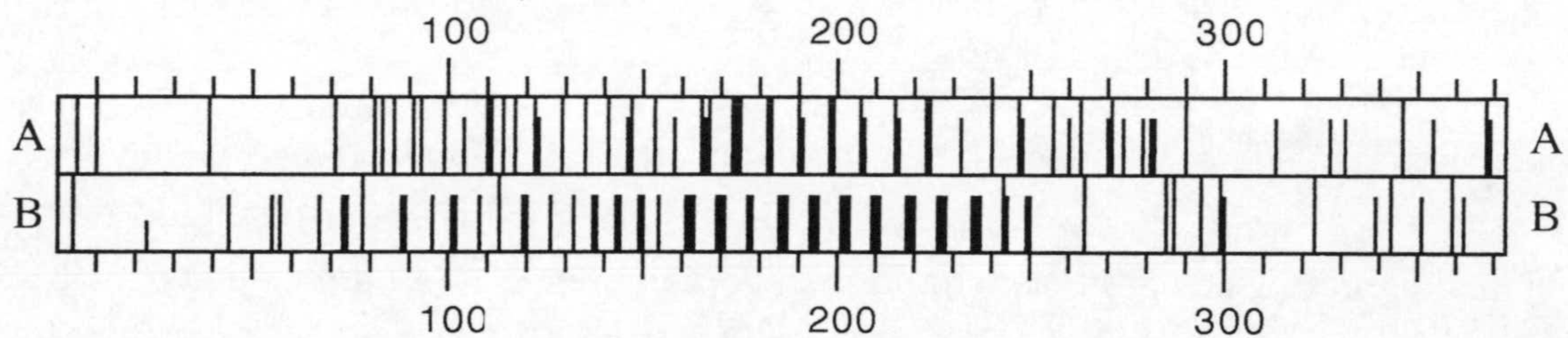
B

FIGURA 51. Secuencia consenso que se repite en la región central de la proteína TolA de *P. putida*, y esquema de la distribución de cargas en dicha proteína. (A) Alineamiento de las repeticiones de aminoácidos localizados entre los residuos 160 y 240. La posición de cada uno de los segmentos alineados se indica entre paréntesis a la derecha de la figura. En color azul se indican los aminoácidos presentes en al menos 6 de las 10 secuencias y en color rojo se indican aquellos conservados en todas las posiciones. Bajo la secuencia consenso se indica la carga eléctrica de los aminoácidos de dicha secuencia. Significado de los símbolos: +, aminoácido con carga neta positiva; -, aminoácido con carga neta negativa; 0, aminoácido sin carga. (B) Distribución de los aminoácidos cargados a lo largo de la estructura primaria de la proteína TolA de *P. putida*. (A) Aminoácidos con carga neta negativa a pH fisiológico. La línea vertical más larga representa al ácido glutámico y la corta al ácido aspártico. (B) Aminoácidos con carga neta positiva a pH fisiológico. La línea vertical más larga representa a la arginina y la corta a la lisina. En el eje horizontal se indica la posición de los restos de aminoácidos.

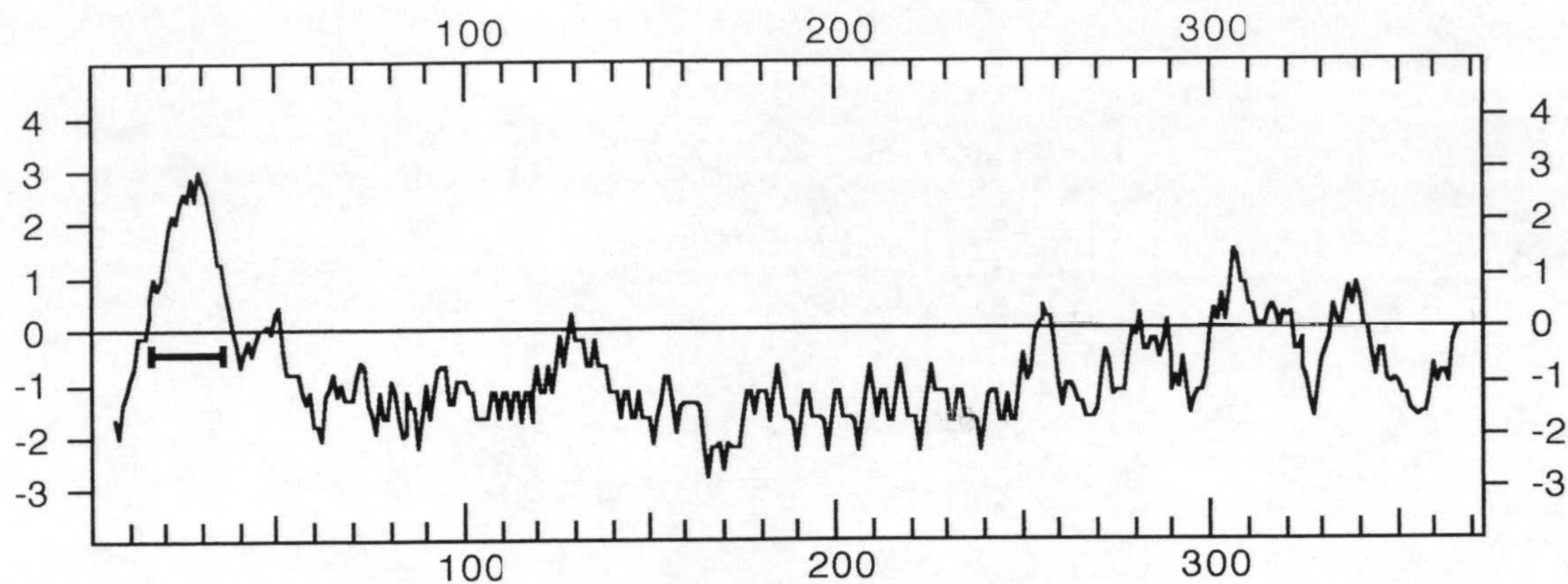


FIGURA 52. Perfil de hidropatía de la proteína TolA de *P. putida*. El perfil de hidrofobicidad de TolA se generó siguiendo el método de Kyte y Doolittle (1982). En el eje horizontal se indica la posición de los restos de aminoácidos. En el eje vertical se indica la hidrofobicidad relativa. Los valores positivos indican hidrofobicidad y los negativos hidrofiliicidad. La barra horizontal indica la localización del segmento transmembrana predicho por el programa TMpred.

La comparación de la secuencia de aminoácidos codificada por esta región con las secuencias de las distintas bases de datos (Diciembre, 1998) dió como resultado dos grupos bien diferenciados de proteínas similares al polipéptido de *P. putida* (Tabla 7). En el primer grupo se encontraban las proteínas TolA de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *H. influenzae*, cuyos genes también se localizan en estos microorganismos adyacentes al gen *tolB*. Concretamente, en *E. coli* y *H. influenzae* estos genes se hayan separados por 129 y 41 pb, respectivamente, y su codón iniciador es AUG. En el caso de *P. aeruginosa* y *P. putida* (ver Fig. 47), las regiones codificantes solapan en 4 pb y ambas comienzan por GUG. Dentro de este primer grupo, la zona de similitud comprende prácticamente toda la secuencia de aminoácidos. En el segundo conjunto de proteínas, se agrupan aquellas que sólo presentan similitud con la región central de la proteína de *P. putida* (aproximadamente desde el aminoácido 40 al 290). La mayoría de las proteínas de este grupo pertenecen a organismos eucarióticos, y el porcentaje de identidad es del 35-40%. Muchas de ellas son histonas, o proteínas que se encuentran en el esperma (como Dhms101[1] de *Drosophila hydei*, una proteína que se expresa específicamente en el tejido testicular de dicho organismo y que parece ser importante para mantener la integridad del "sperm-tail"). En la Tabla 7 se muestran sólo algunas proteínas de este grupo. Se ha demostrado que el dominio central de la proteína TolA de *E. coli* (aminoácidos 48-310) es periplásmico y que en su mayor parte se estructura en forma de hélice α (Levengood *et al.*, 1991). Esto implicaría que las proteínas del segundo grupo de similitud compartirían un dominio en hélice α de gran longitud, relativamente conservado durante la evolución, y cuya función se desconoce, aunque se sospecha que podría ser

meramente estructural. Por otro lado, se sabe que la proteína TolA en *E. coli* posee un dominio transmembrana amino terminal por el cual se ancla a la membrana interna, siendo el resto de la proteína periplásmica (Levengood *et al.*, 1991). El conjunto de datos presentado sugiere que la proteína TolA de *P. putida* podría presentar una topología similar. La Figura 53 muestra un alineamiento múltiple de TolA de *P. putida* con las proteínas del primer grupo de similitud. La región amino terminal conservada (posiciones 22-33) se localiza dentro del segmento transmembrana.

Tabla 7. Proteínas con las que TolA de *P. putida* presenta similitud[†]

Nombre de la proteína y microorganismo de origen	aa ^a	% identidad (solapamiento) ^b	Nº acceso en GenBank o en Swiss-Prot / Referencia ^c
TolA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	346	68,4 (374)	P50600 / Dennis <i>et al.</i> (1996)
TolA <i>Escherichia coli</i>	421	37,8 (357)	P19934 / Levengood y Webster (1989)
TolA <i>Haemophilus influenzae</i>	372	31,5 (317)	P44678 / Sen <i>et al.</i> (1996)
Dhmst101(1) <i>Drosophila hydei</i>	344	42,7 (248)	Q08695 / Neesen <i>et al.</i> (1994)
Tp0470 <i>Treponema pallidum</i>	369	36,7 (237)	O83483 / Fraser <i>et al.</i> (1998)
Ydf3 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1403	34,3 (265)	Q10475 / Murphy <i>et al.</i> Sin pub.

^a Número de aminoácidos de la proteína.

^b Se indica el porcentaje de residuos idénticos encontrados en el fragmento de solapamiento. En el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento (indicado entre paréntesis) se incluyen los "huecos" que introduce el programa de búsqueda de similitudes para optimizar el alineamiento.

^c "Sin pub." indica que dicha secuencia se encuentra depositada en la base de datos pero que no existe ningún artículo publicado sobre ella hasta la fecha del análisis.

[†] El análisis comparativo se realizó en diciembre de 1998.

La siguiente fase de lectura abierta, corriente arriba de *tolA*, se localizó entre los nucleótidos 1.342 y 1.794 (Fig. 47), y codificaría un polipéptido de 150 aminoácidos con un peso molecular estimado de 16.236 Da. Dicho polipéptido era rico en valina (12,7%) y alanina (10,0%) y poseía un 21,3% de aminoácidos cargados (D, E, K y R). Según el perfil de hidrofobicidad de dicho polipéptido, cerca del extremo amino terminal existiría un segmento hidrofóbico, mientras que el resto de la proteína sería hidrofílico (Fig. 54). Además, en dicha región hidrofóbica el programa TMpred (ver sección *Materiales y Métodos*) predijo la existencia de una hélice α transmembrana (aminoácidos 22 al 38) (Fig. 54 y 55).

	10	20	30	40	50
Tola <i>P. putida</i>	MQQREPSASESYFWPSVWAIGLHVLFVALLFVFSFAMTPELPPSKPIV.QA				
Tola <i>P. aeruginosa</i>	MQQFERSPSESYFWPVVLAIVLHVLIIFAMLFVSWAFAPLPPSKPIV.QA				
Tola <i>E. coli</i>	.MSKATEQNDKLRKRAIIISAVLVHILFAALIWSSFDENIEASAGGGG.GS				
Tola <i>H. influenzae</i>	...MQNNRQKKGINAFSAISILLHFILFGLLILSSLYHTVEIMGGEGEGD				
Consenso	-----LHV--FA-L--S-----				
	60	70	80	90	100
Tola <i>P. putida</i>	TLYQLKSKSQATTQTNQKIAGEAKKTASRQTEVEQLEQKKVEQEA VKAAE				
Tola <i>P. aeruginosa</i>	TLYQLKSKSQATTQTNQKIAGEAKKTASKQYEVEQLEQKKLEQQKL...E				
Tola <i>E. coli</i>	SIDAVMVD SGAVVEQYKRMQSQESSAKRSDEQRKMKEQQAEEELREKQAA				
Tola <i>H. influenzae</i>	VIGAVIVDTGTAAQEWGRIQQQKKGQADKQKRPSPVVEEKPPPEPNQ....				
Consenso	-----S-A--Q---I---K--A--Q---E--EQ-K-E-----				
	110	120	130	140	150
Tola <i>P. putida</i>	QKKADAAQKAEAREAAEAKKAEDA AKAAEAAKAAEAKKADEAK				
Tola <i>P. aeruginosa</i>	QQKLEQQQVA..AAKAAEQKKADEARKA.EAQKAAEAKKADEAKKAAEAK				
Tola <i>E. coli</i>	EQERLQLEKERLAAQEQKQAEAAAKQAE LKQKQAEAAAKAAADAKAK				
Tola <i>H. influenzae</i>	E.EIKHQEQEV...QRQEE LKQEQEQQRQEQEIKKQEQEQARQEALEKQKQAE				
Consenso	-----QQ-----E-K-A-EA-K--E--K--E---A--A-K---AK				
	160	170	180	190	200
Tola <i>P. putida</i>	KAAEQKQADI AKKKAEDAKKKAEEEEAKKAAEEAKKKAEDAKKKAEE				
Tola <i>P. aeruginosa</i>	AAEQKQADI AKKRAEDEAKK.....KAAEDAKKKAED				
Tola <i>E. coli</i>	AEADAKAAEEAAKKAADAKKKAEEAAKAAAEAKKAEAAAAALKKAE				
Tola <i>H. influenzae</i>	EAKAKQAAEAAK LKADA EAKR.....LAAA AKQAE EEE				
Consenso	-A--K--A--AKKA--EAKK-----A--A-KA-EE				
	210	220	230	240	250
Tola <i>P. putida</i>	AKKKAEDAKKKA AEDAKKKAEEAKKKAADAQKKAQEAARKAAEDK				
Tola <i>P. aeruginosa</i>	AKKKAEEAKKKA AEEAAKKA AVEAAKKA...A...AAAAARKAAEDK				
Tola <i>E. coli</i>	AAEAAAAEARKKAATEAAEKAKAEAEKAAA EKAADKKA AAEKAAADK				
Tola <i>H. influenzae</i>	AKAKAAEIAAQKAKQEAFAKAKLEAEAKAKAV.....AEAKA KAEAEA				
Consenso	AK-KAAE-A-KKAA-EAA-K--AE---K--A-----A-A--KAA--K				
	260	270	280	290	300
Tola <i>P. putida</i>	KAQALAE LLSDTTTERQQALADEQGDQVAGDFDDLIRMRAAEGWARPPSAR				
Tola <i>P. aeruginosa</i>	KARALAE LLSDTTTERQQALADEVGEVGTGSLDDLIVNLVVSQQWRRPPSAR				
Tola <i>E. coli</i>	AAEKAAA EKAADKKA AAEKAAADKKA AAKAAA EKA AAEADDIF				
Tola <i>H. influenzae</i>	KAKAAAEAKAKADAEAKAATEAKRKADQASLDDFLNGGDI.....				
Consenso	KA-A-AE-----A-----DD-----				
	310	320	330	340	350
Tola <i>P. putida</i>	KGMTVV LQINMLPDGTTITNVSVARSSGDPYDSSAVA AVKN....IGRLT				
Tola <i>P. aeruginosa</i>	NGMSVEVLIEMLPDGTITNASVSRSSGDKPFDSSAVA AVRN....VGRIP				
Tola <i>E. coli</i>	GELSSGKNAPKTGGGAKGNNASPAGSGNTKNNGASGADINNYAGQIKSAI				
Tola <i>H. influenzae</i>	GGGSASKGNTNKGGTQGS GA.ALGSGDGGKVG DQYAGVIK.....KEI				
Consenso	-G-S-----GT--N-----SGD-----A-V-N-----				
	360	370	380	390	400
Tola <i>P. putida</i>	EMQGMKPSDFNQ.YRSFKMTFTPEDLAL.....				
Tola <i>P. aeruginosa</i>	EMQQLPRATFDSL YRQRRIIFKPEDLSL.....				
Tola <i>E. coli</i>	ESKFYDASSYAGKTCTLR IKLAPDGMLLDIKPEGGDPALCQAALAA.AKL				
Tola <i>H. influenzae</i>	QRRFLKDPNFAGKVCRIKIQLGRDGTILGYQKISGSDDICSAALSAVART				
Consenso	E-----F-----I---P---L-----				
	410	420			
Tola <i>P. putida</i>				
Tola <i>P. aeruginosa</i>				
Tola <i>E. coli</i>	AKIPKPPSQAVYEVFKNAPLDFKP.				
Tola <i>H. influenzae</i>	KKVPAAPSDEIYEKYKSPIIDFDIR				
Consenso	-----				

FIGURA 53. Alineamiento múltiple de TolA de *P. putida* con proteínas TolA de otros microorganismos. El alineamiento y la secuencia consenso se generaron como se indicó en la Fig. 31. Para que un aminoácido forme parte de la secuencia consenso debe estar presente en al menos 3 de las 4 secuencias alineadas. Dichos aminoácidos se indican en color azul claro. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se señalan en color rojo. El número de acceso a la base de datos y la referencia para cada secuencia se indican en la Tabla 7. La línea de color azul oscuro sobre la secuencia de TolA de *P. putida*, indica la posición del segmento transmembrana propuesto por el programa TMpred.

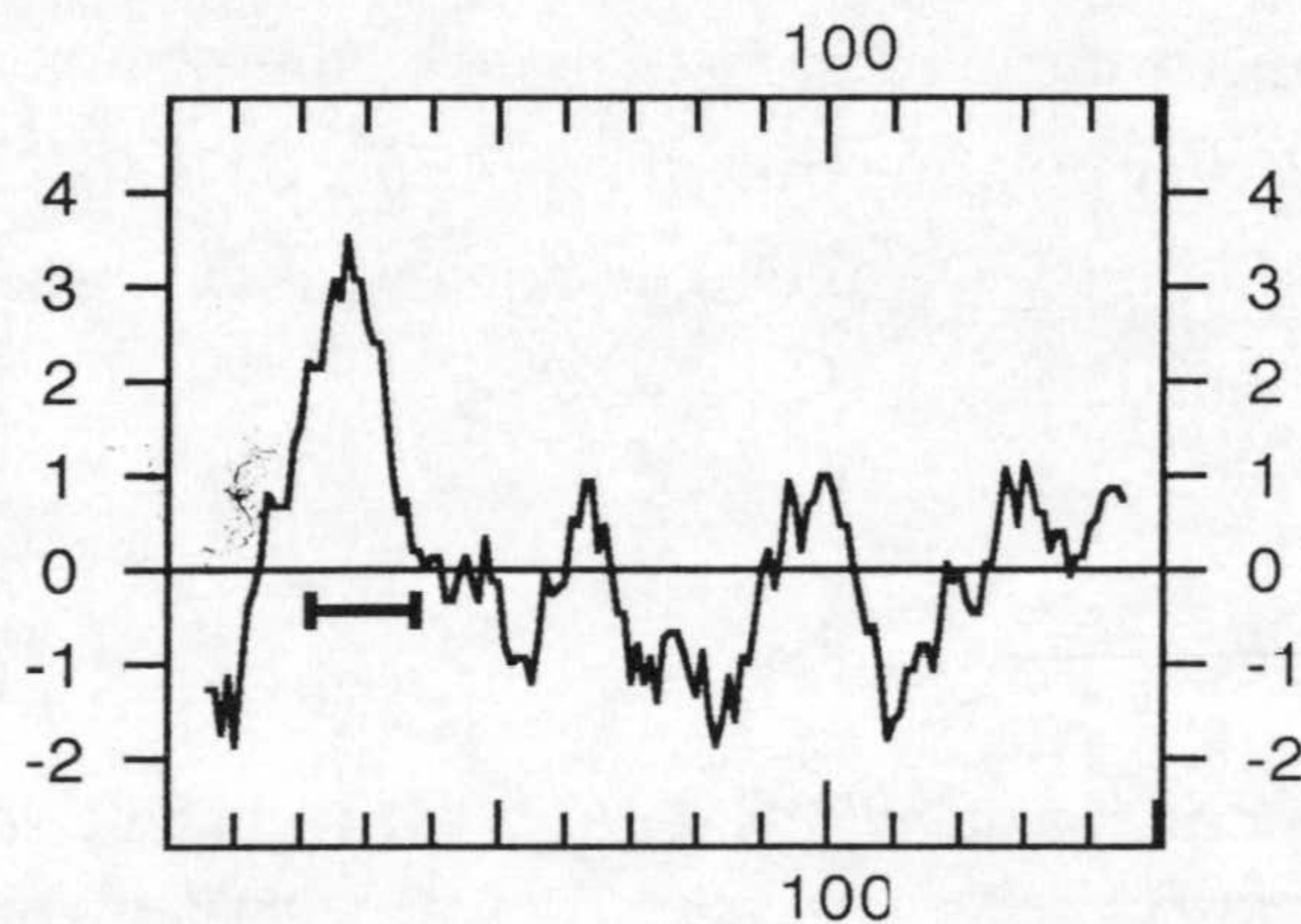


FIGURA 54. Perfil de hidropatía de la proteína TolR de *P. putida*. El perfil de hidrofobicidad de TolR se generó siguiendo el método de Kyte y Doolittle (1982). En el eje horizontal se indica la posición de los restos de aminoácidos. En el eje vertical se indica la hidrofobicidad relativa. Los valores positivos indican hidrofobicidad y los negativos hidrofilicidad. La barra horizontal indica la localización del segmento transmembrana predicho por el programa TMpred.

El resultado de la comparación de la secuencia de aminoácidos de este polipéptido con las secuencias de las distintas bases de datos (Diciembre, 1998) se muestra en la Tabla 8. La secuencia en cuestión presentó similitud por una parte con las proteínas TolR de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *H. influenzae* y *R. prowazekii*, y por otra con las proteínas ExbD de *P. putida*, *E. coli* y otros microorganismos (en la tabla sólo se indican las proteínas ExbD que mostraron mayor grado de similitud). Hace tiempo que se observó esta similitud entre las proteínas TolR y ExbD (Eick-Helmerich y Braun, 1989) que, de hecho, se agrupan en una misma familia de proteínas. Por otra parte, todos los genes *tolR* secuenciados hasta el momento, excepto *tolR* de *R. prowazekii*, se encuentran corriente arriba de su correspondiente gen *tolA*. En *P. putida*, los genes *tolR* y *tolA* solapan 1 pb

(Fig. 46), mientras que en *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y *E. coli*, están separados por 7, 15 y 64 pb, respectivamente. La topología de la proteína TolR de *E. coli* se conoce bastante bien, y se sabe que esta proteína se ancla a la membrana interna por un segmento transmembrana amino terminal y que la parte carboxilo restante se encuentra en el periplasma (Muller *et al.*, 1993). Tanto la similitud a nivel de estructura primaria como las predicciones de estructura secundaria, apoyan una topología similar para TolR de *P. putida*. En la Figura 55 se muestra un alineamiento múltiple de la proteína TolR de *P. putida* con las proteínas TolR secuenciadas hasta la fecha. La región amino terminal donde se encuentra el segmento transmembrana es la más conservada (posiciones 21-41). En la Figura 56 se puede observar un alineamiento múltiple de TolR de *P. putida* con las proteínas ExbD listadas en la Tabla 8. De nuevo, la zona de mayor similitud coincide con la región anteriormente mencionada.

Tabla 8. Proteínas con las que TolR de *P. putida* presenta similitud†

Nombre de la proteína y microorganismo de origen	aa ^a	% identidad (solapamiento) ^b	Nº acceso en GenBank o en Swiss-Prot / Referencia ^c
TolR <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	146	82 (150)	P50599 / Dennis <i>et al.</i> (1996)
TolR <i>Rickettsia prowazekii</i>	143	36,8 (144)	E1342615 / Andersson <i>et al.</i> (1998)
TolR <i>Escherichia coli</i>	142	34,5 (148)	P05829 / Sun y Webster (1987)
TolR <i>Haemophilus influenzae</i>	139	33,1 (148)	P43769 / Sen <i>et al.</i> (1996)
ExbD <i>Pseudomonas putida</i>	142	43,3 (134)	Q05606 / Bitter <i>et al.</i> (1993)
ExbD <i>Escherichia coli</i>	141	39,7 (136)	P18784 / Eick-Helmreich y Braun (1989)
ExbD <i>Bordetella bronchiseptica</i>	155	33,3 (141)	G3916255 / Nicholson y Beall. Sin pub.
ExbD <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	144	32,9 (140)	O06434 / Biswas <i>et al.</i> (1997)

^a Número de aminoácidos de la proteína.

^b Se indica el porcentaje de residuos idénticos encontrados en el fragmento de solapamiento. En el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento (indicado entre paréntesis) se incluyen los "huecos" que introduce el programa de búsqueda de similitudes para optimizar el alineamiento.

^c "Sin pub." indica que dicha secuencia se encuentra depositada en la base de datos pero que no existe ningún artículo publicado sobre ella hasta la fecha del análisis.

† El análisis comparativo se realizó en diciembre de 1998.

	10	20	30	40	50
TolR <i>P. putida</i>	MARV.....	RHKRPVAEMNVV	PYIDVMLVLLVIFMVTAPML	NOGVKVD	
TolR <i>P. aeruginosa</i>	MARV.....	RHKRPVAEMNVV	PYIDVMLVLLVIFMVTAPML	NOGVKVD	
TolR <i>H. influenzae</i>	MAR.....	RQRKAIKSEINIVPFLD	VLLVLLVLIIFMATAPIIS	QSVQVE	
TolR <i>E. coli</i>	MARARG....	RGRDLKSEINIVPLLD	VLLVLLVLIIFMATAPIIT	QSVQVE	
TolR <i>R. prowazekii</i>	MAIMFTGSNRKSKKAV	VSDINVTPLVDVMLVLL	LIIFMVTSPML	VSGVNVD	
Consenso	MAR-----	R-KR--VSEINVVP--	DVMLVLL-IFMVTAPML-	QGV-V	
	60	70	80	90	100
TolR <i>P. putida</i>	LPK.VSSEALPQDNNVQIL	TISIKADKTYWNLGSEV	DTDKQMDKAMTLP		
TolR <i>P. aeruginosa</i>	LPK.VSSEALPQDNNKQV	LTLSVKADGSYYWNVGSEV	DTEKQTDSAVSLE		
TolR <i>H. influenzae</i>	LPDSVQSQEVSNEDEKVP	VI...LEVAGIGKY..AISIGGERQ..	EGLTEE		
TolR <i>E. coli</i>	LPDATESQAVSSNDNPPVI	...VEVSGIGQY..TVVVEKDRL..	ERLPPE		
TolR <i>R. prowazekii</i>	LPE.TNPSTILEQDEPLVIT	..INNECKIFL...LETLIERT.....	H		
Consenso	LP--V-S-A----	DN--VIT-----G-----	EV--ERQ-----E		
	110	120	130	140	150
TolR <i>P. putida</i>	AMTDAVTKIIAAGRDQ	GKQTQVFIRGDKAVDYGAV	MGAMGGLQKAGVGNV		
TolR <i>P. aeruginosa</i>	QMEDAVTKIMSARPD....	TQVFIRGDKAVNYGAVVGAMGAL	QQAGVPNV		
TolR <i>H. influenzae</i>	MVTQLSRQEFDKDNN....	TLFLVGGAKEVPYEEVIKALNLL	LHLAGIKSV		
TolR <i>E. coli</i>	QVVAEVSSRFKANPK....	TVFLIGGAKDVPYDEIIKALNLL	LHLAGIKSV		
TolR <i>R. prowazekii</i>	.LTDKIINITTGNKN....	ARIFVRGDKNVSYGKVVVEVIAEIH	SAGFYRV		
Consenso	--TD-V--I--A-----	T--FIRGDK-V-YG-V--A---	LH-AGV--V		
	160				
TolR <i>P. putida</i>	GLITEAP....				
TolR <i>P. aeruginosa</i>	GLITEAP....				
TolR <i>H. influenzae</i>	GLMINPI....				
TolR <i>E. coli</i>	GLMTQPI....				
TolR <i>R. prowazekii</i>	ALISNIKNEK				
Consenso	GLIT-----				

FIGURA 55. Alineamiento múltiple de TolR de *P. putida* con proteínas TolR de otros microorganismos. El alineamiento y la secuencia consenso se generaron como se indicó en la Fig. 31. Para que un aminoácido forme parte de la secuencia consenso debe estar presente en al menos 3 de las 5 secuencias alineadas. Dichos aminoácidos se indican en color azul claro. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se señalan en color rojo. El número de acceso a la base de datos y la referencia para cada secuencia, se indican en la Tabla 8. La línea de color azul oscuro sobre la secuencia de TolR de *P. putida*, indica la posición del segmento transmembrana propuesto por el programa TMpred.

Corriente arriba de *tolR* se localizó otra fase de lectura abierta, entre los nucleótidos 632 y 1.327 (Fig. 47) que codificaría un polipéptido de 231 aminoácidos con un peso molecular estimado de 25.294 Da. En lo referente a la composición de aminoácidos, la alanina era el aminoácido más abundante (13%) y los aminoácidos cargados (D, E, K y R) sumaban el 19,1% del total. En el perfil de hidrofobicidad se observó un segmento hidrofóbico amino terminal seguido de una región hidrofílica de aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, apareciendo luego otras dos regiones hidrofóbicas y finalmente una zona carboxilo terminal más hidrofílica (Fig. 57). El programa TMpred (ver

	10	20	30	40	50
TolR <i>P. putida</i>MARVRHKRKPVA	FMNVVPY	IDVMLVLLV	IFMVTAPMLNQGV	KVDL
ExbD <i>P. putida</i>	.MGLHLNEGDDLAENHE	INVT	PFIDVMLVLLII	FMVAAPLATVD	IKVDL
ExbD <i>E. coli</i>	.MAMHLNENLDDNGEMHD	INVT	PFIDVMLVLLII	FMVAAPLATVDV	KVNL
ExbD <i>N. gonorrhoeae</i>	..MAFGSMNSSDDSPMSD	INVT	PLVDVMLVLLI	VFMITMPVLI	HSIPLEL
ExbD <i>B. bronchispetica</i>	MAFGSFDNKSGSHTVS	INMVPL	IDVMLVLLV	IFIIITAPLLAHS	IRINI
Consenso	-----D-----	EINVT	P-IDVMLVLLII	FMVTAPLLT--	IKV-L
	60	70	80	90	100
TolR <i>P. putida</i>	PKVSSEALPQDN.NVQ	ILTI	SIKADKTY	YWNLGSEVD	TDKQMDKAMTLPA
ExbD <i>P. putida</i>	P..ASTAKPAPR.	PEKPVFV	SVKADQKLY..	VG.....	DDQVPAPA
ExbD <i>E. coli</i>	P..ASTSTPQPR.	PEKPVYLSV	KADNSMF..	IG.....	NDPVTDET
ExbD <i>N. gonorrhoeae</i>	PTASEQANKQDKQPKD	PLRLTIDANG	GGYY..	VG.....	GDSASKV
ExbD <i>B. bronchispetica</i>	PQVSAQQIEEEP...	KTVDLAI	DANGALF..	WD.....	EKPV
Consenso	P--SS-A-PQ---	P-KPV-LSIKAD---	Y---	G-----	P-
	110	120	130	140	150
TolR <i>P. putida</i>	MTDAVTKIIAAGRDQ	GKQTQVF	IRGDKAVD	YGAVMGAMGGLQ	KAG...VG
ExbD <i>P. putida</i>	QLGAM...LDAKTKG	DKETTIF	FQADKGV	YGDLM	EVNNMRAAGYLKVG
ExbD <i>E. coli</i>	MITA....LNALTEG	KDITIF	FRADKTV	YETLMKVM	DTLHQAGYLKIG
ExbD <i>N. gonorrhoeae</i>	EIGEVE	SRLKAAKEQ	NENVIVAIA	ADKAVEYDY	VNKALEAARQAGITKIG
ExbD <i>B. bronchispetica</i>	SIDDLPNRFKAI	AGDKPQAE	IRIRADQ	ATRYETLAQVM	ASARRSGMTRIG
Consenso	-I-A-----L-A-----	K-T-	IFIRADKAVDY--	LM-VM---	R-AG--KIG
	160	170			
TolR <i>P. putida</i>	NVGLITEAP.....				
ExbD <i>P. putida</i>	LVGLETA	AKK.....			
ExbD <i>E. coli</i>	LVGEETA	KAK.....			
ExbD <i>N. gonorrhoeae</i>	FVTETKA	Q.....			
ExbD <i>B. bronchispetica</i>	FITSPAPQ	GAPGEAGASA	APAAP		
Consenso	-VG--TA-----				

FIGURA 56. Alineamiento múltiple de TolR de *P. putida* con proteínas ExbD de otros microorganismos. El alineamiento y la secuencia consenso se generaron como se indicó en la Fig. 31. Para que un aminoácido forme parte de la secuencia consenso debe estar presente en al menos 3 de las 5 secuencias alineadas. Dichos aminoácidos se indican en color azul claro. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se señalan en color rojo. El número de acceso a la base de datos y la referencia para cada secuencia, se indican en la Tabla 8. La línea de color azul oscuro sobre la secuencia de TolR de *P. putida*, indica la posición del segmento transmembrana propuesto por el programa TMpred.

sección *Materiales y Métodos*) predijo la presencia de 3 segmentos transmembrana (posiciones 14-40, 138-158 y 179-197) (Fig. 57 y 58), y sugirió una topología según la cual el extremo amino tendría una localización periplásmica.

La secuencia de aminoácidos codificada por esta región se comparó con las secuencias de las bases de datos (Diciembre, 1998). La secuencia mostró similitud con las proteínas TolQ de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *H. influenzae* y *R. prowazekii* (Tabla 9), y también con las proteínas ExbB de *P. putida*, *E. coli* y otros microorganismos (en la tabla

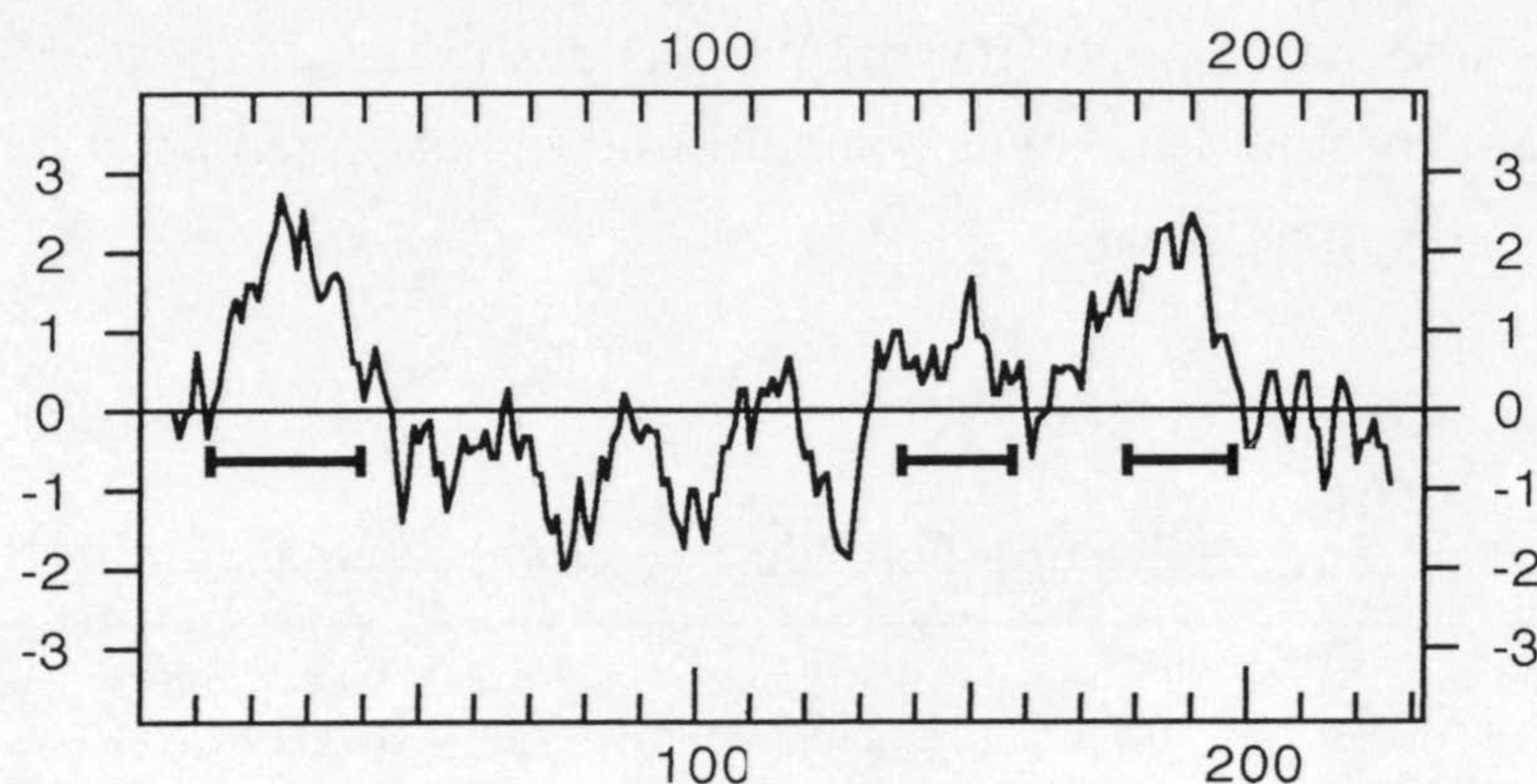


FIGURA 57. Perfil de hidropatía de la proteína TolQ de *P. putida*. El perfil de hidrofobicidad de TolQ se generó siguiendo el método de Kyte y Doolittle (1982). En el eje horizontal se indica la posición de los restos de aminoácidos. En el eje vertical se indica la hidrofobicidad relativa. Los valores positivos indican hidrofobicidad y los negativos hidrofiliicidad. Las barras horizontales indican la localización de los segmentos transmembrana predichos por el programa TMpred.

sólo se indican aquellas proteínas ExbB que mostraron mayor grado de similitud). Análogamente a lo que ocurría con las proteínas TolR y ExbD, también TolQ y ExbB pertenecen a una misma familia de proteínas. Por otro lado, todos los genes *tolQ* secuenciados hasta la fecha se encuentran corriente arriba de su correspondiente gen *tolR*. En *P. putida*, ambos genes están separados por 14 pb (Fig. 47), mientras que en *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y *E. coli*, están separados por 22, 71 y 3 pb, respectivamente. En *R. prowazekii*, los genes *tolQ* y *tolR* solapan en 1 pb. Además, los genes *tolQ* de *P. putida*, *P. aeruginosa*, y *E. coli*, comienzan por GUG. La topología de la proteína TolQ de *E. coli* se conoce muy bien. Esta proteína se localiza en la membrana interna con su extremo amino terminal en el periplasma y posee 3 segmentos transmembrana (Vianney *et al.*, 1994). Los dos primeros están separados por una amplia región hidrofílica citoplásmica. La parte carboxilo terminal también se localiza en el periplasma. Las predicciones de estructura secundaria para la proteína TolQ de *P. putida*, sugieren una topología similar.

La Figura 58 se muestra un alineamiento múltiple de la proteína TolQ de *P. putida* con las proteínas TolQ secuenciadas hasta el momento. Se puede observar como *R. prowazekii* está algo alejada de las demás. Pese a todo, ésta es la proteína del conjunto de proteínas Tol que presenta una mayor grado de conservación. Las regiones transmembrana son las zonas que más se conservan, especialmente las dos últimas. La Figura 59 muestra un alineamiento múltiple de TolQ de *P. putida* con las proteínas ExbB listadas en la Tabla 9. Se observa que las proteínas ExbB de *P. putida* y *Bordetella*

bronchiseptica presentan un tamaño mayor que las restantes, al poseer una región adicional en el extremo amino. Las zonas con similitud se restringen prácticamente a las dos últimas regiones transmembrana.

Tabla 9. Proteínas con las que TolQ de *P. putida* presenta similitud†

Nombre de la proteína y microorganismo de origen	aa ^a	% identidad (solapamiento) ^b	Nº acceso en GenBank o en Swiss-Prot / Referencia ^c
TolQ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	231	91,3 (231)	P50598 / Dennis <i>et al.</i> (1996)
TolQ <i>Haemophilus influenzae</i>	228	56,6 (212)	P43768 / Sen <i>et al.</i> (1996)
TolQ <i>Escherichia coli</i>	230	55 (222)	P05828 / Sun y Webster (1987)
TolQ <i>Rickettsia prowazekii</i>	241	41,6 (231)	E1342614 / Andersson <i>et al.</i> (1998)
ExbB <i>Escherichia coli</i>	244	38,7 (194)	P18783 / Eick-Helmreich y Braun (1989)
ExbB <i>Pseudomonas putida</i>	329	37 (192)	Q05605 / Bitter <i>et al.</i> (1993)
ExbB <i>Xanthomonas campestris</i>	253	35,8 (207)	O34260 / Wiggerich <i>et al.</i> (1997)
ExbB <i>Bordetella bronchiseptica</i>	314	30,8 (211)	G3916254 / Nicholson y Beall. Sin pub.
ExbB <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	220	28 (211)	O06433 / Biswas <i>et al.</i> (1997)

^a Número de aminoácidos de la proteína.

^b Se indica el porcentaje de residuos idénticos encontrados en el fragmento de solapamiento. En el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento (indicado entre paréntesis) se incluyen los "huecos" que introduce el programa de búsqueda de similitudes para optimizar el alineamiento.

^c "Sin pub." indica que dicha secuencia se encuentra depositada en la base de datos pero que no existe ningún artículo publicado sobre ella hasta la fecha del análisis.

† El análisis comparativo se realizó en diciembre de 1998.

Corriente arriba de *tolQ* se encontró otra fase de lectura abierta (denominada *orfU*) entre los nucleótidos 177 y 629 (Fig. 47) que codificaría un polipéptido de 150 aminoácidos con un peso molecular estimado de 17.194 Da. Dicho polipéptido era relativamente rico en aminoácidos cargados (26,7% del total), especialmente en arginina (10,7%). Como aminoácidos mayoritarios poseía alanina (12,0%) y leucina (11,3%). El perfil de hidrofobicidad de dicho polipéptido mostró una proteína de carácter fundamentalmente hidrofílico (Fig. 60).

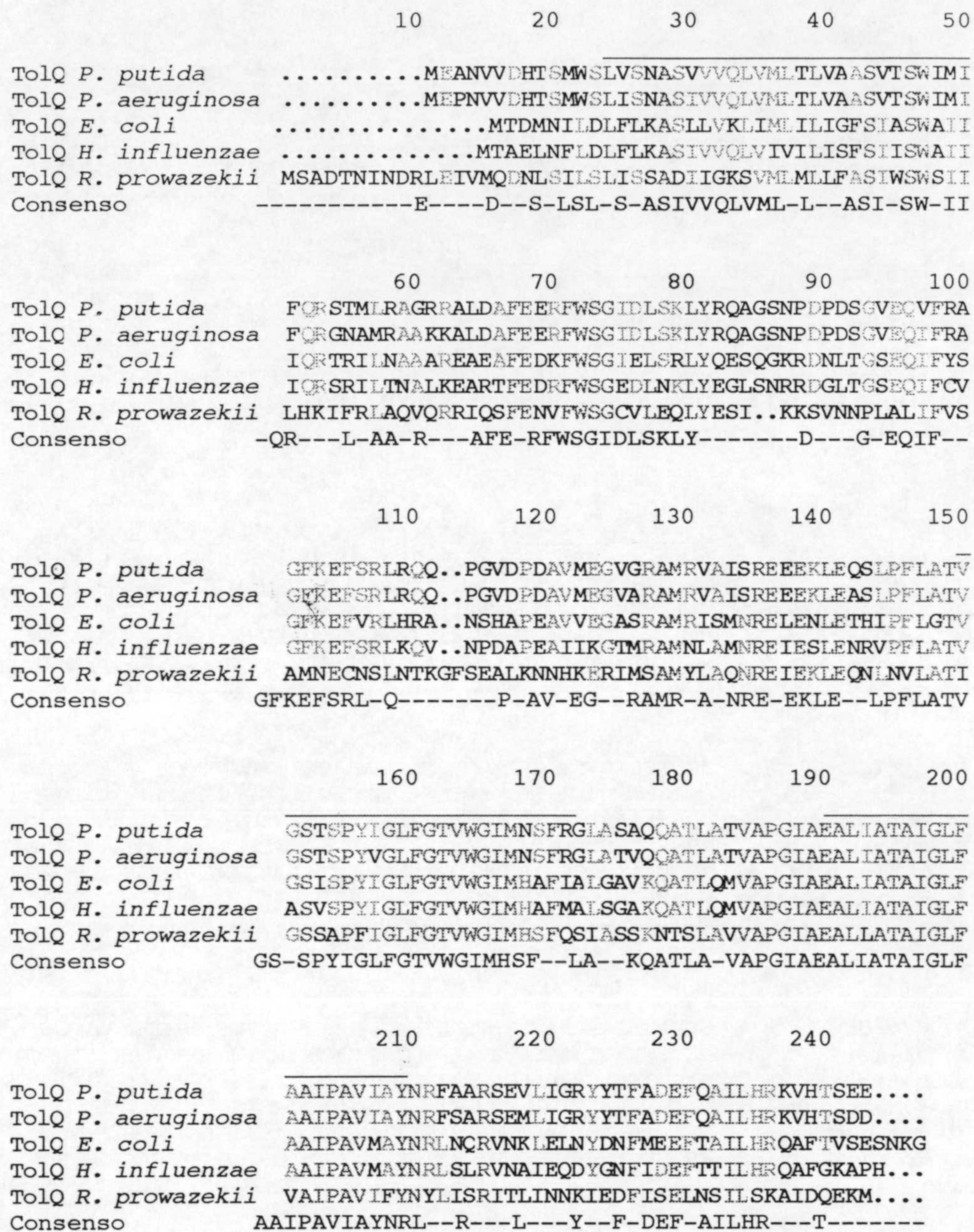


FIGURA 58. Alineamiento múltiple de TolQ de *P. putida* con proteínas TolQ de otros microorganismos. El alineamiento y la secuencia consenso se generaron como se indicó en la Fig. 31. Para que un aminoácido forme parte de la secuencia consenso debe estar presente en al menos 3 de las 5 secuencias alineadas. Dichos aminoácidos se indican en color azul claro. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se señalan en color rojo. El número de acceso a la base de datos y la referencia para cada secuencia, se indican en la Tabla 9. Las líneas de color azul oscuro sobre la secuencia de TolQ de *P. putida*, indican la posición de los segmentos transmembrana propuestos por el programa TMpred.

Resultados - Capítulo III

	10	20	30	40	50
TolQ <i>P. putida</i>
ExbB <i>E. coli</i>
ExbB <i>P. putida</i>	MTRTQPSASPTPSRAWRAIAALMFSLVLAPVAMADEPTANASTPAAAAAP				
ExbB <i>N. gonorrhoeae</i>
ExbB <i>X. campestris</i>
ExbB <i>B. bronchiseptica</i>MSNAINTATLVAQAATPSAAATP
Consenso	-----	-----	-----	-----	-----
	60	70	80	90	100
TolQ <i>P. putida</i>MEANVVVDH
ExbB <i>E. coli</i>MGNNLMQTD
ExbB <i>P. putida</i>	ATPAAAPAPAADGSAPVADAPAAAPVDAPVAVDPGVEALVEDTTLGMAMD				
ExbB <i>N. gonorrhoeae</i>
ExbB <i>X. campestris</i>MLQEFVIAAAAGGSNPSAALSQMGFEHL
ExbB <i>B. bronchiseptica</i>	GAPTAAPLAQQAGEAAGAAOQTGTEALNQAALSAAPAVPPAPLATPD				
Consenso	-----	-----	-----	-----	-----
	110	120	130	140	150
TolQ <i>P. putida</i>	TSMWSLVSNASVVVQLVMLTLVAASVTSWIMIFORSTMLRAGRRLDAFE				
ExbB <i>E. coli</i>	LSVWGMYPHADIVVKCVMIGLILASVVTWAIFFSKSVEFFNQKRLKREQ				
ExbB <i>P. putida</i>	LSPWGMYPKNADIVVKIVMIGLAIASIITWTIWIAKGFELMGAKRRLRGEI				
ExbB <i>N. gonorrhoeae</i>	MNLKLVFESGDPVLIGVFLMMLMSTVIVCLVLRICIKLYRARKGNAAVK				
ExbB <i>X. campestris</i>	ITEMTSSPGDFAVSWVLITLIAMSAASWYWTVINIFRATRLKSAADRVT				
ExbB <i>B. bronchiseptica</i>	MGFLHFVAQSDVFGKTLFVILIVMSLVIVYLIVVKAAGNMGMKRRAAHL				
Consenso	-----D-V--V--L--S--TW-----				
	160	170	180	190	200
TolQ <i>P. putida</i>	ERFWSGIDLSKLYRQAGSNPD..PDSGVEQVFRAGFKESRLR..QQPGV				
ExbB <i>E. coli</i>	QLLAEARSLNQAANDIAADFGS...KSLSLHLLNEAQNELEL....SEGSD				
ExbB <i>P. putida</i>	AQLKKSASLKEASEVSNKEG....TLAHTLVHDALEEMRL....SANTR				
ExbB <i>N. gonorrhoeae</i>	RHMRDTLSLNDAVEKVRVDA..PLSKLAQEQALQSYRNYRNE..ASELA				
ExbB <i>X. campestris</i>	TAFWDAPNAQDAIRAMEEQPASEPFSKIALDAAQARAHQRAEGSTGGMG				
ExbB <i>B. bronchiseptica</i>	NKFWNASLEQVENEIVTHGARDPFSHLASHAMHAQQHHAKFG..ATKLE				
Consenso	-----SL--A-----P-S-----A-----				
	210	220	230	240	250
TolQ <i>P. putida</i>	DPDAVMEGVGRAMKVAISREEEKLEQSLPFLATVGSSESPYIGLFGTVWGI				
ExbB <i>E. coli</i>	DNEGIKERTSFRLEERRVAAVGRQMGNGYLAITIGAISPFVGLFGTVWGI				
ExbB <i>P. putida</i>	EKEGIKERVAFRLERLVAASGRNMSSGTGVLATIGSTAPFVGLFGTVWGI				
ExbB <i>N. gonorrhoeae</i>	QALPLNEYLVIQIRNSMAQIMRFDYGMTALASIGATAPFVGLFGTVWGI				
ExbB <i>X. campestris</i>	ESLSRSEFVDRALRQAVTRESTKLQSGMTLLATVGAATAPFVGLFGTVWGI				
ExbB <i>B. bronchiseptica</i>	ESGSGNEFVSRITMRKVIDEETAKLENGLTVLASVGSATAPFVGLFGTVWGI				
Consenso	-----E-V---R-----G---LAT-G-TAPFVGLFGTVWGI				
	260	270	280	290	300
TolQ <i>P. putida</i>	MNSFRGLASAQQATLATVAPGIAEAL IATAIGLFAAIPAVIAYNRFARS				
ExbB <i>E. coli</i>	MNSFIGIAQTQTTNLAVVAPGIAEALLATAIGLVAAIPAVVIYNVFAEQI				
ExbB <i>P. putida</i>	MNSFIGIAKTQTTNLAVVAPGIAEALLATALGLVAAIPAVVIYNVFARSI				
ExbB <i>N. gonorrhoeae</i>	YHALINIGQSGQMSIAAVAGPIGEALVATAAGLFVAIPAVLAYNFLNRGT				
ExbB <i>X. campestris</i>	YGALIKIGATGSASIDAVAGPVGEALIMTAIGLFVAIPAVFAFNFFSKVN				
ExbB <i>B. bronchiseptica</i>	YHALVIGIGLSDGVTINRIAGPVGEALIMTGLGLAVAI PAVLAYNAFVRNN				
Consenso	----IGI-----A-VA--I-EAL-ATA-GL--AIPAV-AYN-F-R--				
	310	320	330	340	
TolQ <i>P. putida</i>	EVLIGRYTYTFADEFQAILHRKVHTSEE.....				
ExbB <i>E. coli</i>	GGFKAMLDVAAQVLLQLSRDLDEASAAHPVRVAQKLRAG.				
ExbB <i>P. putida</i>	AGYKAQVSDASAQVLLLVSRDLDHQGSERAAPHMVKVG.....				
ExbB <i>N. gonorrhoeae</i>	KILTQDLDDAMAHLHLVRLLNQKDS.....				
ExbB <i>X. campestris</i>	SSVIAKFDTFADLHDFATGSRVR.....				
ExbB <i>B. bronchiseptica</i>	RVFLSRLDAFAHDLFAFLTTGQQVAVSDGKVRALRRQHGRGSE				
Consenso	-----A-----				

FIGURA 59. Alineamiento múltiple de TolQ de *P. putida* con proteínas ExbB de otros microorganismos. El alineamiento y la secuencia consenso se generaron como se indicó en la Fig. 31. Para que un aminoácido forme parte de la secuencia consenso debe estar presente en al menos 4 de las 6 secuencias alineadas. Dichos aminoácidos se indican en color azul claro. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se señalan en color rojo. El número de acceso a la base de datos y la referencia para cada secuencia, se indican en la Tabla 9. Las líneas de color azul oscuro sobre la secuencia de TolQ de *P. putida*, indican la posición de los segmentos transmembrana propuestos por el programa TMpred.

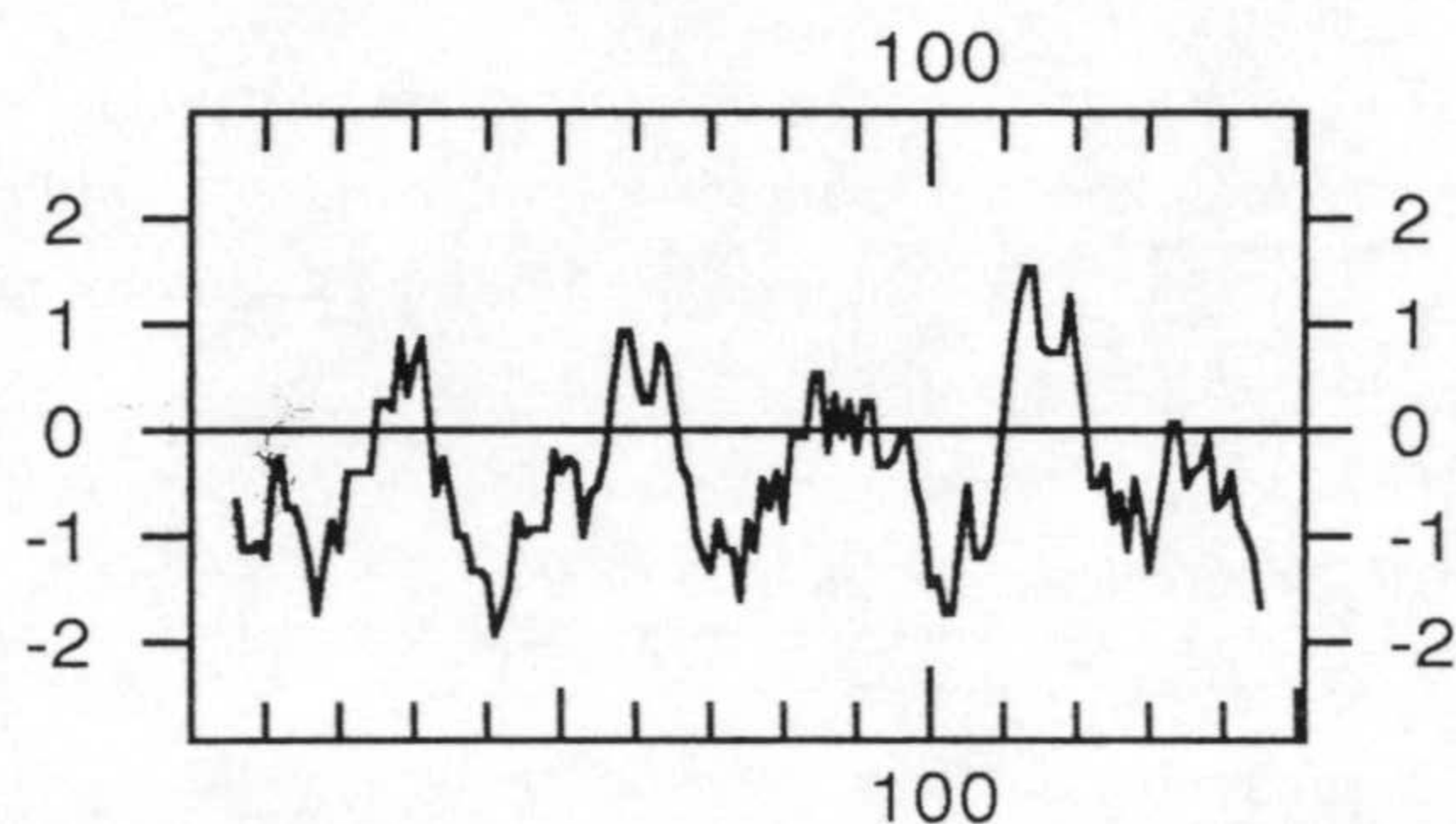


FIGURA 60. Perfil de hidropatía de la proteína OrfU de *P. putida*. El perfil de hidrofobicidad de OrfU se generó siguiendo el método de Kyte y Doolittle (1982). En el eje horizontal se indica la posición de los restos de aminoácidos. En el eje vertical se indica la hidrofobicidad relativa. Los valores positivos indican hidrofobicidad y los negativos hidrofilicidad.

En la Tabla 10 se muestra el resultado obtenido al comparar la secuencia de aminoácidos codificada por esta región con las secuencias de las bases de datos (Diciembre, 1998). Además de las proteínas Orf1 de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *H. influenzae*, cuyos genes se localizan en estos microorganismos adyacentes a su correspondiente gen *tolQ*, también aparecieron otras proteínas "hipotéticas" de tamaño similar (no mostradas en la tabla) cuyo porcentaje de identidad con OrfU de *P. putida* osciló entre el 25 y el 35%. En la Figura 61 se muestra un alineamiento múltiple de la proteína OrfU de *P. putida* con las proteínas Orf1 listadas en la Tabla 10. En *P. putida*, los genes *orfU* y *tolQ* están separados por 2 pb (Fig. 47), mientras que en *P. aeruginosa* y *H. influenzae* se hayan separados por 1 y 16 pb, respectivamente. En *E. coli* ambos genes solapan 4 pb. Por otra parte, *orf1* de *E. coli* es el único que comienza por GUG. En cuanto a su posible localización celular, se sabe que Orf1 de *E. coli* es una proteína citoplásmica. El carácter hidrofílico global de OrfU de *P. putida* y la ausencia de secuencias señal de exportación hacia la envoltura celular, sugieren que OrfU de *P. putida* también es una proteína citoplásmica.

Tabla 10. Proteínas con las que OrfU de *P. putida* presenta similitud†

Nombre de la proteína y microorganismo de origen	aa ^a	% identidad (solapamiento) ^b	Nº acceso en GenBank o en Swiss-Prot / Referencia
Orf1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(133)	70 (135)	U39558 / Dennis <i>et al.</i> (1996) ^c
Orf1 <i>Escherichia coli</i>	134	48 (123)	P08999 / Sun y Webster (1987)
Orf1 <i>Haemophilus influenzae</i>	136	45 (129)	P44679 / Fleischmann <i>et al.</i> (1995)

^a Número de aminoácidos de la proteína. Los números entre paréntesis indican que la secuencia disponible en la base de datos está incompleta.

^b Se indica el porcentaje de residuos idénticos encontrados en el fragmento de solapamiento. En el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento (indicado entre paréntesis) se incluyen los "huecos" que introduce el programa de búsqueda de similitudes para optimizar el alineamiento.

^c Se indica el número de acceso a la secuencia de nucleótidos. La secuencia de Orf1 de *P. aeruginosa* usada para la comparación es distinta a la publicada ya que, en base a la secuencia de *orfU* de *P. putida*, se han corregido manualmente varios posibles errores de secuenciación que provocaban cambios de fase de lectura, con lo que se ha conseguido aumentar la longitud de la región codificante.

† El análisis comparativo se realizó en diciembre de 1998.

```

                10      20      30      40      50
OrfU P. putida      MRAQNQLEPFAHRCRVYYEDTDAGGVVYVNYLKFMERARTERLRHLGFS
'Orf1 P. aeruginosa .....RVYYEDTDAGAV.YYVNYLKFMERARTDSDRRLLGFA
Orf1 E. coli       ....MNTTLFRWPVRVYYEDTDAGGVVYHAS YVAFYERARTEMLRHHHFS
Orf1 H. influenzae ....MLDNGFSFPVRVYYEDTDAGGVVYHAR YLHFFERARTEYLRTLNET
Consenso           -----F-----RVYYEDTDAGGVVY---YL-F-ERARTE-LR-L-F-
    
```

```

                60      70      80      90      100
OrfU P. putida      QSQLAEDN.LLFVVHSSEARYHAPARLDDELRVTAQVLELNRSASLRFVQQ
'Orf1 P. aeruginosa QSQLVGDN.LLFVVISAEARYHGP AKLDDELLVSARGRELNRSASLKFQQ
Orf1 E. coli       QQALMAER.VAFVVRKMTVEYYAPARLDDMLEIQTEITSMRGTSLVFTQR
Orf1 H. influenzae QQTLLLEQQALAFVVKTLAIDYCVA AKLDDLLMVETEVSFVKGATILFEQR
Consenso           Q--L-----L-FVV-----Y--PA-LDD-L-V-----E---ASL-F-Q-
    
```

```

                110     120     130     140     150
OrfU P. putida      VWREKDETLCEGQFLVA AVRADTFKPRALPPQLRDAFAADGSGNQSNAG
'Orf1 P. aeruginosa VRRASDSVLLCEGRFLVACVRADTLKPRAI PETLRAAFGA..SPDSFSAG
Orf1 E. coli       IVNA.ENTLLNEAEV LVVCVDPLKMKPRALPKSIVAEFKQ.....
Orf1 H. influenzae LMR..NTLMLSKATVKVACVDL GKMKPVAFPKEVKAAFHHLK.....
Consenso           --R-----LL-E---LVACV-----KPRAP---AAF-----
    
```

```

OrfU P. putida      E
'Orf1 P. aeruginosa D
Orf1 E. coli       .
Orf1 H. influenzae .
Consenso           -
    
```

FIGURA 61. Alineamiento múltiple de OrfU de *P. putida* con proteínas Orf1 de otros microorganismos. El alineamiento y la secuencia consenso se generaron como se indicó en la Fig. 31. Para que un aminoácido forme parte de la secuencia consenso debe estar presente en al menos 3 de las 4 secuencias alineadas. Dichos aminoácidos se indican en color azul claro. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se señalan en color rojo. El número de acceso a la base de datos y la referencia para cada secuencia, se indican en la Tabla 10. En cuanto a la secuencia mostrada para Orf1 de *P. aeruginosa*, ver nota "c" en la Tabla 10.

En resumen, en la región de ADN corriente arriba de *oprL* se encontraron 5 fases de lectura abierta cuyos productos presentaron similitud con las proteínas TolB, TolA, TolR, TolQ y Orf1 de *E. coli*, *H. influenzae*, y *P. aeruginosa*. Éstas, junto con las proteínas anteriormente caracterizadas OprL y Orf2, están codificadas por la agrupación de genes del denominado sistema *tol-pal*. El orden de los genes en *P. putida* es *orfU*, *tolQ*, *tolR*, *tola*, *tolB*, *oprL* y *orf2*. Este orden se conserva en los microorganismos antes mencionados, exceptuando el hecho de que *H. influenzae* no posee gen *orf2*. En la Fig. 47 se muestra la secuencia de ADN de los genes del sistema *tol-oprL* (o "genes *tol-oprL*") de *P. putida*.

Con objeto de determinar los límites de la agrupación de genes *tol-oprL*, se continuó secuenciando corriente arriba de *orfU*, encontrándose una fase de lectura abierta incompleta en el extremo 5', separada de *orfU* por 181 pb. La secuencia parcial (correspondiente a los últimos 152 aminoácidos) de este polipéptido mostró gran similitud con la parte carboxilo terminal de las proteínas RuvB de varios microorganismos, destacando entre ellos *P. aeruginosa* (con un 86,8% de identidad), *H. influenzae* (67,8%) y *E. coli* (67,1%). La proteína RuvB, junto con las proteínas RuvC y RuvA, está implicada en el procesamiento de las estructuras intermediarias producidas durante la recombinación homóloga (uniones de Holliday) (West, 1997). En concreto, el gen *ruvB* codifica una ADN helicasa dependiente de ATP. Por último, cabe destacar que en *P. aeruginosa*, corriente arriba de *orf1*, también se encuentra el gen *ruvB*, seguido de los genes *ruvA* y *ruvC*. En la Fig. 62 se muestra un alineamiento entre RuvB de *P. aeruginosa* y la secuencia parcial obtenida de *P. putida*.

2. CLONACIÓN Y ANÁLISIS DE LA REGIÓN DE ADN CORRIENTE ABAJO DEL GEN *orf2*

Para determinar los límites del grupo de genes *tol-oprL*, se continuó secuenciando corriente abajo del gen *orf2*, en el plásmido pPRO100 (ver apartado 1.1 de este capítulo). Por debajo de *orf2* se encontraron dos fases de lectura abierta, que se denominaron *orf3* y

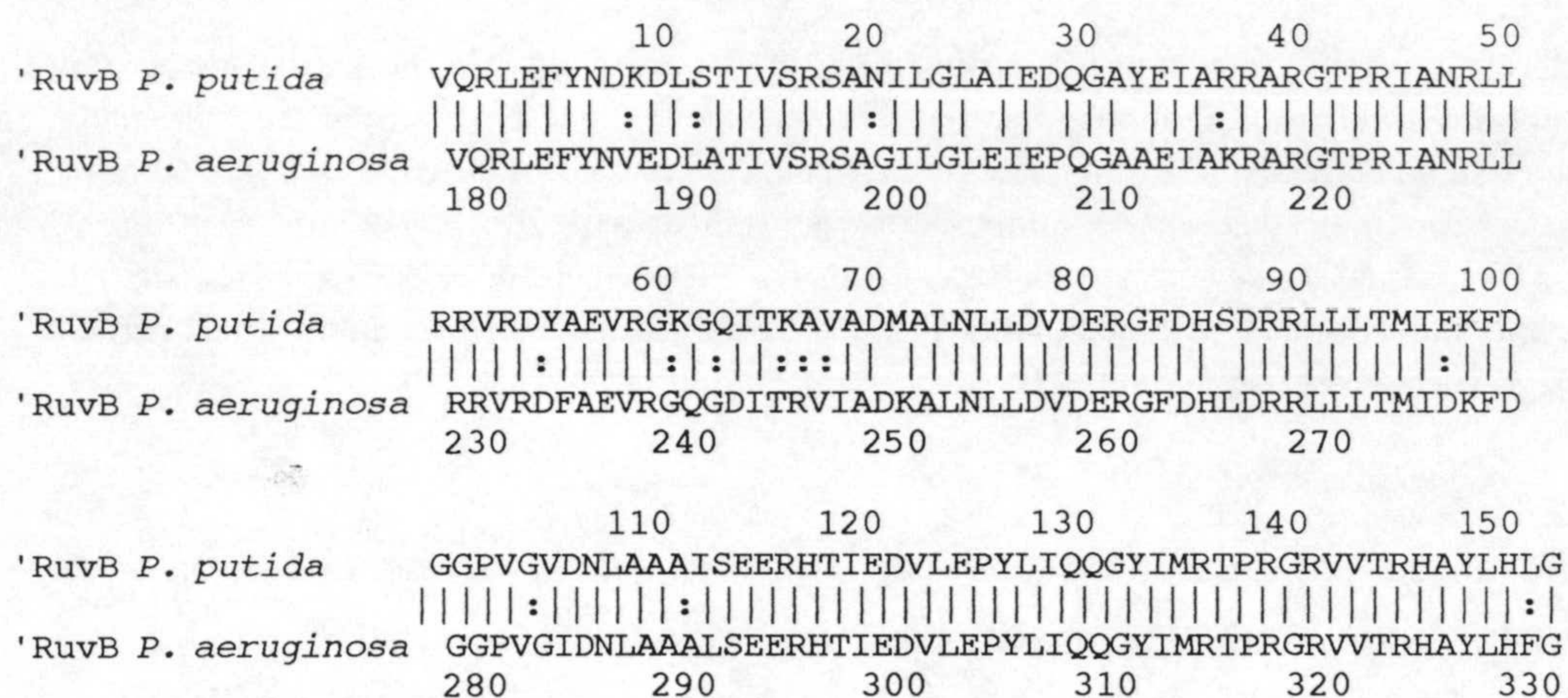


FIGURA 62. Alineamiento de 'RuvB de *P. putida* con la región carboxilo terminal de la proteína RuvB de *P. aeruginosa*. Se presenta el alineamiento (Diciembre, 1998) generado por el programa FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988). Los aminoácidos conservados en ambas secuencias están unidos entre sí a través de una línea vertical, y los similares a través de dos puntos. La numeración de aminoácidos en el caso de RuvB de *P. aeruginosa* se refiere a la de la proteína completa. La longitud de la proteína RuvB de *P. aeruginosa* es de 352 aminoácidos (Hishida *et al.*, 1996), y su número de acceso a la base de datos es Q51426.

orf4, separadas de *orf2* por 168 pb y entre sí por 17 pb. El hipotético producto de *orf3* sería un polipéptido de 215 aminoácidos con un peso molecular estimado de 24.081 Da. Su perfil de hidrofobicidad (no mostrado) no predecía ninguna región hidrofóbica importante. Al compararlo con las secuencias de las bases de datos mostró similitud (28,6% de identidad) con la supuesta proteína ExsD de *Rhizobium meliloti* y con otras proteínas "hipotéticas" de tamaño similar de diversos microorganismos. En la Fig. 63 se muestra un alineamiento de las dos proteínas, en el que la mayor similitud se observa a nivel de la región amino terminal.

Por su parte, la fase de lectura abierta *orf4* produciría un polipéptido de 224 aminoácidos con un peso molecular de 23.945 Da. El perfil de hidropatía (no mostrado) predecía una región hidrofóbica amino terminal (posiciones 1-25) y el programa TMpred proponía la existencia (aunque con baja probabilidad) de una hélice α transmembrana en dicha zona (aminoácidos 6-23). El programa SignalP no predijo ningún péptido señal, lo que implica que dicho segmento podría servir como secuencia señal para el anclaje de la proteína a la membrana interna. La comparación de Orf4 con las secuencias de las distintas bases de datos dió un resultado del mismo tipo que con Orf3, es decir, presentó similitud con diversas proteínas "hipotéticas" de tamaño parecido, y también con la

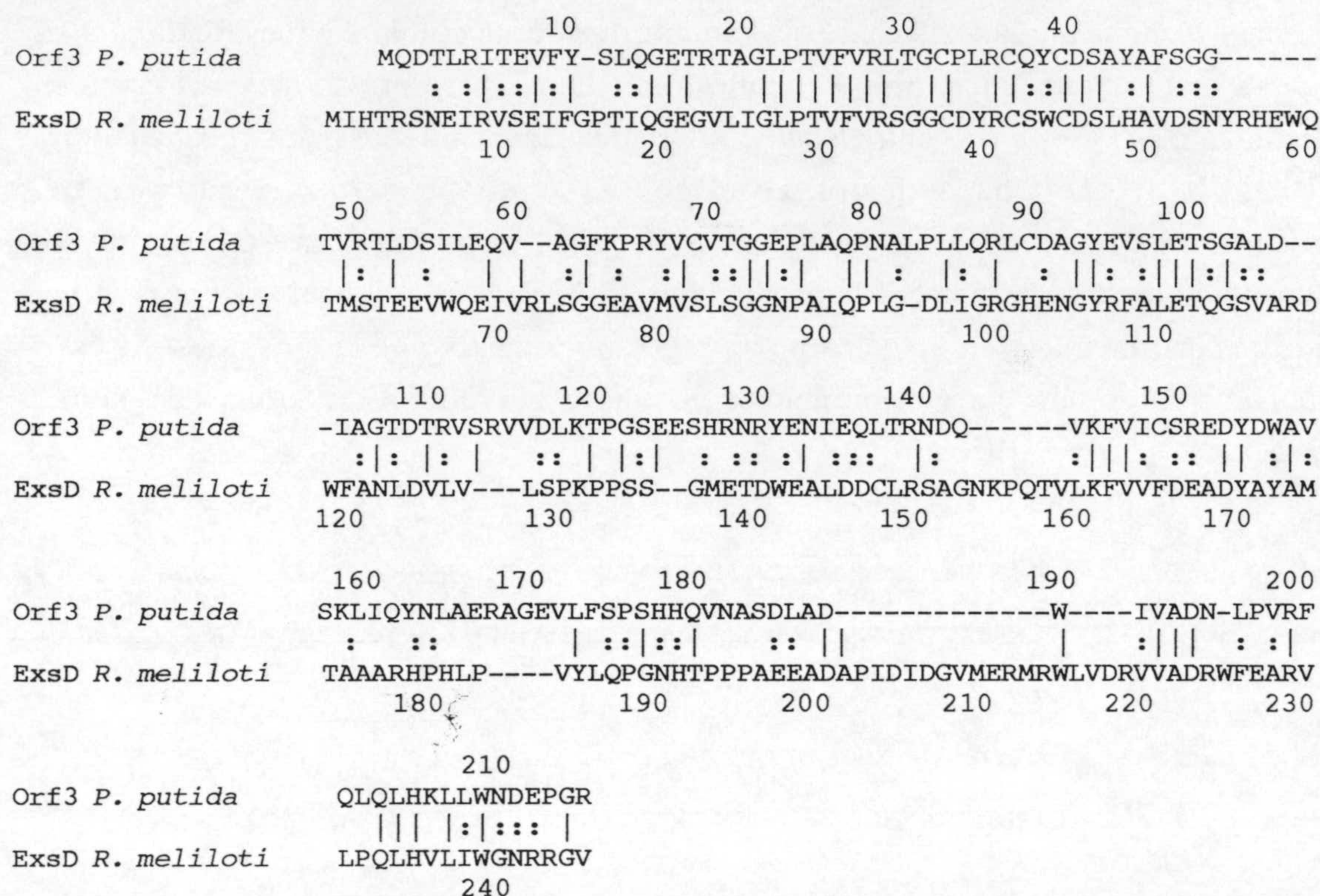


FIGURA 63. Alineamiento de Orf3 de *P. putida* con la proteína ExsD de *R. meliloti*. Se presenta el alineamiento (Diciembre, 1998) generado por el programa FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988). Los aminoácidos conservados en ambas secuencias están unidos entre sí a través de una línea vertical, y los similares a través de dos puntos. La longitud de la proteína ExsD de *R. meliloti* es de 245 aminoácidos y su número de acceso a la base de datos es O54060.

proteína ExsB de *R. meliloti* (39,2% de identidad en 191 aminoácidos solapantes). El alineamiento entre ambas proteínas se muestra en la Fig. 64. No se observó similitud a nivel de la región carboxilo terminal.

En *R. meliloti*, el gen *exsB* y el supuesto gen *exsD* se transcriben en el mismo sentido, y están separados por una región de 357 pb dentro de la cual se encuentra el gen hipotético *exsC*. Estos genes están situados adyacentes a una región de 24 kb que porta la agrupación de genes *exo*, implicados en la biosíntesis del exopolisacárido succinoglicano (EPS I), y que se localizan en el megaplásmido 2 de *R. meliloti*. El succinoglicano es un polímero formado por la repetición de unidades de un octasacárido compuesto por un residuo de galactosa y siete de glucosa, que además pueden modificarse mediante la adición de grupos de acetato, succinato o piruvato. *R. meliloti* sintetiza simultáneamente dos tipos de polímeros de succinoglicano, uno de alto peso molecular formado por miles de unidades repetitivas, y otro de bajo peso molecular formado por monómeros, trímeros

y tetrámeros de dicha unidad básica. Esta última forma de succinoglicano es fundamental para que la bacteria pueda invadir los nódulos radiculares, paso previo necesario para el establecimiento de la simbiosis entre *R. meliloti* y su correspondiente planta hospedadora (Battisti *et al.*, 1992). Una mutación en el gen *exsB* de *R. meliloti* resulta en un incremento de 3 veces en la producción de succinoglicano, mientras que su sobreexpresión disminuye 5 veces la producción. En base a estas observaciones, se ha sugerido que la proteína ExsB actúa como un regulador negativo de la biosíntesis de este polímero, aunque se sabe que esta regulación no ocurre a nivel transcripcional (Becker *et al.*, 1995).

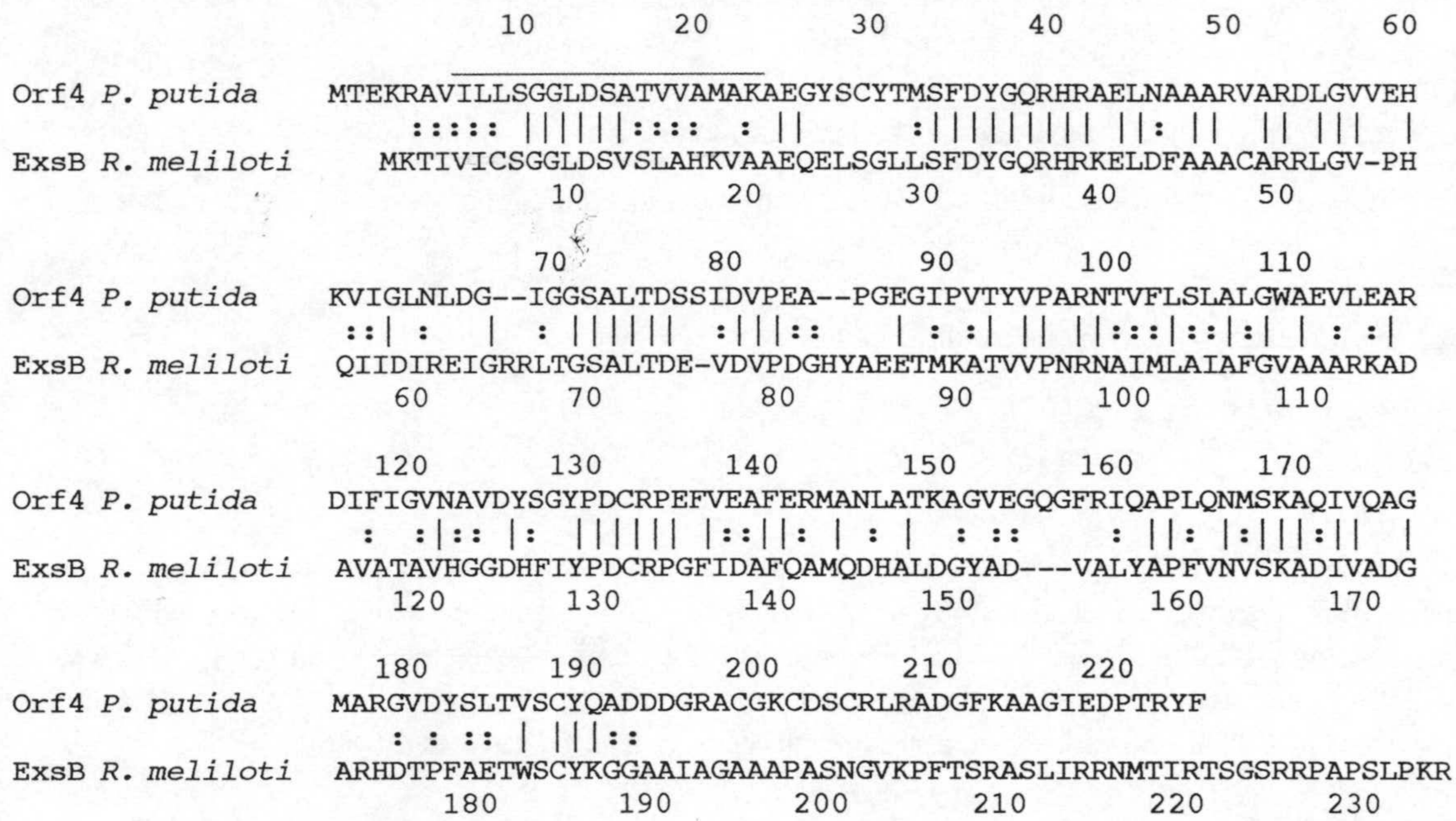


FIGURA 64. Alineamiento de Orf4 de *P. putida* con la proteína ExsB de *R. meliloti*. Se presenta el alineamiento (Diciembre, 1998) generado por el programa FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988). Los aminoácidos conservados en ambas secuencias están unidos entre sí a través de una línea vertical, y los similares a través de dos puntos. La longitud de la proteína ExsB de *R. meliloti* es de 234 aminoácidos (Becker *et al.*, 1995), y su número de acceso a la base de datos es Q52925. La línea de color azul sobre la secuencia de Orf4 de *P. putida*, indica la posición del segmento transmembrana propuesto por el programa l'Mpred.

En la Fig. 46 se muestra un esquema de la región secuenciada al completo. Como se puede observar, todos los genes secuenciados muestran el mismo sentido de transcripción.

3. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN CON MUTANTES *tol* DE *E. coli*

Uno de los fenotipos más característicos de los mutantes *tol* de *E. coli* es el de la tolerancia a colicinas del grupo A, el cual les confirió el nombre. Las colicinas son toxinas de naturaleza proteica producidas por cepas colicinogénicas de *E. coli*. Estas toxinas, de codificación plasmídica, son activas contra otras cepas de *E. coli* y especies relacionadas (James *et al.*, 1996; Lazdunski *et al.*, 1998). Para ejercer su acción letal, las colicinas deben penetrar en el interior celular y, según la ruta de entrada utilizada, éstas se clasifican en dos grupos, A y B. Las colicinas del grupo A utilizan distintas proteínas del sistema Tol para atravesar las membranas de la bacteria. En contraste, las colicinas del grupo B penetran en la célula a través del sistema TonB/ExbBD (Lazdunski, 1995; Lazdunski *et al.*, 1998). El grupo del Dr. Lazdunski, en Marsella, ha caracterizado en detalle el mecanismo de entrada de las colicinas del grupo A, y dispone de una amplia colección de mutantes en los genes *tol*, caracterizados por ser insensibles a la acción de dichas colicinas. La existencia de estos mutantes de *E. coli* nos permitió realizar estudios de complementación usando los genes *tol* de *P. putida* para determinar el nivel de recuperación del fenotipo silvestre en función del grado de sensibilidad a colicinas.

3.1. Reconstrucción de los genes del sistema *tol-oprL* de *P. putida* en un mismo plásmido

Para facilitar los ensayos de complementación se decidió clonar todos los genes del sistema *tol-oprL* en el plásmido pUC18. Para ello se utilizó como base el plásmido pUC18H (ver apartado 1.1 de este capítulo), que portaba los genes *orfU*, *tolQ*, *tolR*, *tolA*, *tolB* y *oprL::phoA*, junto con aproximadamente 2,1 kb de ADN extra, corriente arriba de *orfU*. En primer lugar, para evitar posibles interferencias de esta región adicional, se optó por eliminarla, con lo que además se acercaron los genes *tol-oprL* al promotor P_{lac} del vector. Para ello, el plásmido pUC18H se digirió parcialmente con *SmaI* y se aisló un fragmento de 8,8 kb, que carecía de las 2,1 kb situadas entre P_{lac} y *orfU*. Este fragmento se religó dando lugar al plásmido pUC18H Δ Sm (Fig. 66). En este plásmido, *orfU* estaba situado a una distancia de aproximadamente 200 pb del promotor P_{lac} . Posteriormente, el plásmido pUC18H Δ Sm se digirió con *BglIII* y *HindIII* y el fragmento mayor, de 6,5 kb, se ligó con el fragmento *BglIII-HindIII* de 1,9 kb obtenido de pPRO200, y la mezcla de ligación se transformó en la cepa *E. coli* JM109. De la selección de un clon resistente a ampicilina y sin actividad fosfatasa alcalina, se obtuvo el plásmido pTOL de 8,4 kb, en el que el gen *oprL::phoA* se había sustituido por los genes *oprL* y *orf2* (Fig. 66).

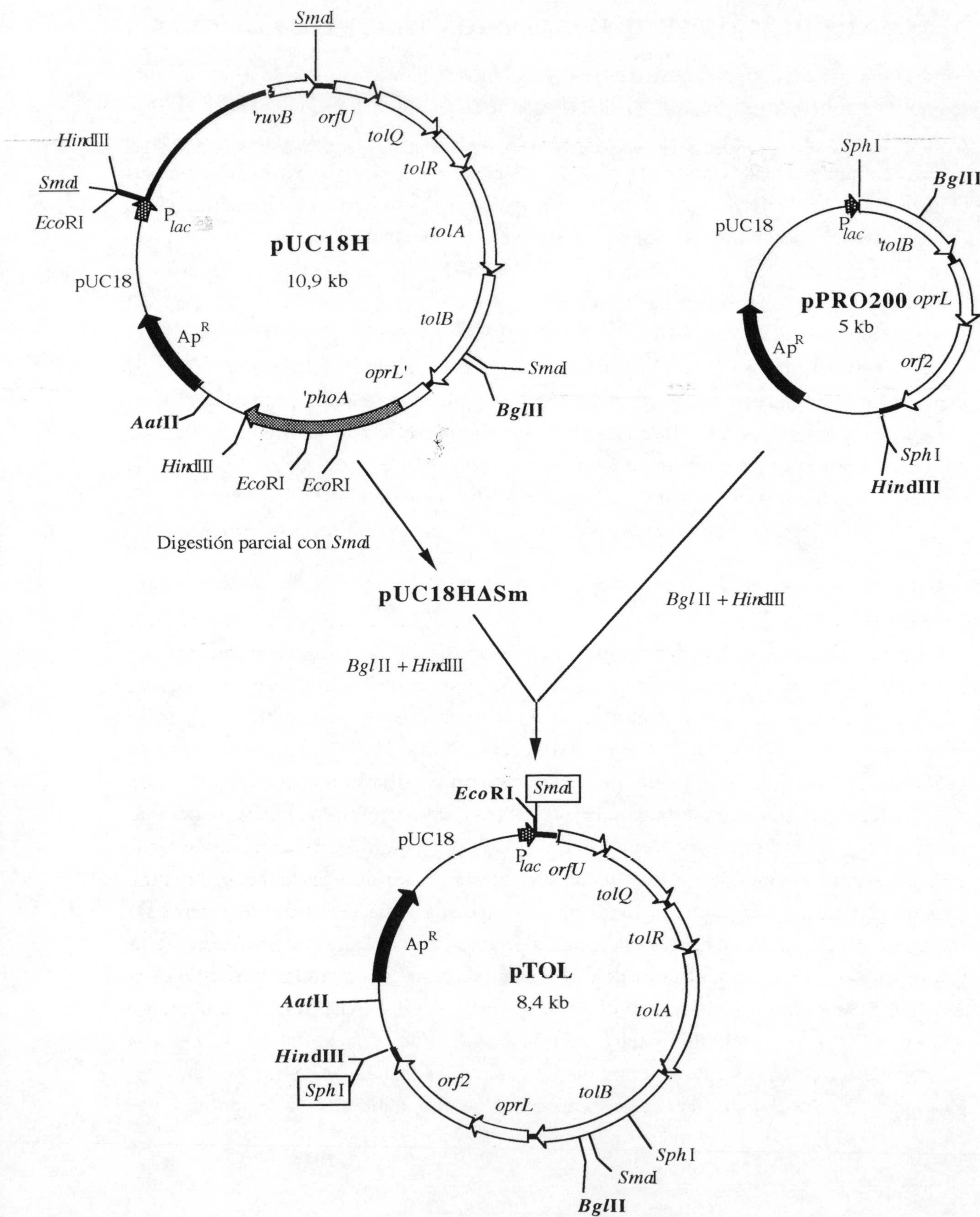


FIGURA 66. Esquema de la construcción del plásmido pTOL. Se indican los sitios de restricción relevantes para la construcción de los plásmidos. Los sitios señalados en negrita son únicos en todo el plásmido. Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes. Las líneas negras de trazo más grueso que el resto del plásmido indican las regiones de ADN pertenecientes a *P. putida*. Los dos sitios *Sma*I subrayados en el mapa del plásmido pUC18H, señalan los límites del fragmento deleciónado en el plásmido pUC18HΔSm. La secuencia de ADN (5.750 pb) correspondiente al inserto de pTOL, se muestra en la Fig. 47, donde los sitios *Sma*I y *Sph*I que aparecen recuadrados en pTOL se corresponden con los sitios resaltados en negrita que se indican en dicha figura.

3.2. Ensayos de complementación

Para los estudios de complementación se utilizaron las colicinas A, E3 y B. Las dos primeras, que pertenecen al grupo A, ejercen su acción tóxica bien desestabilizando el potencial de membrana mediante la formación de canales iónicos en la membrana interna (caso de la colicina A) o bien como ARNasa que ataca al ARN ribosómico 16S deteniendo la síntesis proteica (colicina E3) (James *et al.*, 1996). Ambas colicinas precisan de las proteínas TolQ, TolR, TolA y TolB para penetrar en la célula y poder ejercer, posteriormente, su acción tóxica (Lazdunski *et al.*, 1998). Por su parte, la colicina B (del grupo B de colicinas) forma poros en la membrana interna y requiere para su entrada en la bacteria las proteínas TonB, ExbB y ExbD, pertenecientes al denominado sistema TonB/ExbBD (Lazdunski *et al.*, 1998). Esta última colicina se utilizó como control positivo de lisis celular en *E. coli*. En primer lugar, el plásmido pTOL se transformó en *E. coli* TPS300, una cepa mutante *tolR* que, al contrario que la cepa parental *E. coli* GM1, era tolerante a las colicinas A y E3 (Fig. 67). Como control positivo de la complementación, TPS300 también se transformó con el plásmido pBPAIL que portaba todos los genes *tol-pal* de *E. coli*. En la Fig. 67 se puede observar como ambos plásmidos fueron capaces de complementar la mutación *tolR* de la cepa TPS300, que se volvió tan sensible a las colicinas A y E3 como la cepa parental. En el caso de pTOL, ni siquiera fue necesario añadir IPTG para inducir la expresión de los genes clonados, lo que significaba que *tolR* se estaba expresando a partir de su propio promotor o bien que, al tratarse de un plásmido de alto número de copias, el escape a partir del promotor P_{lac} era suficiente para obtener la expresión adecuada, o ambas situaciones. Estos resultados demuestran que el gen *tolR* realmente codifica una proteína cuya función, además, es similar a la de su análoga de *E. coli*.

Este mismo experimento se realizó con el mutante TPS13 (*tolQ*) derivado de *E. coli* GM1. Sin embargo, los resultados de la complementación fueron negativos, ya que el gen *tolQ* de pTOL fue incapaz de convertir a TPS13 en sensible a las colicinas A y E3, mientras que pBPAIL fue capaz de complementar la mutación (no mostrado).

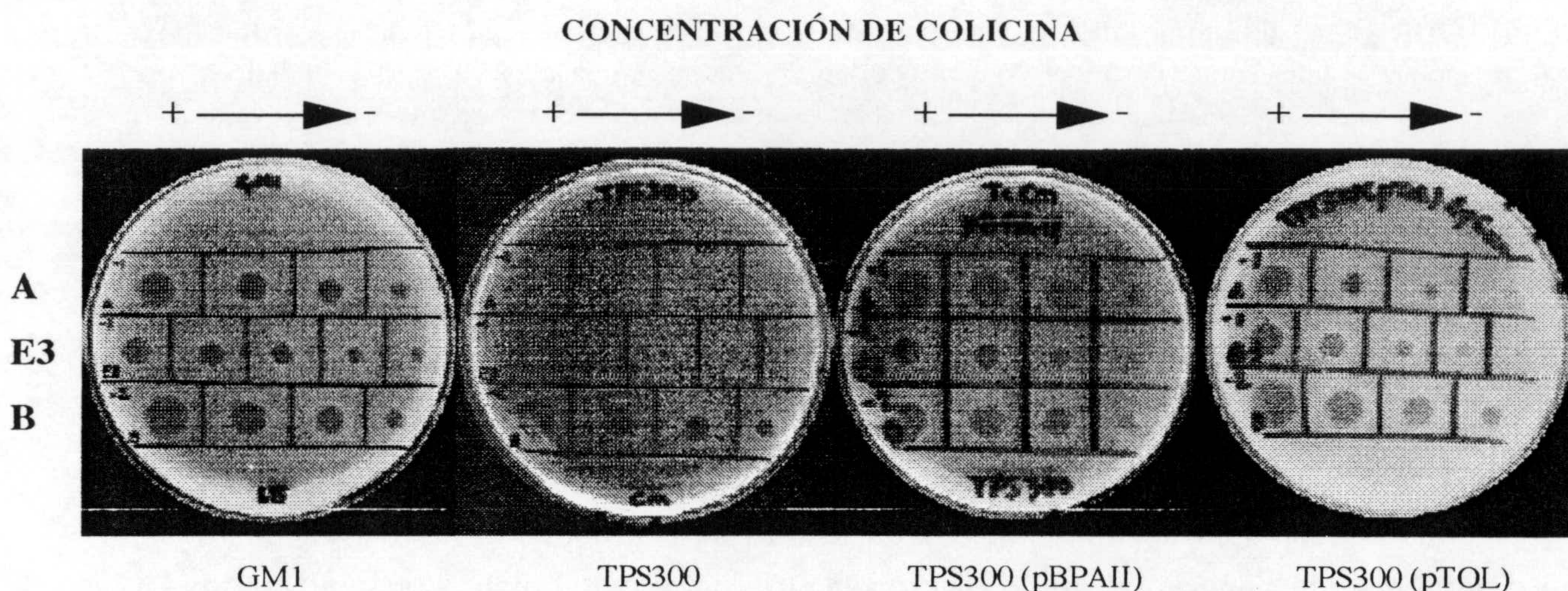
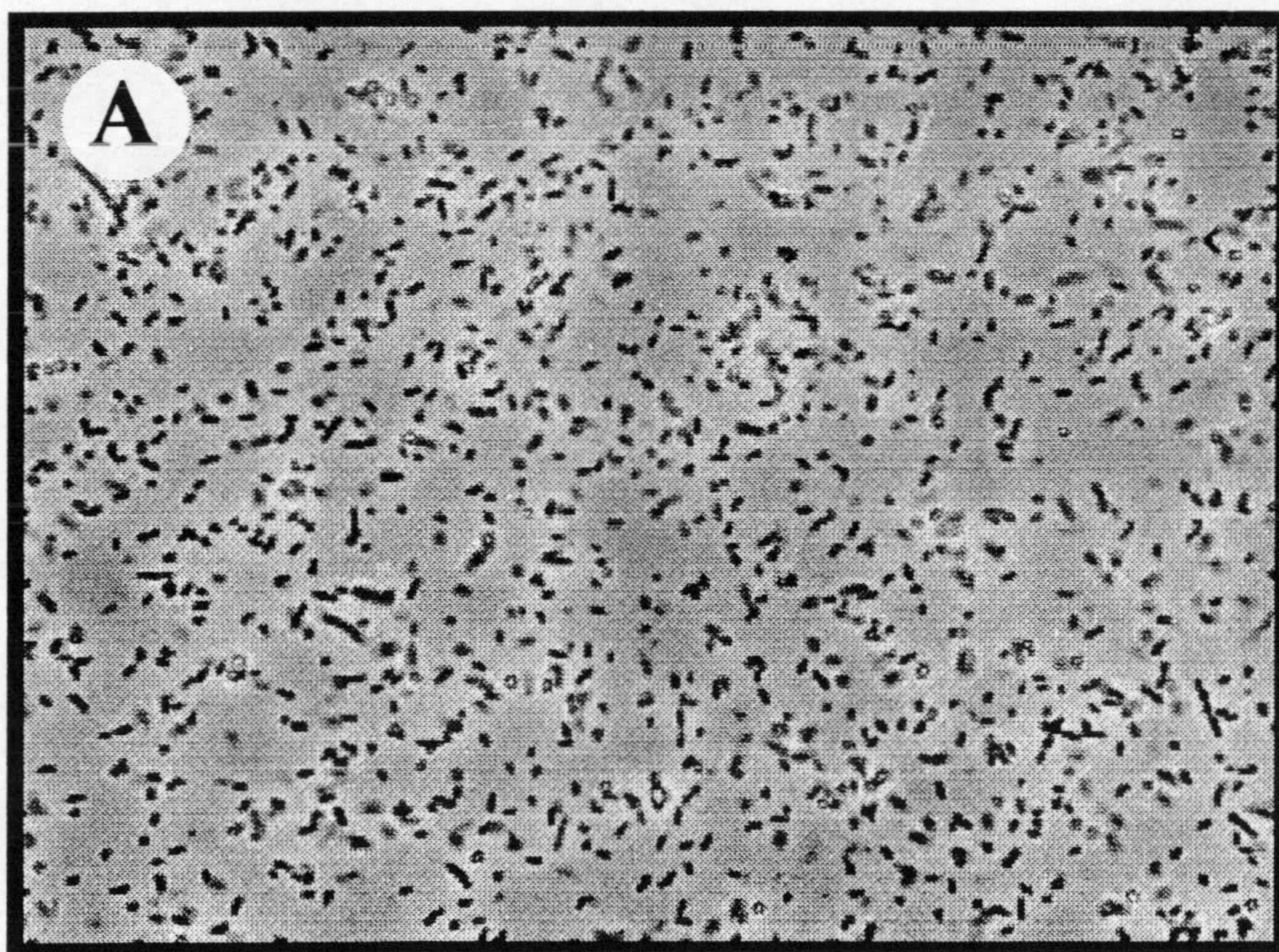


FIGURA 67. Ensayos de complementación del fenotipo de tolerancia a colicinas del mutante TPS300 (*tolR*) de *E. coli*. En cada placa se sembró un césped de las bacterias indicadas en la parte inferior de la figura, y en cada uno de los recuadros señalados, se añadió 1 μ l de distintas diluciones de las colicinas indicadas en el margen izquierdo de la figura (ver apartado 13.2 de la sección *Materiales y Métodos*). Tras 16 horas de incubación a 37°C, se determinó la presencia o ausencia de halo de inhibición del crecimiento. Como se indica en la parte superior de la figura, la solución de colicina más concentrada se situó en la parte izquierda de la placa y ésta se diluyó 1:10 en cada aplicación sucesiva. GM1, cepa parental; TPS300, cepa mutante *tolR*; TPS300 (pBPAlI), cepa transformada con los genes *tol-pal* de *E. coli*; TPS300 (pTOL), cepa transformada con los genes *tol-oprL* de *P. putida*. La colicina B, que no depende del sistema Tol para su entrada en la célula, se utilizó como control positivo de lisis celular.

Para estudiar la complementación de las mutaciones *tolA* y *tolB*, se transformaron con pTOL y con pBPAlI las cepas *E. coli* 7752 (*tolB pal*), *E. coli* 3417 (*tolB*), *E. coli* 7782 (*tolA*) y *E. coli* 8031 (*tolA tolR*) todas derivadas de *E. coli* 1292. Los clones obtenidos tras la transformación con pTOL fueron inestables, y no se pudieron cultivar en medio líquido porque mostraban una gran tendencia a perder el plásmido. Como experimento control se transformó la cepa parental 1292 con pTOL y con pUC18, y en el caso de la transformación con pTOL volvió a suceder lo mismo. Las cepas transformadas se observaron al microscopio óptico de contraste de fases. Mientras que la cepa 1292 (pUC18) presentaba un aspecto normal (Fig. 68A), las células de la cepa 1292 (pTOL) aparecían formando filamentos de longitud variable (Fig. 68B). Lo mismo sucedía, incluso algo más acentuado, con las cepas mutantes transformadas (no mostrado). Este fenómeno no ocurría con las cepas de *E. coli* derivadas de GM1, lo que indicaba que la toxicidad era específica para la cepa 1292 y sus derivadas. Como opción alternativa se decidió clonar los genes *tol-oprL* de *P. putida* en un plásmido de bajo número de copias. Se eligió el plásmido pJB3Km1 (5-7 copias/cromosoma), que codifica resistencia a

ampicilina y a kanamicina. Este plásmido se digirió con *EcoRI* y *AatII*, y se ligó con el fragmento *EcoRI-AatII* de 6,6 kb de pTOL (ver Fig. 66) que portaba los genes *tol-oprL*, dando lugar al plásmido pJBTOL. En este plásmido, los genes *tol-oprL* también se situaron, como en el caso de pTOL, corriente abajo del promotor P_{lac} . La cepa 1292 y sus derivadas mutantes se transformaron con pJBTOL y se seleccionaron como resistentes a kanamicina. El plásmido se mantuvo de forma estable en todas las cepas, aunque siguió provocando la aparición de filamentos celulares pero en un grado mucho menor que pTOL (Fig. 69).

Con estas cepas transformadas se realizaron estudios de complementación análogos a los mencionados anteriormente. Como control también se transformaron las cepas TPS300 (*tolR*) y TPS13 (*tolQ*) con el nuevo plásmido pJBTOL. Como se puede observar en la Fig. 70, no hubo complementación de ninguno de los nuevos mutantes. La mutación de la cepa TPS300 se complementó pero de forma muy débil, e incluso tras la inducción con IPTG no se alcanzaron niveles similares a los obtenidos con pTOL. En base a este último hecho no se pueden obtener conclusiones definitivas sobre la capacidad de complementación en el caso de los genes *tolA* y *tolB*, porque podría suceder que realmente no complementasen o que, aún pudiendo complementar, no se estuviesen expresando o no lo hiciesen a un nivel suficiente como para que ésta se produjese.



(continúa en la página siguiente)

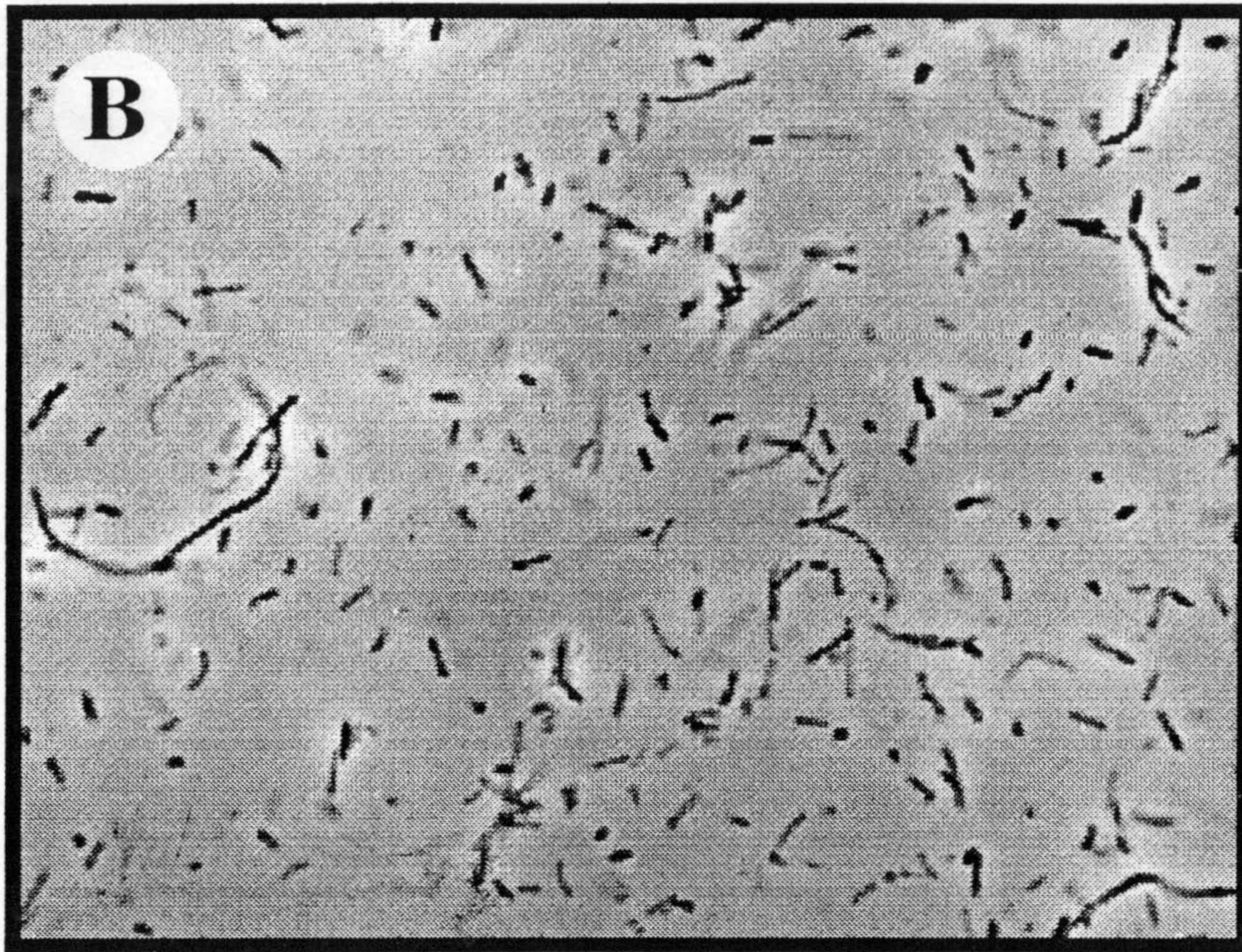


FIGURA 68. Microscopía óptica de contraste de fases de células de *E. coli* 1292 transformadas con distintos plásmidos. Células de *E. coli* 1292 (pUC18) (A) o *E. coli* 1292 (pTOL) (B) obtenidas de un cultivo en medio LB sólido suplementado con ampicilina, se resuspendieron en 15 μ l de PBS estéril y se observaron mediante microscopía de contraste de fases. Aumentos, x 640.

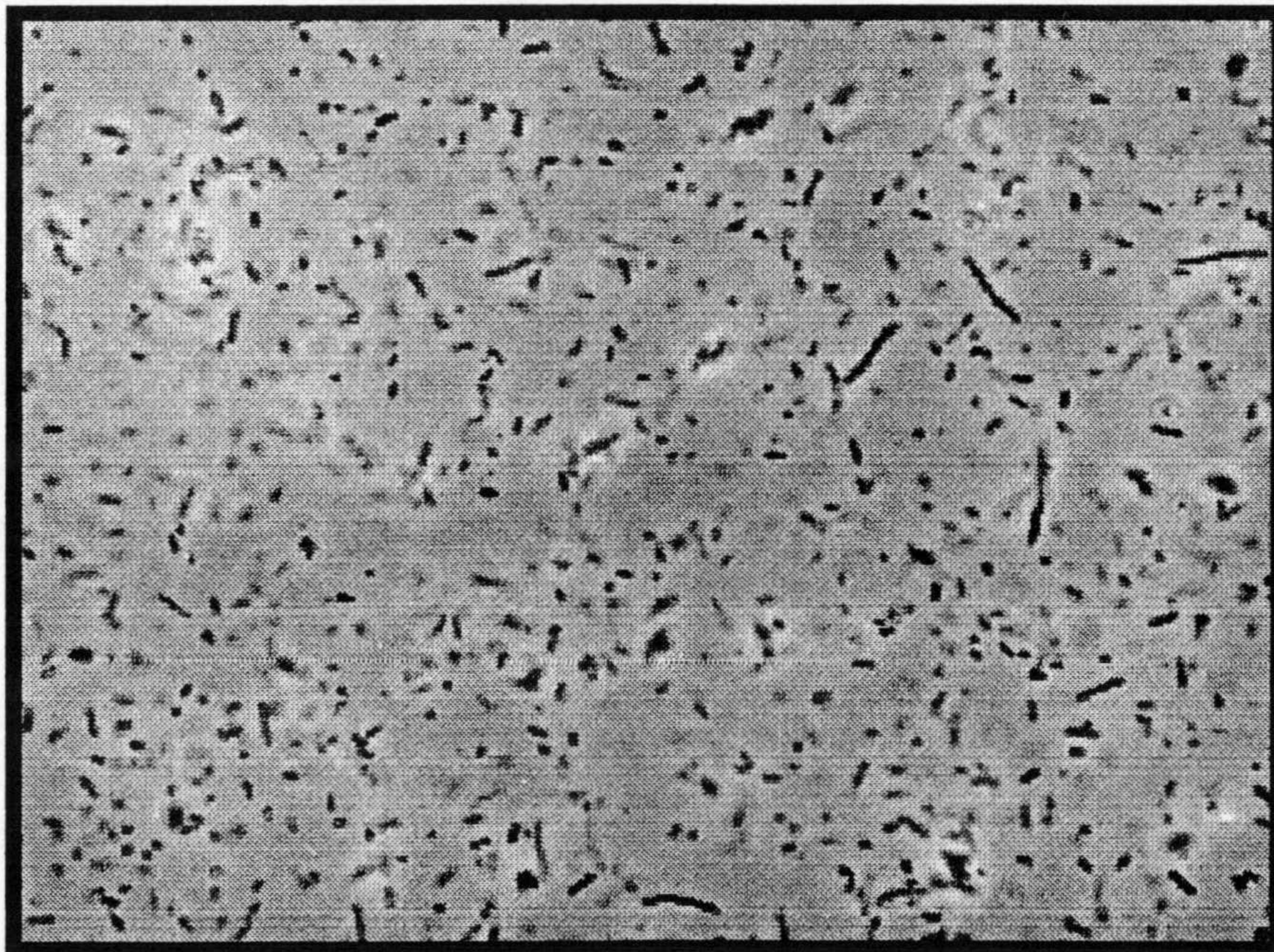
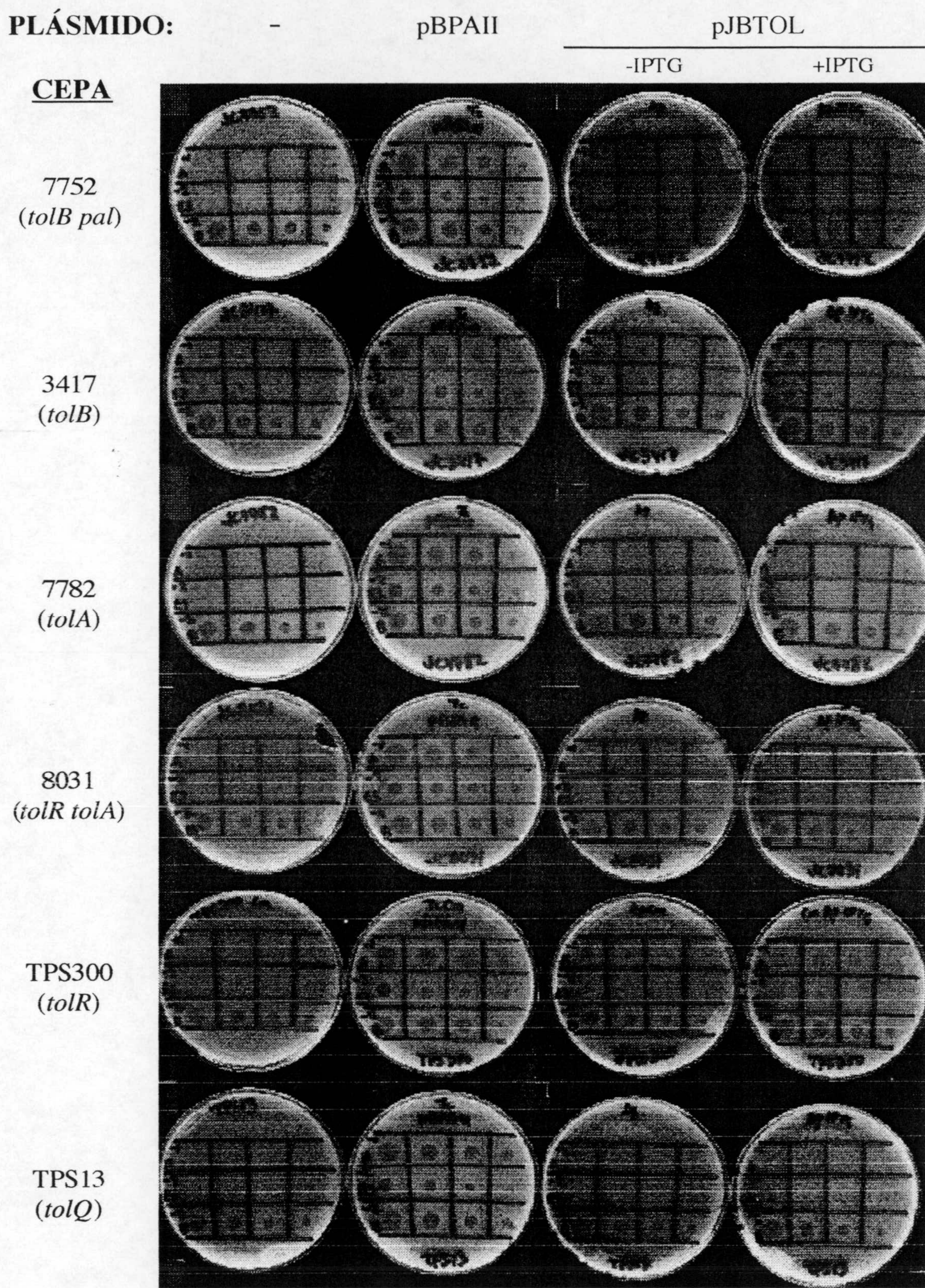
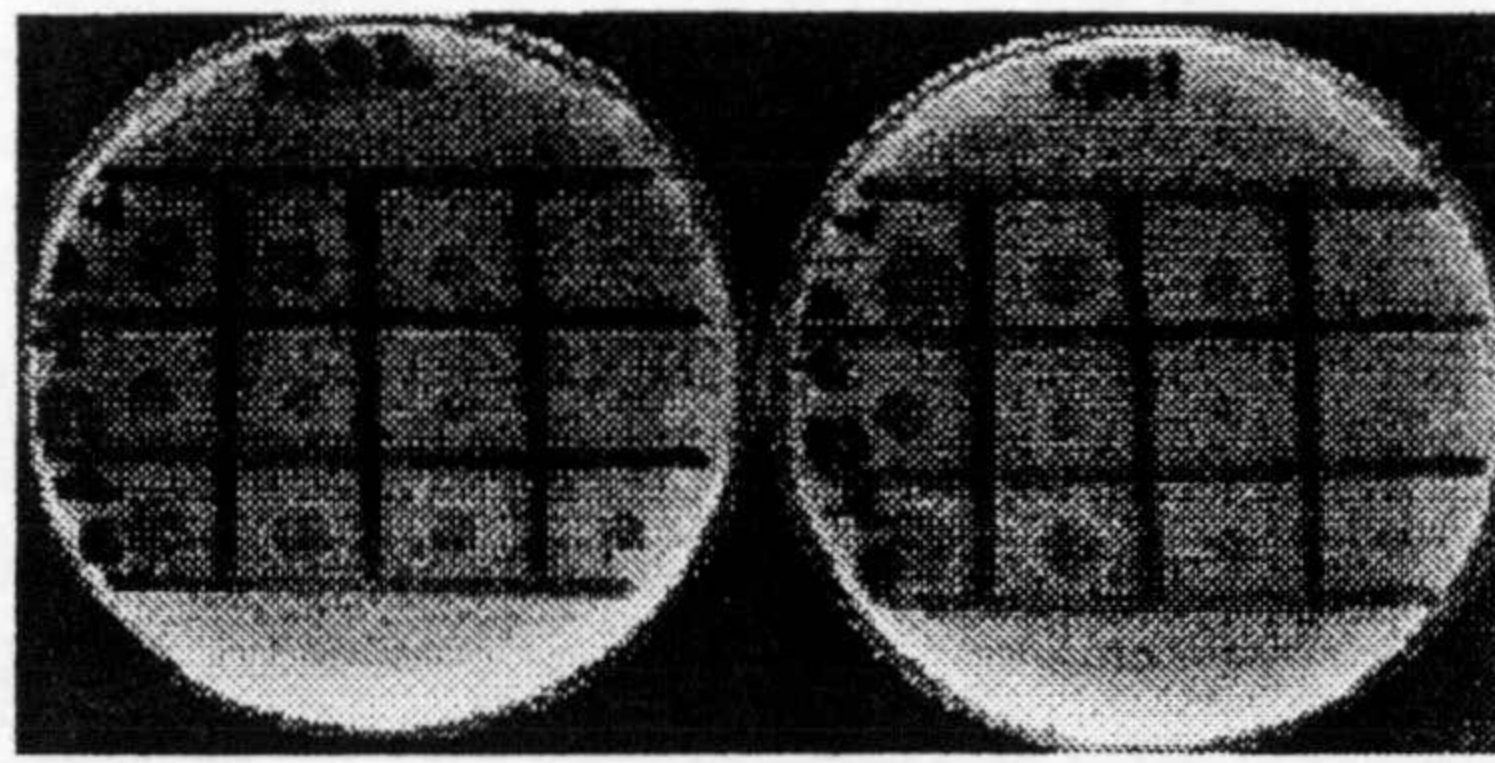


FIGURA 69. Microscopía óptica de contraste de fases de células de *E. coli* 1292 transformadas con pJBTOL. Las células se obtuvieron de un cultivo en medio LB sólido suplementado con ampicilina, se resuspendieron en 15 μ l de PBS estéril, y se observaron mediante microscopía de contraste de fases. Aumentos, x 640.



(continúa en la página siguiente)



Cepas parentales:

1292

GM1

FIGURA 70. Ensayos de complementación del fenotipo de tolerancia a colicinas de distintos mutantes *tol* de *E. coli*. La condiciones experimentales y la explicación de la figura son las mismas que las indicadas en la Fig. 67. En las placas con IPTG, éste se añadió a una concentración final de 0,1 mM. Se puede observar que el mutante *E. coli* 3417 es algo sensible a las colicinas A y E3, debido a que en dicha cepa la proteína TolB está aún presente aunque troncada. El símbolo "-" en la parte superior de la figura indica que se trata de la cepas mutantes sin transformar.

Capítulo IV

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE *wzy* DE *P. putida*. CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA MUTANTE DOBLE *wzy oprL* Y ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA EN SUELO DE LOS MUTANTES

RESUMEN

Mediante mutagénesis con el transposón mini-Tn5*luxABKm* de la cepa *Pseudomonas putida* KT2442, se obtuvo un mutante luminiscente que no fue reconocido en ELISA por el anticuerpo monoclonal 7.3B, generado contra el antígeno O del LPS de *P. putida*. La región de ADN mutada por el transposón se clonó y se secuenció, y la secuencia de aminoácidos deducida de la región interrumpida se comparó con las secuencias disponibles en las bases de datos. Dicha secuencia mostró similitud con la polimerasa del antígeno O (Wzy) de *Salmonella enterica* (*muenchen*). Posteriormente, usando como base dicho mutante *wzy* se construyó un mutante doble *wzy oprL* mediante técnicas de intercambio alélico por recombinación homóloga. Los mutantes *wzy* y *wzy oprL* se caracterizaron fisiológicamente comparándolos con la cepa silvestre y con el mutante *oprL* descrito en el *Capítulo II*. Ambos mutantes fueron más sensibles a SDS, deoxicolato, ácidos orgánicos y EDTA que la cepa parental. Además, las tres cepas mutantes mostraron una movilidad considerablemente menor que la de la cepa silvestre. En observaciones al microscopio electrónico, la membrana externa del mutante *wzy* mostró numerosas ondulaciones mientras que la del mutante doble presentó un aspecto similar a la del mutante *oprL*. Por otro lado, se estudió la capacidad de colonización del suelo por parte de la cepa silvestre y de los distintos mutantes. La cepa mutante doble se estableció en el suelo con menor eficiencia que la cepa parental y que los mutantes sencillos, en particular en condiciones ambientales de alta temperatura. También se analizó la capacidad de adherencia de las distintas cepas mutantes a semillas de maíz, que fue en todos los casos similar a la de la cepa silvestre.

1. AISLAMIENTO DE UN MUTANTE LPS Y CONSTRUCCIÓN UN MUTANTE *oprL* ISOGÉNICO DE ÉSTE

1.1. Aislamiento de un mutante de *P. putida* KT2442 afectado en el LPS

Este experimento se realizó en colaboración con la doctora Daniela Reniero. La cepa *P. putida* KT2442, un mutante espontáneo resistente a rifampicina derivado de *P. putida* KT2440, se mutagenizó con el transposón mini-Tn5luxABKm como se describió en el apartado 10.1 de la sección *Materiales y Métodos*. Los transconjugantes resistentes a kanamicina de *P. putida* KT2442 aparecieron con una frecuencia aproximada de 5×10^{-6} por receptor. Alrededor del 25% de dichos transconjugantes fueron luminiscentes (Lux⁺) tras exponerlos a *n*-decil aldehído en medio LB. Para identificar los mutantes que carecían de la cadena lateral O del LPS, la fracción de mutantes Lux⁺ se analizó mediante ELISA usando el anticuerpo 7.3B (Ramos-González *et al.*, 1992), que reconoce el antígeno O de esta cepa. Sólo se encontró un clon, denominado *P. putida* DOT-OX3, entre más de 1.500 analizados, que no fue reconocido por dicho anticuerpo. El análisis electroforético de los LPS confirmó que esta cepa, en contraste con la parental, no producía LPS con cadena lateral O, según se dedujo de la ausencia del patrón de bandas escalonado característico de la cadena lateral O del LPS (Fig. 71). Mediante análisis de hibridación de ADN, usando el gen de resistencia a kanamicina de Tn5 como sonda frente al cromosoma de la cepa mutante, se confirmó que el minitransposón estaba presente en dicha cepa en una sola copia (no mostrado).

1.2. Construcción de un mutante *oprL* de *P. putida* DOT-OX3

Para estudiar el efecto que la acumulación de mutaciones en estructuras de la envoltura celular tenía sobre el fenotipo de *P. putida*, se decidió construir un mutante *oprL* isogénico de la cepa *P. putida* DOT-OX3, que se denominó *P. putida* DOT-OX5. Para ello, se utilizaron las mismas herramientas y se siguió la misma estrategia que en el caso de los mutantes PX y T1PX (ver *Capítulo II*). El correcto reemplazamiento del gen *oprL* por el casete *oprL::xylE* se comprobó mediante hibridaciones de ADN y por PCR (no mostrado), como se explicó anteriormente (apartado 1 del *Capítulo II*). Además, se analizó la presencia/ausencia de proteína OprL en el mutante *P. putida* DOT-OX5 mediante ensayos de inmunodetección (no mostrados) en extractos celulares totales de distintas cepas, usando el anticuerpo monoclonal MA1-6. Dichos análisis mostraron que en la cepa *P. putida* DOT-OX3 la cantidad de OprL producida era equivalente a la de la cepa parental, mientras que dicha proteína fue indetectable en el caso de la cepa DOT-OX5. Tras el análisis de los LPS de *P. putida* DOT-OX5 por electroforesis y posterior tinción con nitrato de plata, éstos presentaron, como era de esperar, el mismo aspecto que los de la cepa *P. putida* DOT-OX3, esto es, tampoco mostraron el patrón de bandas de alto peso molecular característico de la cepa silvestre (Fig. 71). Como control,

también se analizaron los LPS de un derivado, resistente espontáneo a rifampicina, de la cepa *P. putida* PX, denominado *P. putida* PX-Rif. Los LPS de esta cepa mostraron un aspecto idéntico a los de la cepa *P. putida* KT2442 (Fig. 71). Por último, para cerciorarnos de que la proteína OprL se expresaba con normalidad en la cepa *P. putida* DOT-OX3, OprL se detectó inmunológicamente en preparaciones de proteína celular total de esta cepa, y los resultados fueron similares a los de la cepa parental (no mostrado).

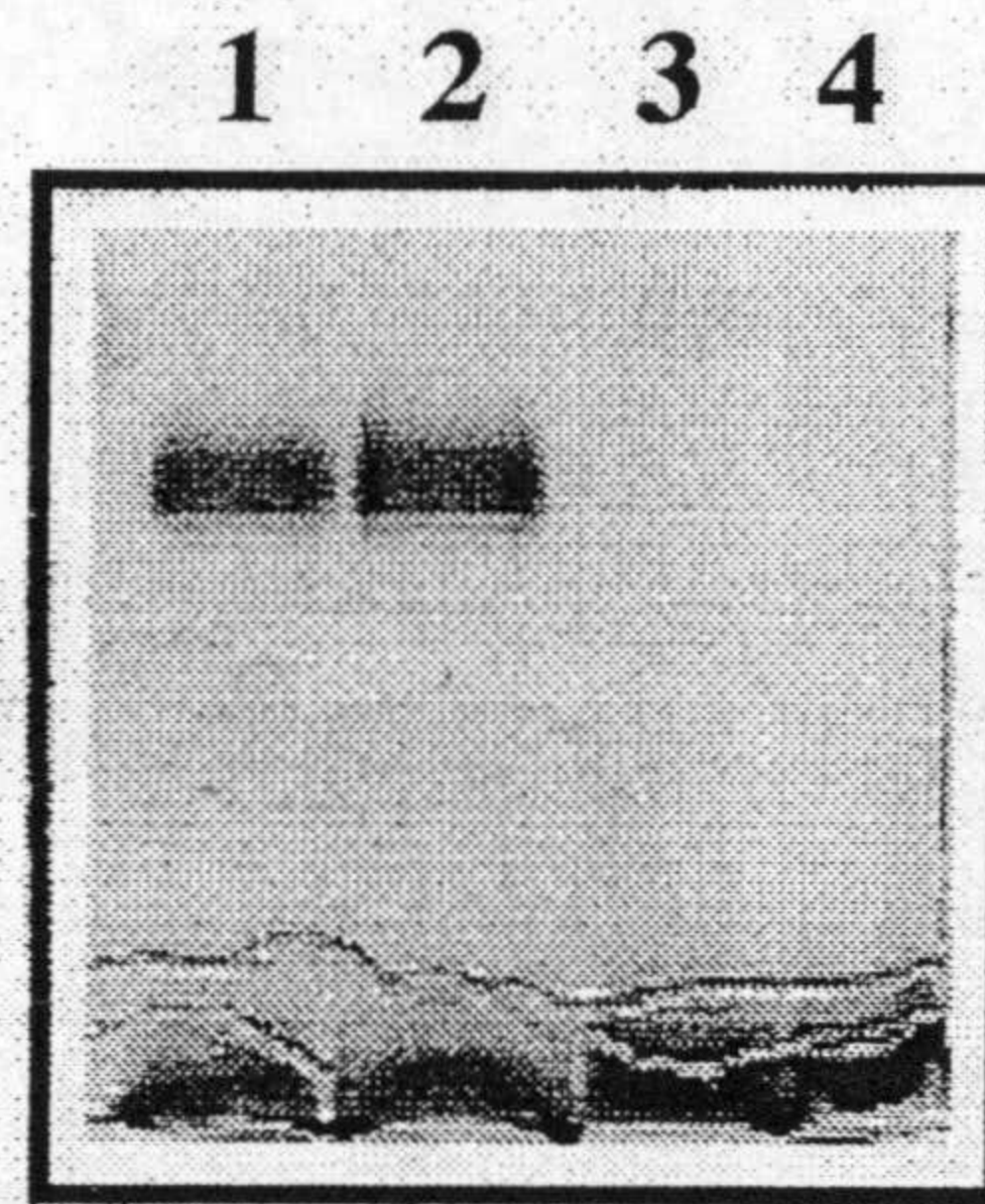
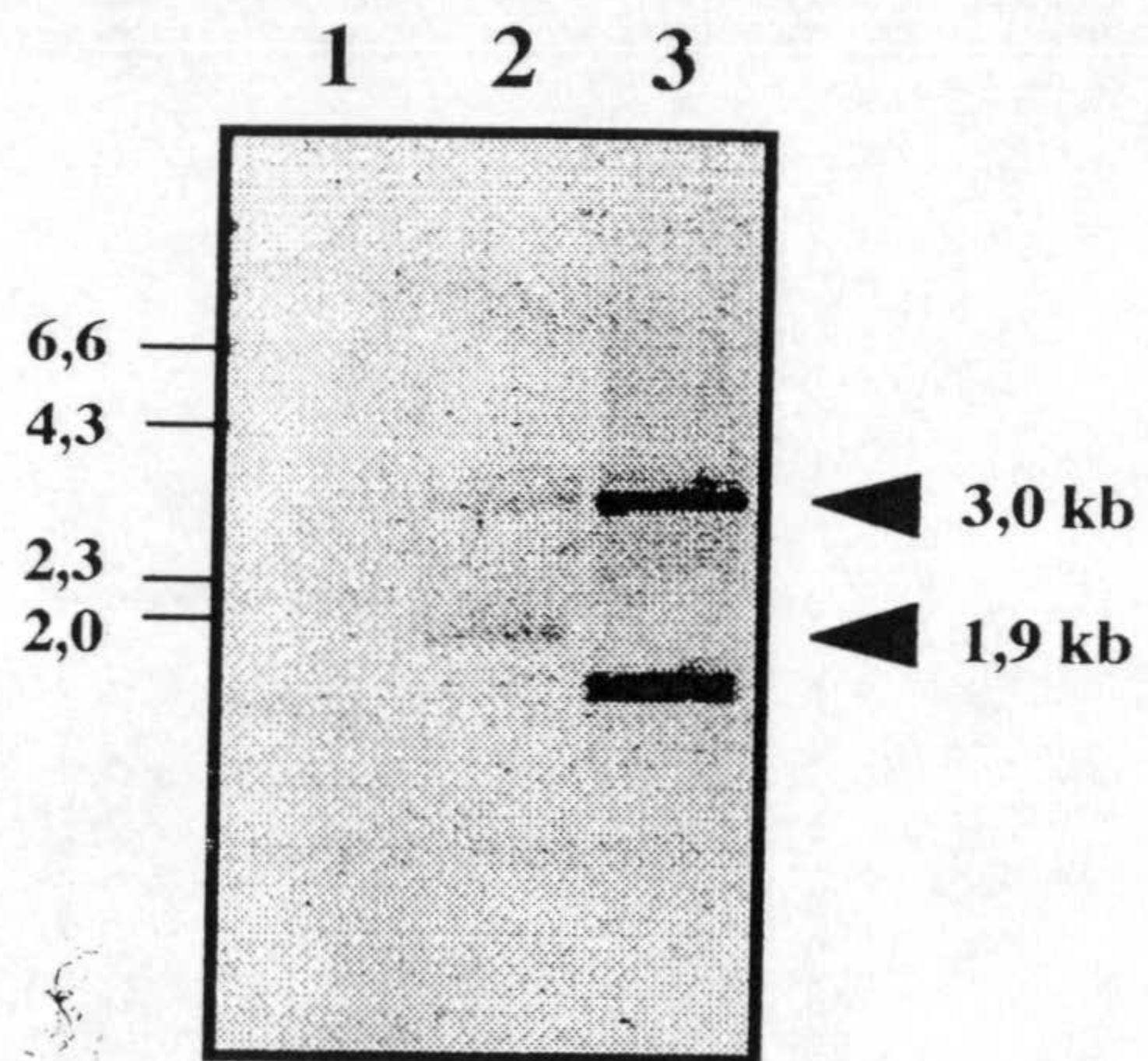


FIGURA 71. Análisis de la fracción de LPS de las cepas analizadas en este estudio. Las células se cultivaron en medio LB hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Entonces, se recogieron por centrifugación y se prepararon las muestras de LPS, que se separaron mediante EGPA-SDS y se visualizaron por tinción de plata, como se describió en el apartado 18 de la sección *Materiales y Métodos*. Calle 1, *P. putida* KT2442. Calle 2, *P. putida* PX-Rif (mutante *oprL*). Calle 3, *P. putida* DOT-OX3 (mutante LPS). Calle 4, *P. putida* DOT-OX5 (mutante doble).

2. CLONACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL GEN MUTADO EN LA CEPA *P. putida* DOT-OX3

Los pasos seguidos para la clonación de la región de ADN interrumpida por el mini-Tn5*luxABKm* en *P. putida* DOT-OX3, se detallan en la Fig. 72. La región de ADN correspondiente al inserto de 1,05 kb de pD5KP se secuenció y se analizó la presencia de posibles regiones codificantes truncadas. El hecho de que *P. putida* DOT-OX3 mostrase un fenotipo Lux⁺ implicaba que la región de ADN interrumpida por el minitransposón debía transcribirse en el mismo sentido que los genes '*luxAB*'. El análisis de la secuencia de ADN reveló la presencia de una fase de lectura abierta de 766 pb truncada en el extremo 5', adyacente al extremo I del mini-Tn5 y en el sentido de la transcripción

A



B

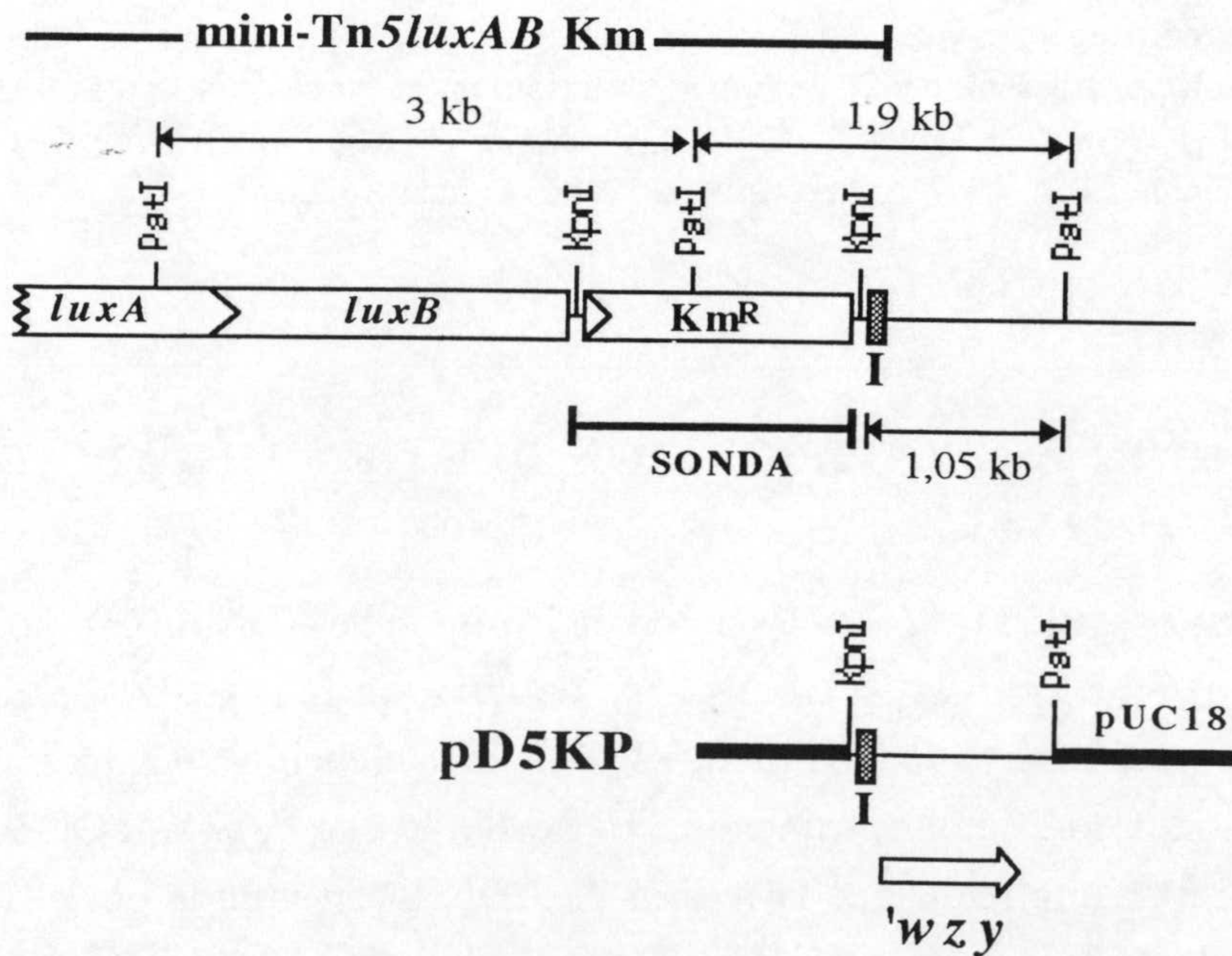


FIGURA 72. Análisis por hibridación de la región de ADN mutada en *P. putida* DOT-OX3, y esquema de la estrategia usada para su clonación. (A) El ADN total aislado de las cepas *P. putida* KT2442 (calle 1), *P. putida* DOT-OX3 (calle 2) y el ADN del plásmido pCK220 (calle 3), se digirieron con *Pst*I y se analizaron por hibridación usando como sonda el fragmento *Kpn*I de 1,35 kb del plásmido pCK220, que porta el gen de resistencia a kanamicina de Tn5 y que posee un sitio *Pst*I interno (ver Fig. 72B). La sonda hibridó con un fragmento de 3 kb (calles 2 y 3), correspondiente a un fragmento *Pst*I interno del mini-Tn5*luxABK*m, y con un fragmento de 1,9 kb (calle 2) (ambos se indican con flechas en la figura). El fragmento de 1,9 kb incluía 0,85 kb del gen de resistencia a kanamicina y 1,05 kb del ADN de *P. putida* DOT-OX3 adyacente al minitransposón. En el margen izquierdo se indica el patrón de peso molecular en kilobases. (B) Mapa de restricción de la región cromosómica de *P. putida* DOT-OX3 adyacente al extremo I del minitransposón, deducido de la hibridación anterior. Para clonar el gen interrumpido por el mini-Tn5, el ADN total de *P. putida* DOT-OX3 se digirió parcialmente con *Pst*I, se ligó con pUC18 cortado con el mismo enzima, y la mezcla de ligación se transformó en la cepa *E. coli* DH5 α . Tras la selección en medio LB sólido suplementado con ampicilina y kanamicina se obtuvieron 5 clones. Los plásmidos portados por dichos clones se aislaron y se digirieron con *Pst*I, y se observó que todos ellos compartían un fragmento de 1,9 kb y otro de 3 kb (indicados sobre el mapa de la figura). Uno de estos plásmidos, denominado pD5 (no mostrado), se seleccionó para estudios posteriores. Al digerir este plásmido con *Kpn*I y *Pst*I, se obtuvo, entre otros, un fragmento de 1,05 kb, que se subclonó en pUC18 (indicado por la línea negra más gruesa) dando lugar al plásmido pD5KP. La flecha situada en la parte inferior del mapa del plásmido pD5KP indica la localización del gen mutado y su sentido de transcripción.

esperado (Fig. 72B). Posteriormente, usando el oligonucleótido LuxAB-U (5'-CTTTCAAGCGACGTTTCATTCA-3') que hibridaba con la región situada corriente arriba del gen *luxA*, se secuenciaron aproximadamente 500 pb corriente arriba del extremo O del mini-Tn5. La fase de lectura abierta resultante (1.176 pb) codificaba un polipéptido de 391 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 43.081 Da (Fig. 73). Cuando éste se comparó con las secuencias existentes en las distintas bases de datos, presentó similitud con una proteína hipotética denominada Ttn (n° de acceso a GenBank: AF106001) de la cepa tolerante a tolueno *P. putida* GM73, y con la proteína Wzy de *Salmonella enterica* serovariedad muenchen (Brown *et al.*, 1992). El gen *ttn* de *P. putida* GM73 está situado adyacente a un supuesto gen (*ttg8*) de función desconocida, supuestamente implicado en la tolerancia a tolueno (Kim *et al.*, 1998). Si se corrige la secuencia publicada del gen *ttn*, mediante la inserción de 1 base (probablemente existe un error en la secuenciación), éste codificaría una nueva proteína de tamaño idéntico a la supuesta proteína de *P. putida* KT2440. La comparación de secuencias mostró una identidad con esta "nueva proteína" Ttn del 86,4% y un porcentaje de similitud del 93,3%. En el caso de la proteína Wzy de *S. enterica* (muenchen), la identidad entre ambas fue del 17,2% (en 407 aminoácidos solapantes) y el porcentaje de similitud del 39,3% (Fig. 74). La proteína Wzy (anteriormente Rfc) es la polimerasa del antígeno O, la enzima responsable de la formación de la cadena lateral O por unión sucesiva de las unidades

ATCGGGGGAAAGGATGTTGTATCAAAAAAAGCTGGGCACAAGCGTGGTTAGGTTTGGGCCTGGTCTGGTTC
M L Y Q K N W A Q A W L G L G L V W F
CTGGCGGCGATTGCCCTGGCACCCAGCAACAAGGTTTATCAGCAAGGTCTGGTGTGTTCTTGTGGCTGC
L A A I A L A P S N K V Y Q Q G L V L F L W L
CAACGCTGGTATTGGCCTGGTCGGCCCGAGGTGTGCTGGTGCAAGCCTGGAGGCGGCAACCGGCGCTGTG
P T L V L A W S A R G V L V Q A W R R Q P A L W
GGGGAGTGTGCTGCTGCTGTTGGCCTGGAGCGGGCTGAGCCTGGCATGGTCGCCC GCCGAGGAGCCCATG
G S V L L L L A W S G L S L A W S P A E E P M
CGCGAGCTCAAGCGCTTGCTCTACATCCTGGTGTTCCTGCTGGCGTTCCTCGCTGTTGGCCCAGCTTGGCC
R E L K R L L Y I L V F L L A F P L L A Q L G
AAGCCCGCATTCGTCAGTTATTGCTGCTTGGCAGCGCGCTGCTGGCCATCGCTGCGTTGGTCTCCATCAT
Q A R I R Q L L L L G S A L L A I A A L V S I I
CAAGTTCTATGGGGTGCAGCGTGC GCCTTTGCTGTT CAGGCTGGCGGGTATCGGCGAGATATCCCACCCC
K F Y G V Q R A P L L F R L A G I G E I S H P
ATCCTGGGGGCTTATGTCATTGGTTCGGCCTTGCTCTTGATGCTCTACGAGCCACCTCGGCGACGTGGCT
I L G A Y V I G S A L L L M L Y E P P R R R G
TGCAGTTGTTGTGGCTGGCGGCACTGGCTTGCCTGGGGGCCTTCGCCATGCTCAGCCAGAGCCGTGGTGC
L Q L L W L A A L A C L G A F A M L S Q S R G A
GGTCTGGCACTGGTGATTACCGTGGTGATGGCGCCGTTGTGGTTCGTTGACCGCCACAGCCGGGTGTTTC
V L A L V I T V V M A P L W F R D R H S R V F
TCTGTTCTGGCTCTGCTTGGCACC GGCCCTGGCCTTTTTGGCCGTGTACGACGTTATCGCCCAACGGGGCT
S V L A L L A T G L A F L A V Y D V I A Q R G
CGTCCTACCGGCCGAAATTTTCCATGCCGTGGTTCAGATGATTGCCGCGCACCCCTTGGACTGGTCTTGG
S S Y R P E I F H A V V Q M I A A H P W T G L G
CCTGGGGGCTGATTACGAGGTGAGCGCCGTCGGCATGCACTTCGATCACACCCACAACATGTTACCCAT
L G A D Y E V S A V G M H F D H T H N M F T H
GTTGCCGTTGAGATGGGCTTGCCCGGCATGTTGCTGTGGGTAATGGTGTGGCTGTTACGCTGGGCGAAA
V A V E M G L P G M L L W V M V W L F T L G E
TCGTGCGCGCCCGCGGCACCCTGTTCCGCAAGGTCCTGCTGGGCTTCTGGGTCTACTCGACCCTGGCCAT
I V R A R G T L F G K V L L G F W V Y S T L A M
GCAGTTCGATGCCGCCAGCCTCACCGGTACGCCACGTGCCGAATGGTTCATCAGCTGGCTGCCGGTGGGC
Q F D A A S L T G T P R A E W F I S W L P V G
CTTGCCATGTTGCTGCCATGGGGGCGTGCCGAAAATGACGCCTGTGGTAAAATTGCCGGTTCAACCTGA
L A M L L P W G R A E N D A C G K I A G S T ***

FIGURA 73. Secuencia de la región de ADN donde se insertó el transposón mini-Tn5luxABKm en *P. putida* DOT-OX3 y traducción de la misma. Se muestra la secuencia de ADN del supuesto gen *wzy* de *P. putida*, junto con su secuencia de aminoácidos correspondiente (cada aminoácido se indica debajo de la base central del codón que lo codifica). Aunque existía otro posible codón iniciador 33 pb corriente arriba (no mostrado), se eligió el mostrado, por homología con las proteínas Ttn de *P. putida* GM73 y Wzy de *S. enterica* (muenchen). La inserción del transposón mini-Tn5luxABKm se produjo en medio de las dos bases que están subrayadas. El símbolo "***" indica el codón de terminación. El número de acceso para esta secuencia en la base de datos GenBank es AF109736.

repetidas que la componen, dando lugar a la formación de los típicos S-LPS ("*smooth* LPS"). Las polimerasas del antígeno O son proteínas muy hidrofóbicas, con 10 o más segmentos transmembrana potenciales, lo que sugiere que son proteínas integrales de la membrana. Se ha predicho que la proteína Wzy de *S. enterica* (muenchen) posee 11 segmentos transmembrana. La supuesta proteína Wzy de *P. putida* también fue muy hidrofóbica, según se dedujo de su perfil de hidropatía (Fig. 75). Éste, además, fue similar a los perfiles de hidrofobicidad de otras proteínas Wzy, especialmente al de la mitad carboxilo terminal de la proteína Wzy de *S. enterica* (muenchen) (Fig. 75), lo que indicaba la existencia de similitud estructural entre ambas. El programa TMpred predijo la existencia de 12 hélices α transmembrana en Wzy de *P. putida* (posiciones 10-27, 31-49, 63-81, 94-112, 119-141, 159-175, 182-201, 202-221, 228-245, 304-324, 330-348, 361-377) (Fig. 75). Por otro lado, la secuencia del gen *wzy* de *P. putida* presentó un porcentaje de G+C del 61,6%, cercano al porcentaje medio para el ADN de *P. putida* (60%). El uso de codones en dicho gen también fue similar al descrito para esta especie. Con relación a la composición de aminoácidos, la proteína Wzy era rica en aminoácidos hidrofóbicos, especialmente en alanina, leucina y valina, que sumaban el 40,4% del total.

3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES *P. putida* DOT-OX3 y *P. putida* DOT-OX5

3.1. Caracterización fisiológica

En primer lugar, se analizó el grado de resistencia/sensibilidad de las cepas *P. putida* DOT-OX3 (*wzy*) y *P. putida* DOT-OX5 (*wzy oprL*) a los compuestos SDS, EDTA y deoxicolato (DOC), y se comparó con el de las cepas *P. putida* KT2442 y *P. putida* PX-Rif (*oprL*), como se describió en el apartado 13.3 de la sección *Materiales y Métodos*. Los resultados obtenidos mostraron que ambas cepas eran más sensibles que la cepa silvestre a los compuestos mencionados. Además, en todos los casos la cepa mutante doble fue ligeramente más sensible que las cepas portadoras de las mutaciones

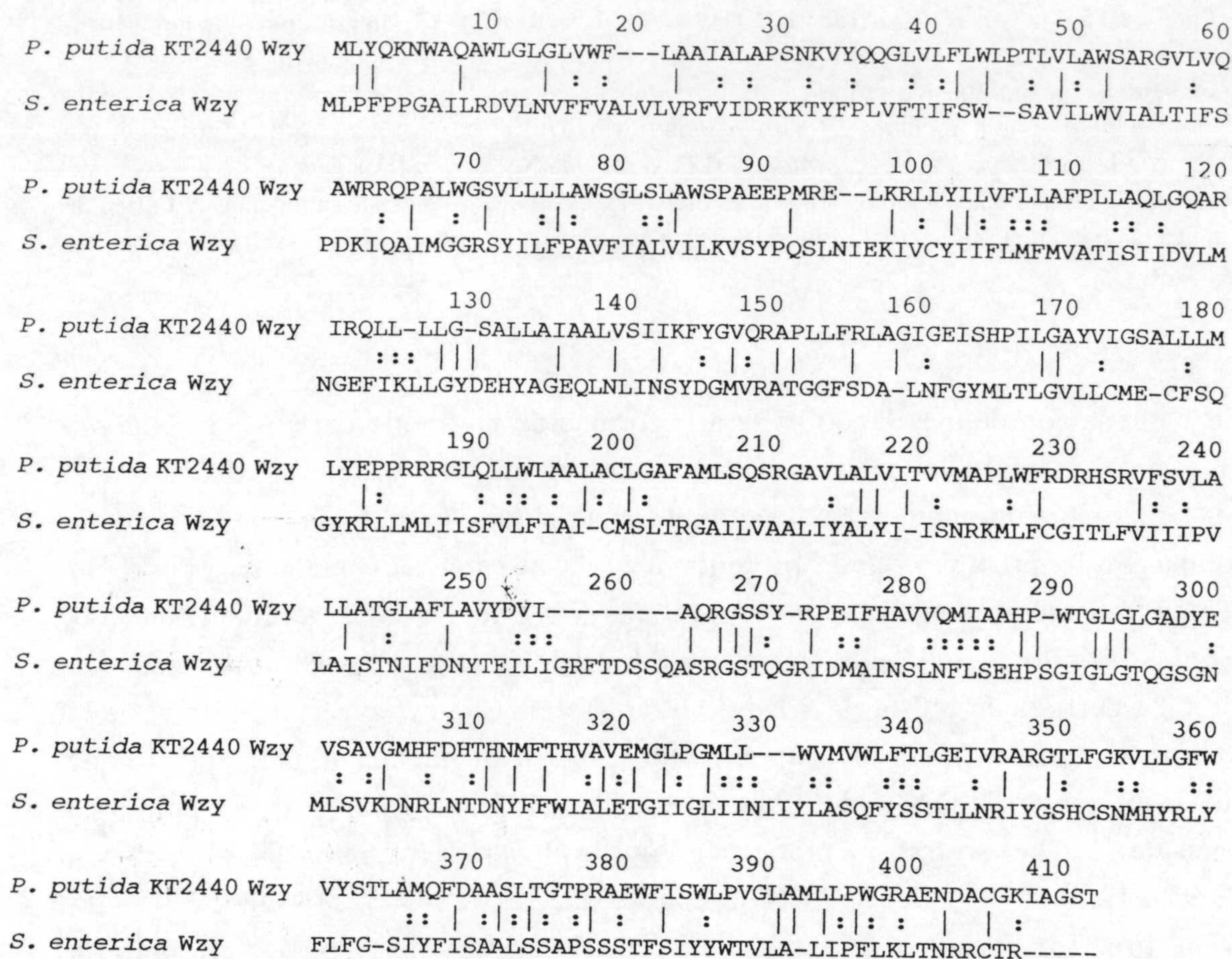


FIGURA 74. Alineamiento de Wzy de *P. putida* con la proteína Wzy de *S. enterica* sv. muenchen. Se presenta el alineamiento generado por el programa ClustalW (ver sección *Materiales y Métodos*). Los aminoácidos conservados en ambas secuencias están unidos entre sí a través de una línea vertical, y los similares a través de dos puntos. La longitud de la proteína Wzy de *S. enterica* (muenchen) es de 399 aminoácidos (Brown *et al.*, 1992), y su número de acceso a la base de datos es Q00474.

sencillas. En concreto, mientras que el SDS inhibió el crecimiento de la cepa silvestre a una concentración del 2,8% (p/v), el crecimiento de los mutantes *oprL*, *wzy*, y *wzy oprL*, se inhibió a concentraciones del 1,9, 1,7, y 1,4% (p/v) de SDS, respectivamente. La sensibilidad a DOC fue bastante similar entre las cepas mutantes. Así, en contraste con la cepa silvestre que toleraba más de 200 mM de DOC, concentraciones tan bajas como 10-25 mM inhibieron el crecimiento de los mutantes. En cuanto al comportamiento frente al EDTA, el crecimiento de la cepa parental se inhibió con 1,9 mM de este compuesto, el crecimiento de los mutantes *oprL*, *wzy*, y *wzy oprL*, se inhibió a concentraciones del 1,5, 1,6, y 1,2 mM de EDTA, respectivamente.

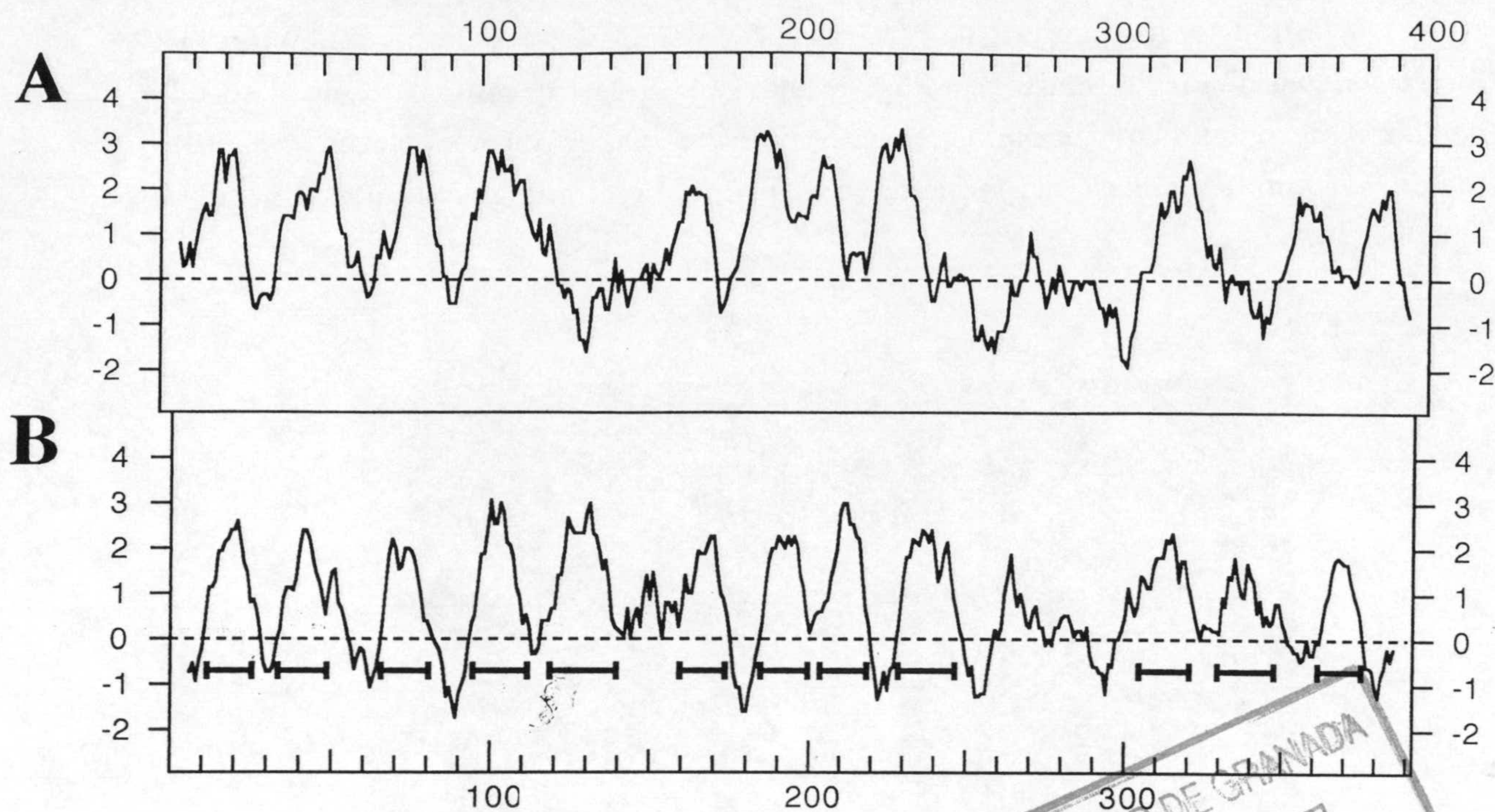


FIGURA 75. Comparación de los perfiles de hidropatía de las proteínas Wzy de *S. enterica* (muenchen) y Wzy de *P. putida*. Los perfiles de hidrofobicidad se generaron siguiendo el método de Kyte y Doolittle (1982). En los ejes horizontales se indica la posición de los restos de aminoácidos correspondientes a cada proteína. En el eje vertical se indica la hidrofobicidad relativa. Los valores positivos indican hidrofobicidad y los negativos hidrofiliidad. Las barras horizontales indican la localización de los 12 segmentos transmembrana predichos por el programa TMpred para Wzy de *P. putida*. (A) Wzy de *S. enterica* (muenchen). (B) Wzy de *P. putida*.

Por otra parte, *P. putida* es capaz de usar el ácido benzoico como única fuente de carbono, y tolera concentraciones de hasta 65 mM de este compuesto en medio sólido LB. Ninguno de los mutantes sencillos toleró en las mismas condiciones concentraciones superiores a 50 mM. El mutante doble fue aún más sensible a este compuesto, siendo incapaz de crecer en placas de LB suplementadas con 30 mM de ácido benzoico.

El patrón de resistencia/sensibilidad a antibióticos fue similar en todos los mutantes, que fueron más sensibles que la cepa silvestre a los antibióticos ácido nalidíxico, piperacilina, tetraciclina y estreptomina (sirva de referencia la Fig. 38 del Capítulo II), pero el crecimiento de las cepas mutantes, al igual que el de la parental, no se inhibió con los antibióticos ampicilina, cloramfenicol, eritromicina y vancomicina, a las concentraciones suministradas en los discos.

Por último, se analizó la capacidad de las cepa silvestre y de los mutantes para migrar a través de medio semisólido (Fig. 76). La cepa silvestre formó halos de 30 ± 3 mm de diámetro, mientras que el diámetro de los halos formados por los mutantes sencillos fue de 4 ± 1 mm. En el caso del mutante *wzy oprL*, el crecimiento se limitó al punto de inoculación.

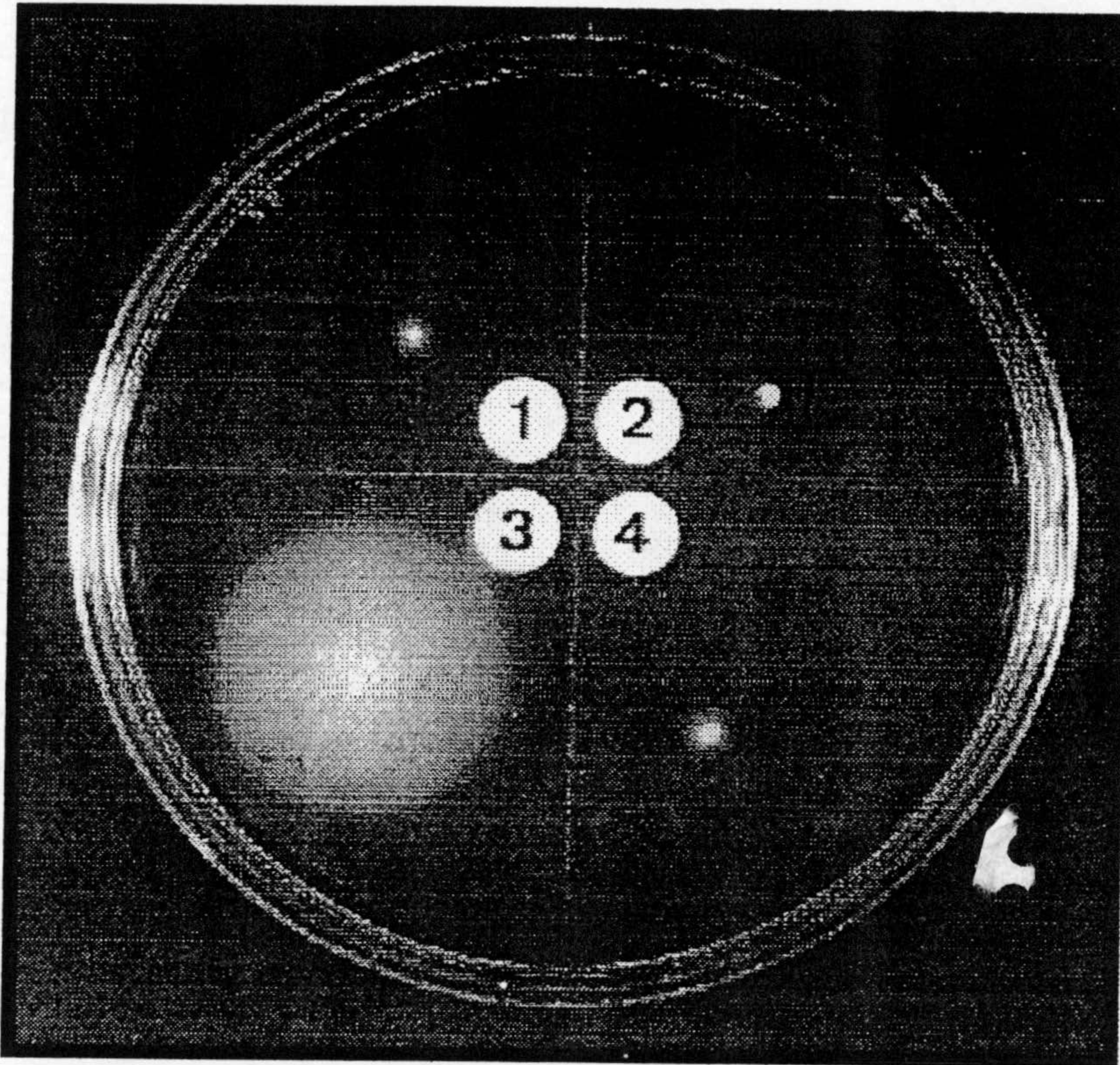


FIGURA 76. Ensayos de movilidad bacteriana sobre medio LB semisólido. Tras la inoculación de cada cepa en un punto de la placa (ver apartado 12 de la sección *Materiales y Métodos*), ésta se incubó 16 horas a 30°C . (1) *P. putida* PX-Rif (mutante *oprL*), (2) *P. putida* DOT-OX5 (mutante *wzy oprL*), (3) *P. putida* KT2442 (cepa silvestre) y (4) *P. putida* DOT-OX3 (mutante *wzy*).

3.2. Observación de la cepa silvestre y de las cepas mutantes DOT-OX3 y DOT-OX5 al microscopio electrónico de transmisión

En el apartado 3.3 del *Capítulo II* ya se mostró como el mutante *P. putida* PX (*oprL*) presentaba al microscopio electrónico de transmisión una morfología deformada (Fig. 42). Cuando se observó al microscopio, la cepa mutante *wzy*, en contraste con la cepa silvestre (Fig. 77A), presentó una membrana externa muy ondulada y separada de su estructura subyacente en la envoltura celular (Fig. 77B). El mutante doble *wzy oprL*

(Fig. 77C y D) mostró como el *oprL*, una morfología alterada, pero además presentó numerosas evaginaciones en la membrana externa a modo de pequeñas burbujas, junto con abundantes restos celulares debidos probablemente a fenómenos de lisis celular.

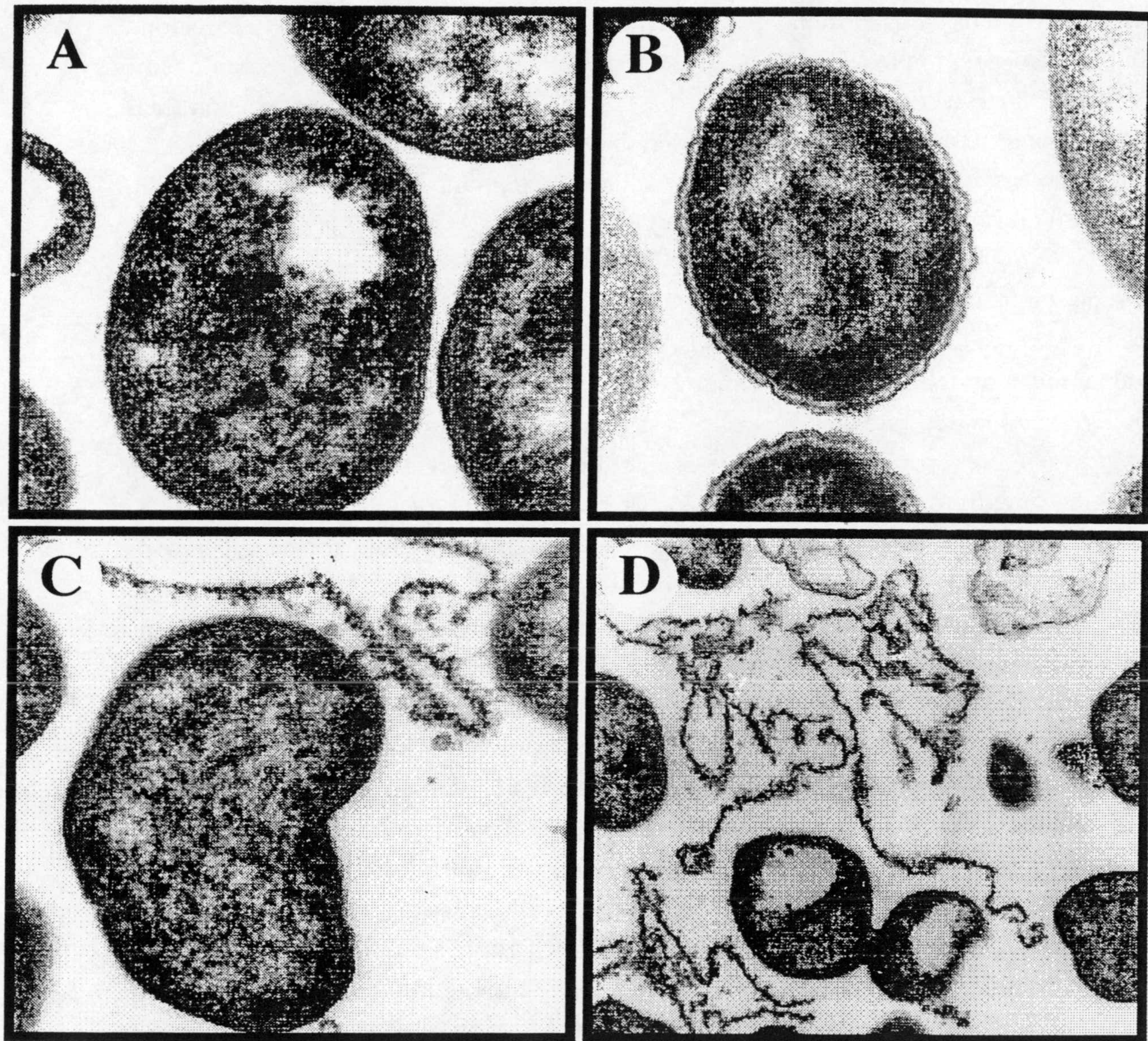


FIGURA 77. Microscopía electrónica de transmisión de células de *P. putida* KT2442, DOT-OX3 y DOT-OX5. Las células se cultivaron en medio LB líquido y se recogieron al final de la fase exponencial. Después, las muestras se prepararon como se indicó en el apartado 8.2 de la sección *Materiales y Métodos*, y se observaron al microscopio electrónico de transmisión. (A) *P. putida* KT2442 (cepa silvestre), x 63.000. (B) *P. putida* DOT-OX3 (mutante *wzy*), x 63.000. (C) *P. putida* DOT-OX5 (mutante *wzy oprL*), x 63.000. (D) *P. putida* DOT-OX5 (mutante *wzy oprL*), x 25.000.

4. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DEL MUTANTE *P. putida* DOT-OX3 CON EL GEN *wzy* SILVESTRE

Para realizar los ensayos de complementación de la mutación de la cepa *P. putida* DOT-OX3, en primer lugar el gen *wzy* se amplificó por PCR, usando como ADN molde el cromosoma de la cepa *P. putida* KT2440, y como cebadores dos oligonucleótidos situados a ambos lados de dicho gen. Los ciclos de temperatura usados en la reacción de amplificación fueron los siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, después, 33 ciclos de 94°C, 15 seg; 63°C, 15 seg; 72°C, 2 min; y una extensión final a 72°C durante 10 min. El resto de las condiciones fueron las descritas en el apartado 7.5 de la sección *Materiales y Métodos*. La secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados fue la siguiente: WzyU, 5'-CGGAATTCGAGGGTAGGGATGCC-3' y WzyD, 5'-GGGAATTCTACCGCTTCGGGGTTG-3', donde las bases subrayadas representan la zona complementaria al ADN de *P. putida*, y las bases en negrita indican una diana de restricción creada para el enzima *EcoRI*. WzyU está situado 328 pb corriente arriba del codón iniciador del gen *wzy*, y WzyD 210 pb corriente abajo del codón de parada (se incluye la zona de los cebadores que hibrida con el cromosoma). El producto de la amplificación se separó por electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de 1.727 pb obtenido se extrajo del gel y se purificó como se mencionó en *Materiales y Métodos*. Dicho fragmento se digirió con el enzima *EcoRI* y posteriormente se purificó, utilizando el sistema comercial "QIAquick PCR Purification Kit" (ver apartado 7.5 de la sección *Materiales y Métodos*) para eliminar el enzima y los fragmentos de ADN más pequeños que surgen tras la restricción. El fragmento *EcoRI* resultante, conteniendo el gen *wzy*, se ligó con el plásmido pBBR1MCS-5 (Fig. 78) cortado con *EcoRI*, y la mezcla de ligación se transformó en la cepa *E. coli* JM109. La transformación se sembró en medio LB suplementado con gentamicina (10 µg/µl), X-gal e IPTG. Entre los distintos clones de color blanco obtenidos, se seleccionó uno que poseía el gen *wzy* en la orientación adecuada para su expresión desde el promotor P_{lac} . Posteriormente, dicho plásmido, denominado pBBRwzyD, se transfirió mediante conjugación "tripartita" a *P. putida* DOT-OX3. De los distintos transconjugantes surgidos tras la selección en medio mínimo con benzoato (5 mM) y gentamicina (200 µg/µl), se eligió uno al azar que se denominó *P. putida* DOT-OX3 (pBBRwzyD). Como control, también se transfirió el plásmido pBBR1MCS-5 a la cepa *P. putida* DOT-OX3. El fenotipo de la cepa *P. putida* DOT-OX3 (pBBRwzyD) se comparó con el de las cepas *P. putida* DOT-OX3 (pBBR1MCS-5) y *P. putida* KT2442. Mediante análisis electroforético de LPS se confirmó que la cepa *P. putida* DOT-OX3 (pBBRwzyD), en contraste con la cepa DOT-OX3 (pBBRwzyD), producía LPS provistos de antígeno O, según se dedujo de la presencia del típico patrón de bandas de alto peso molecular (Fig. 78). Dichas bandas de LPS fueron reconocidas por el anticuerpo monoclonal 7.3B tras su transferencia a

membrana de nitrocelulosa e inmunodetección (no mostrado). Además, la cepa complementada recuperó la capacidad de migración a través de medio semisólido a un nivel comparable al de la cepa silvestre (no mostrado). La cepa control *P. putida* DOT-OX3 (pBBR1MCS-5) se comportó en todos los casos como la cepa *P. putida* DOT-OX3.



FIGURA 78. Análisis de la fracción de LPS de la cepa *P. putida* DOT-OX3 complementada. Las células se cultivaron en medio LB hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Entonces, se recogieron por centrifugación y se prepararon las muestras de LPS, que se separaron mediante EGPA-SDS y se visualizaron por tinción de plata, como se describió en el apartado 18 de la sección *Materiales y Métodos*. Calle 1, *P. putida* DOT-OX3 (pBBR1MCS-5). Calle 2, *P. putida* KT2442. Calle 3, *P. putida* DOT-OX3 (pBBRwzyD).

5. SUPERVIVENCIA DE LAS DISTINTAS CEPAS MUTANTES EN SUELOS AGRÍCOLAS

Se estudió la capacidad de la cepa silvestre y de las distintas cepas mutantes para sobrevivir en un suelo fluvisol (no estéril) del área de Granada. En el ensayo estándar, cada cepa se introdujo en recipientes independientes con 90 g de suelo, a una densidad celular inicial de aproximadamente 10^6 UFC/g de suelo. La eficiencia de recuperación de las bacterias, inmediatamente después de introducirlas en el suelo se aproximó al 100%. En este suelo, el número de células de la cepa silvestre aumentó al principio, alcanzando casi 10^8 UFC/g de suelo y luego tendió a estabilizarse en torno a valores del orden de 10^7 UFC/g de suelo (Fig. 79). En el caso de los mutantes sencillos, el número de UFC/g de

suelo permaneció relativamente constante (sobre 10^6 UFC/g de suelo) durante al menos un mes. En contraste, el número de unidades formadoras de colonias del mutante doble, disminuyó de forma regular, de manera que tras un mes sólo se detectaron 5×10^3 UFC/g de suelo (Fig. 79). El comportamiento de esta cepa mutante siempre fue similar independientemente de si se introducía a mayor (10^8 UFC/g de suelo) o menor (10^4 UFC/g de suelo) densidad (no mostrado).

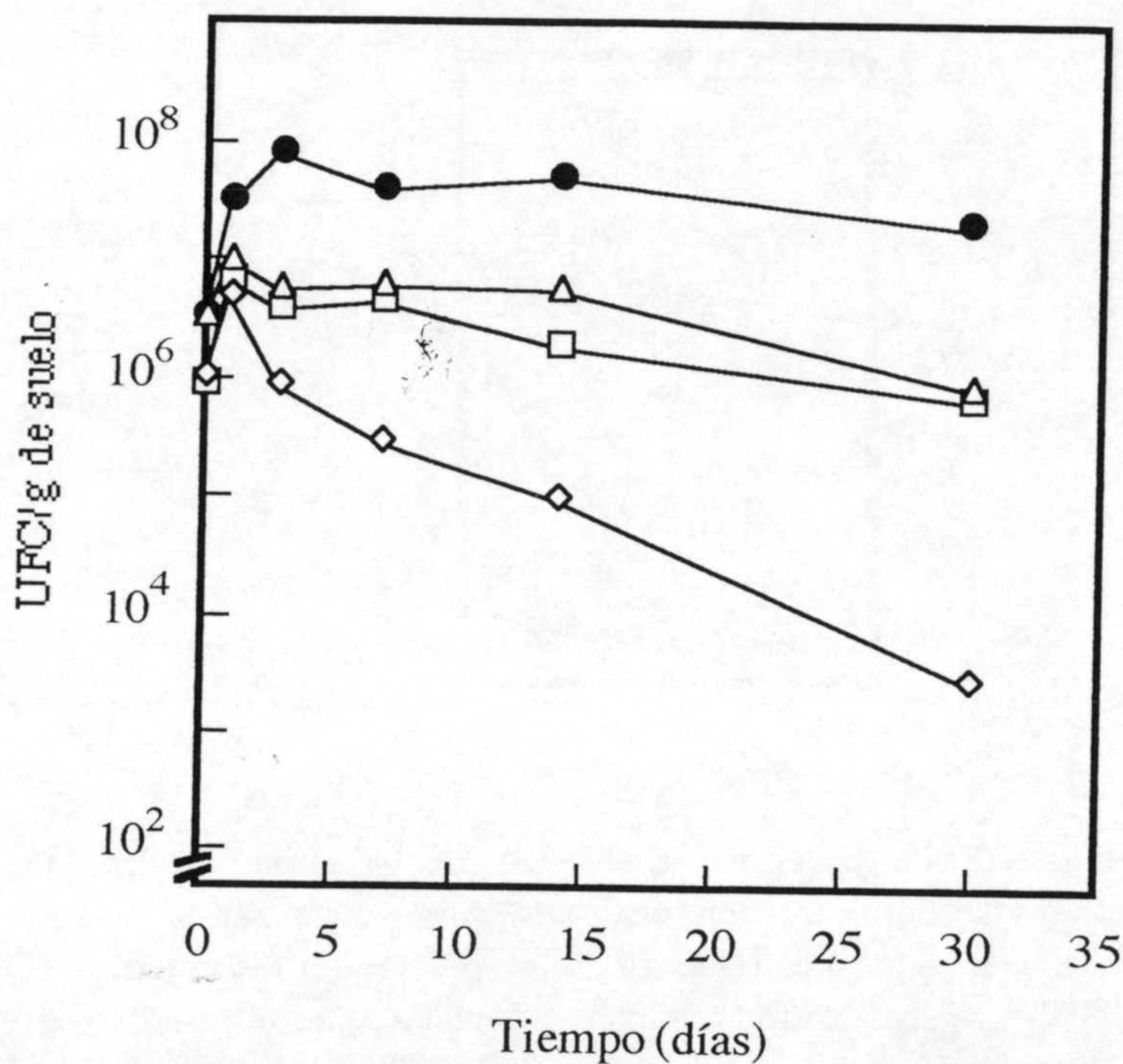


FIGURA 79. Supervivencia de las cepas de *P. putida* KT2442, PX-Rif, DOT-OX3 y DOT-OX5 en suelo fluvisol no estéril. Se añadieron alrededor de 10^6 UFC/g de suelo de las cepas *P. putida* KT2442 (cepa silvestre) (círculos cerrados); *P. putida* DOT-OX3 (mutante *wzy*) (triángulos); *P. putida* PX-Rif (mutante *oprL*) (cuadrados); y *P. putida* DOT-OX5 (mutante *wzy oprL*) (rombos). Los ensayos se realizaron como se describió en el apartado 20 de la sección *Materiales y Métodos*. El número de UFC/g de suelo se determinó mediante siembra en medio selectivo. Los datos son la media de muestreos por triplicado. Las desviaciones estándar fueron del orden del 5-15% de los valores indicados.

6. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA SUPERVIVENCIA EN SUELO DE LAS DISTINTAS CEPAS MUTANTES

La cepa silvestre y las tres cepas mutantes se introdujeron a una densidad celular inicial de aproximadamente 10^6 UFC/g de suelo fluvisol y se incubaron a 4, 18, 30 y 37°C . La cepa silvestre (*P. putida* KT2442) sobrevivió bien a temperaturas comprendidas

entre 4 y 30°C (Tabla 11). Tras un mes de incubación e independientemente de la temperatura, la densidad celular de los mutantes sencillos fue uno o dos órdenes de magnitud inferior a la de la cepa silvestre. A temperaturas entre 4 y 30°C, el mutante doble se estableció a una densidad celular inferior a la de los mutantes sencillos (Tabla 11), y tras un mes de incubación el número de UFC/g de suelo estaba ya por debajo o justo en nuestro límite de detección. A 37°C, la supervivencia de la cepa silvestre estaba bastante afectada, en conformidad con observaciones anteriores (Ramos *et al.*, 1991). Este hecho fue particularmente evidente en el caso de los mutantes, que a esa temperatura estaban por debajo de nuestro límite de detección (100 UFC/g de suelo). Aún así, tras cultivos de enriquecimiento se pudieron detectar algunas células, aunque no en el caso del mutante doble.

Tabla 11. Supervivencia de las cepas *P. putida* KT2442, PX-Rif, DOT-OX3 y DOT-OX5 en suelo fluvisol a diferentes temperaturas

Cepa	Temperatura de incubación			
	4°C	18°C	30°C	37°C
<i>P. putida</i> KT2442 (cepa silvestre)	3x10 ⁵	2x10 ⁷	10 ⁵	10 ³
<i>P. putida</i> PX-Rif (<i>oprL</i>)	10 ³	7x10 ⁵	5x10 ³	<10 ²
<i>P. putida</i> DOT-OX3 (<i>wzy</i>)	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	<10 ²
<i>P. putida</i> DOT-OX5 (<i>wzy oprL</i>)	<10 ²	3x10 ³	5x10 ²	<1

Recipientes independientes con 90 g de suelo se inocularon con la cepa indicada a una densidad de aproximadamente 10⁶ UFC/g de suelo. Al cabo de 30 días de incubación a la temperatura indicada, se determinó el número de UFC/g de suelo para cada cepa. Los ensayos se hicieron por duplicado y los valores que se indican son la media de ambos. Las desviaciones estándar fueron del orden del 15% de los valores indicados.

7. ENSAYOS DE ADHESIÓN A SEMILLAS DE MAÍZ

Para determinar si las mutaciones estudiadas provocaban algún tipo de alteración a nivel de la superficie celular que influyese en las propiedades de adhesión de *P. putida* a determinadas superficies biológicas, se analizó su capacidad de adherencia a semillas de maíz. Para el ensayo, las semillas se incubaron durante 30 min en presencia de una suspensión celular que contenía aproximadamente 1x10⁸ células/ml. Tras diversos lavados, se determinó el número de UFC que permanecían firmemente adheridas a las semillas. En el caso de las cepas portadoras de la mutación *oprL*, *P. putida* PX-Rif y *P. putida* DOT-OX5, el número de UFC fue un orden de magnitud inferior al de las cepas silvestre y mutante *wzy* (Fig. 80). Con objeto de determinar la magnitud de la

influencia de la formación de filamentos en el caso de las cepas PX-Rif y DOT-OX5 a la hora de estimar del número de unidades formadoras de colonias, se procedió a calcular la relación existente entre la densidad celular (expresada como UFC/ml) y la densidad óptica a 660 nm de cultivos de las cepas *P. putida* KT2442 y *P. putida* PX-Rif. En el caso de los cultivos de la cepa silvestre, una densidad óptica de aproximadamente 1 equivalía a un número cercano a las 10^8 UFC/ml (Fig. 81). En el caso del mutante *oprL*, el número de UFC/ml fue casi un orden de magnitud inferior al de la cepa silvestre, para una misma densidad. Esto significaba que al calcular el número de UFC/semilla para las cepas *P. putida* PX-Rif y DOT-OX5 se estaba infravalorando su valor que, en realidad, sería similar al de la cepa silvestre.

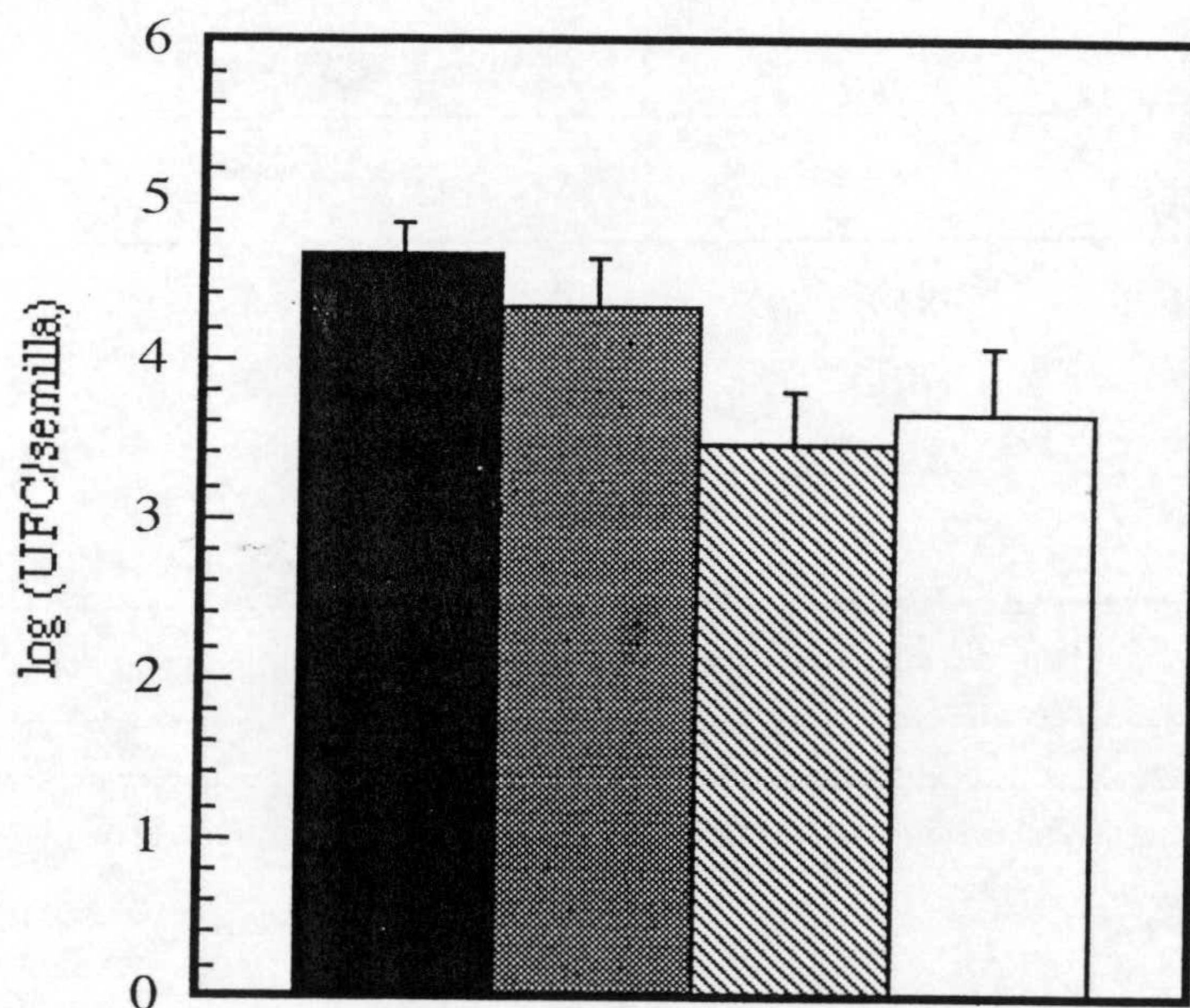


FIGURA 80. Capacidad de adhesión de las cepas de *P. putida* KT2442, PX-Rif, DOT-OX3 y DOT-OX5 a semillas de maíz. *P. putida* KT2442 (cepa silvestre) (color negro); *P. putida* DOT-OX3 (mutante *wzy*) (color gris); *P. putida* PX-Rif (mutante *oprL*) (rallado); y *P. putida* DOT-OX5 (mutante *wzy oprL*) (blanco). Los ensayos se realizaron como se describió en el apartado 22 de la sección *Materiales y Métodos*. El número de UFC/semilla se determinó mediante siembra en medio selectivo. Los datos son la media de muestreos por triplicado. Las líneas que aparecen encima de cada barra representan las desviaciones de la media.

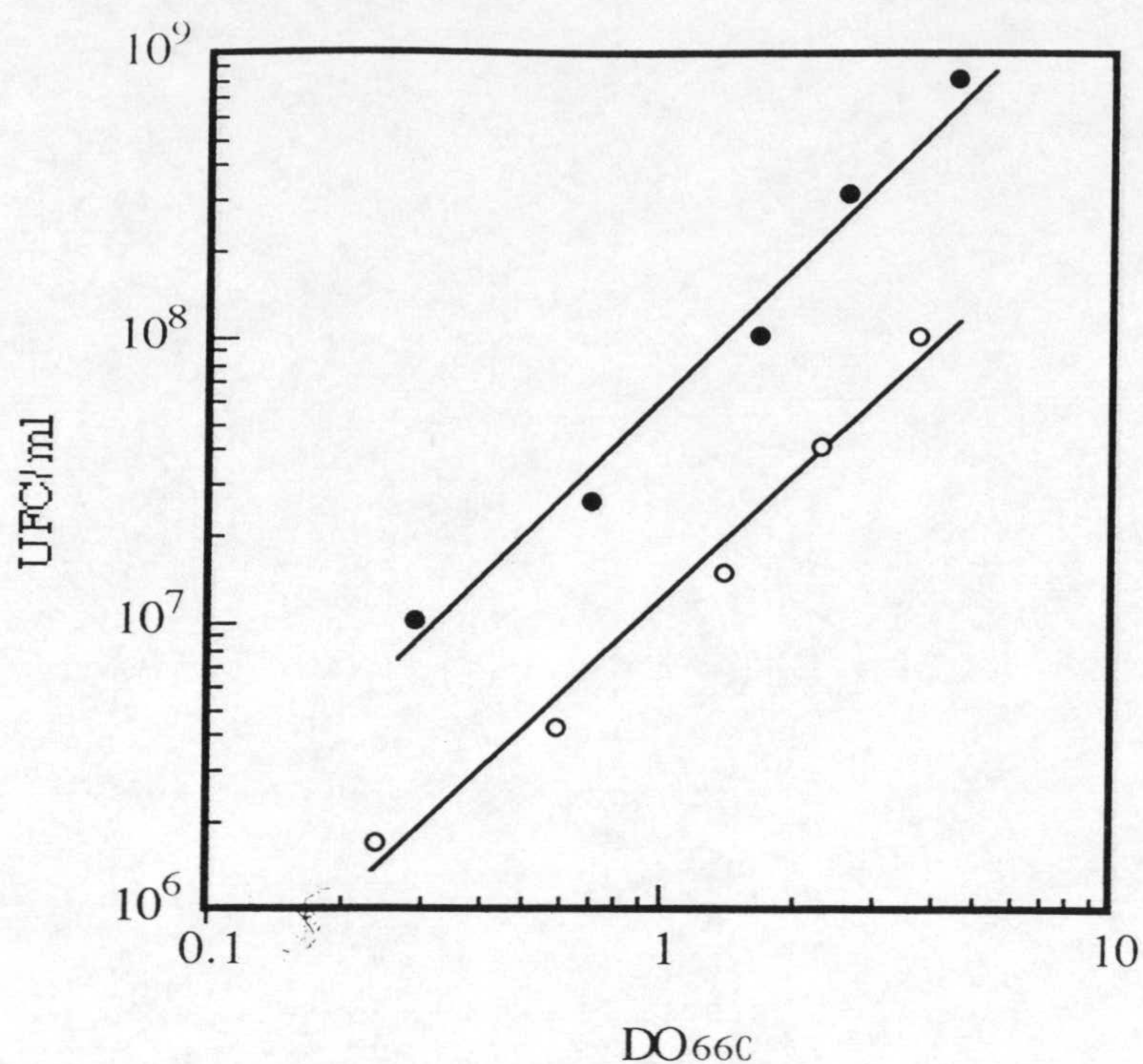
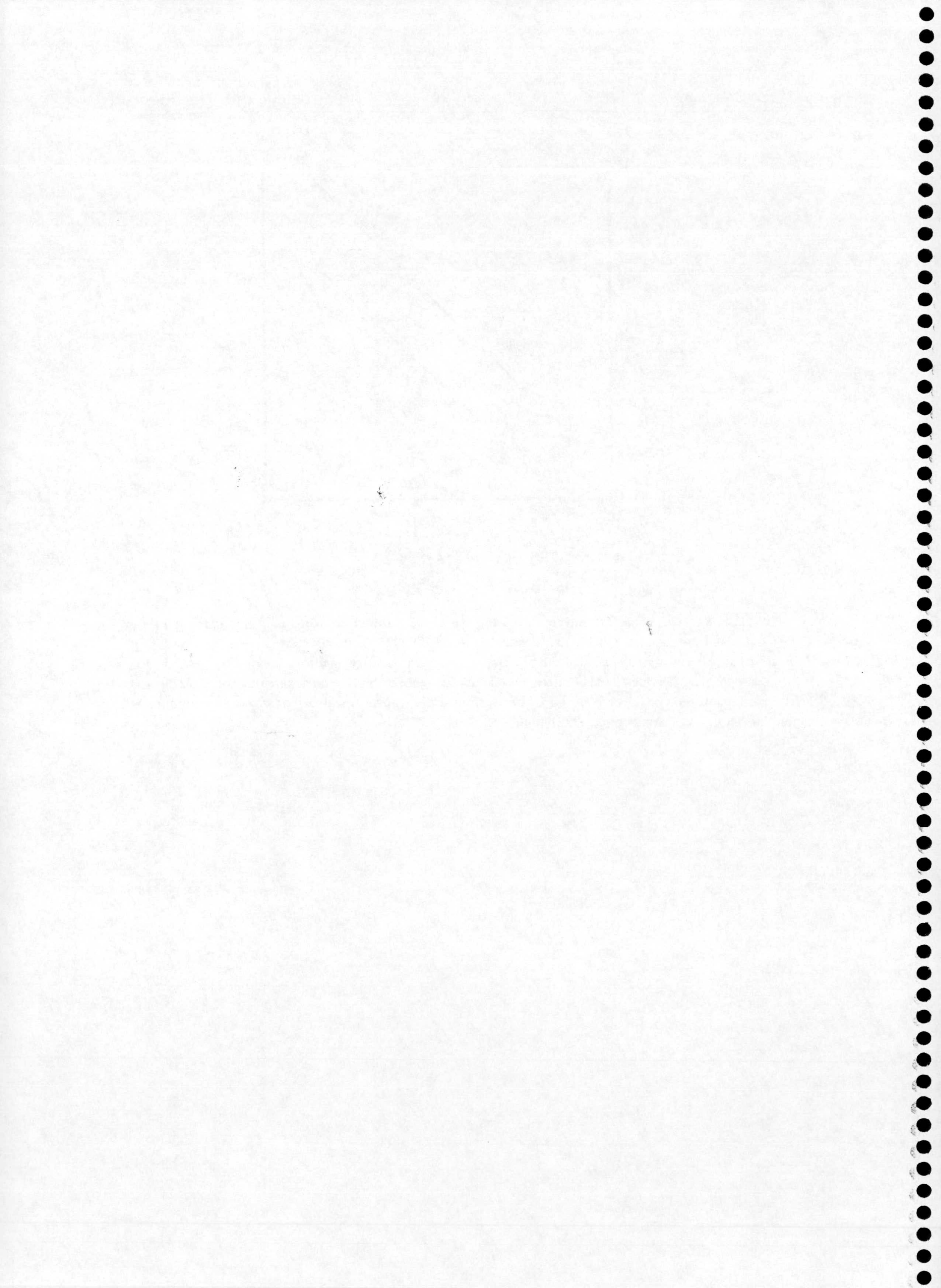
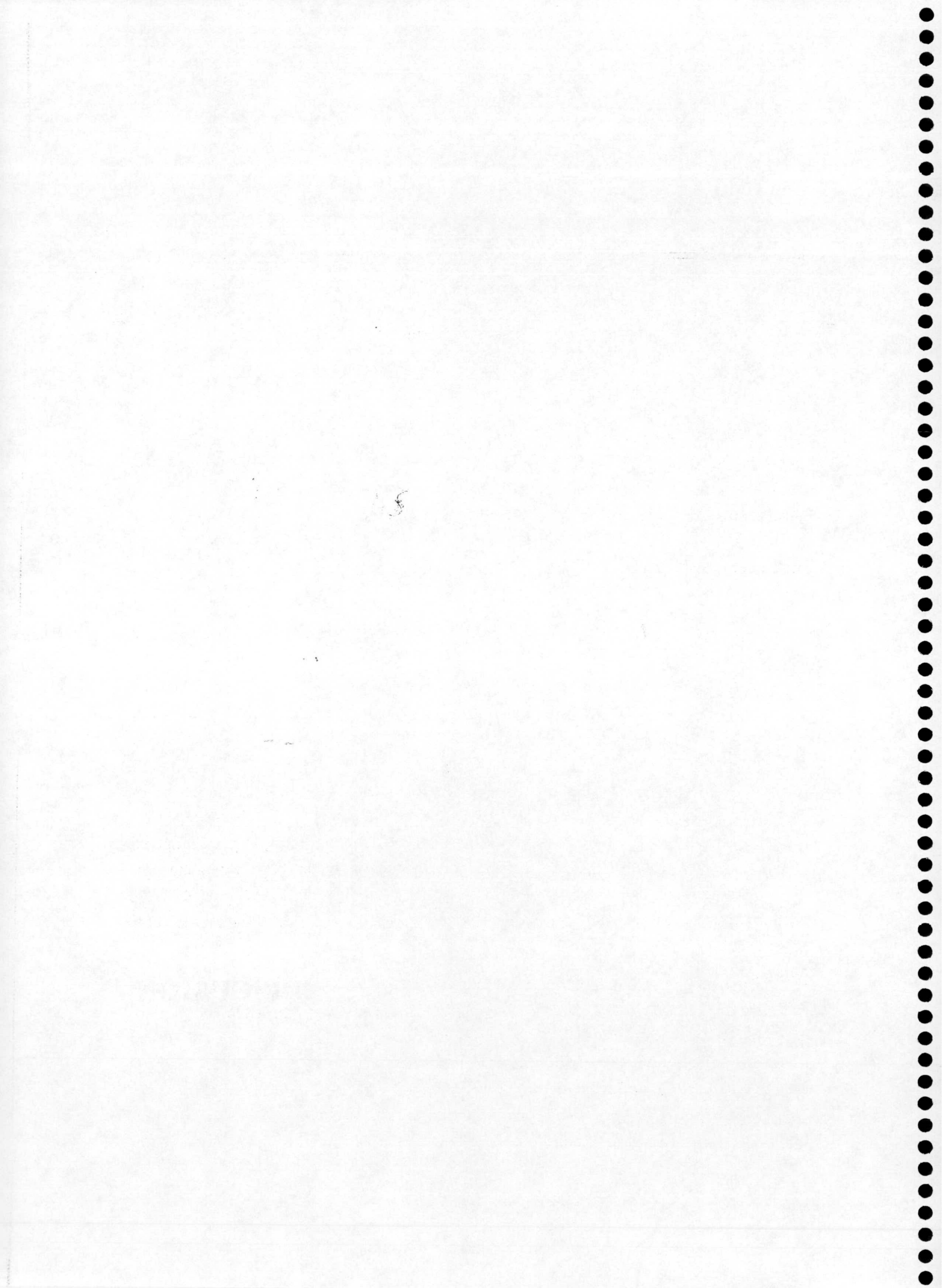


FIGURA 81. Correlación entre densidad celular y densidad óptica para las cepas de *P. putida* KT2442 y PX-Rif. Las cepas *P. putida* KT2442 (cepa silvestre) (círculos cerrados) y *P. putida* PX-Rif (mutante *oprL*) (círculos abiertos) se cultivaron en medio LB líquido y cuando los cultivos alcanzaron las densidades ópticas indicadas, se sembraron diluciones seriadas sobre medio LB sólido para establecer el número de UFC/ml. Se muestra el ajuste lineal de los datos experimentales obtenidos. DO₆₆₀, densidad óptica a 660 nm.



DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

El género *Pseudomonas* engloba a un amplia variedad de microorganismos, miembros comunes de la microbiota del suelo y del agua, que se caracterizan entre otros aspectos por presentar flagelos de inserción polar y por mostrar una gran versatilidad metabólica, gracias a la cual pueden colonizar una gran diversidad de ecosistemas. Así, por ejemplo, dentro de este género existen bacterias patógenas de animales y de plantas (Hattermann y Ries, 1989; Quinn, 1992); bacterias que colonizan la rizosfera de plantas potenciando el crecimiento de éstas a través de un conjunto de efectos antagonistas contra posibles agentes patógenos, fundamentalmente hongos (de Weger *et al.*, 1995; O'Sullivan y O'Gara, 1992); bacterias del suelo, que juegan un papel importante en los ciclos geoquímicos de la materia (Gibson y Subramanian, 1984); y bacterias de ambientes acuáticos (García-Valdés *et al.*, 1988). También existen muchas cepas tolerantes a disolventes orgánicos (Inoue y Horikoshi, 1989, Ramos *et al.*, 1995), de gran interés en procesos de biodegradación de compuestos contaminantes, y en procesos de biotransformación para la obtención de productos de valor añadido (Gibson *et al.*, 1990; Spain, 1990).

Dado que el contacto entre una célula bacteriana y su entorno tiene lugar a través de estructuras de la superficie celular, el estudio de la organización y la función de los distintos elementos que componen la envoltura celular es uno de los aspectos importantes para comprender como las bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de colonizar nichos ecológicos tan variados. Esta cuestión se ha estudiado con cierto detalle en el caso de algunas *Pseudomonas* patógenas, como *P. aeruginosa*, de la que se conoce la estructura y la función de muchos de los componentes de su envoltura celular, en particular los de la membrana externa (Burrows *et al.*, 1986; Hancock *et al.*, 1996; Nikaido y Hancock, 1986; Rivera y McGroarty, 1989). Sin embargo, *P. putida* apenas se ha estudiado a este nivel, habiéndose secuenciado hasta la fecha muy pocos genes que codifiquen proteínas de la envoltura celular. Menor aún es la información disponible sobre el comportamiento en el medio ambiente de bacterias de *P. putida* que presentan defectos en su envoltura celular.

Por otro lado, las características mencionadas anteriormente han convertido a las bacterias del género *Pseudomonas* en microorganismos de gran interés biotecnológico, con numerosas aplicaciones en el ámbito medioambiental, entre las que destacan su uso como biopesticidas, como agentes potenciadores del crecimiento vegetal, para el tratamiento *in situ* de zonas contaminadas o para la protección de plantas frente a las heladas. Estos procesos suelen requerir la introducción en el medio ambiente de un gran número de microorganismos, bien sean silvestres o modificados genéticamente.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que no existen diferencias de comportamiento significativas entre los microorganismos manipulados genéticamente y su cepa parental correspondiente, cuando éstos se liberan al medio ambiente. Pese a todo, la liberación de microorganismos manipulados aún continúa suscitando preocupaciones. Independientemente de los riesgos potenciales existentes, para evaluar el funcionamiento de dichos microorganismos es importante realizar un seguimiento de los mismos una vez se liberan al medio ambiente, y para tal fin son de gran utilidad las técnicas moleculares que permiten su detección. En este sentido, los anticuerpos monoclonales constituyen una de las herramientas a tener en cuenta, en especial, aquellos dirigidos contra determinantes antigénicos de la superficie celular que, mediante técnicas inmunológicas, permiten identificar rápidamente y con gran fiabilidad aquellas células que estén expresando un antígeno dado.

Ramos-González y colaboradores (1992) generaron anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie de *P. putida* KT2440, y obtuvieron dos anticuerpos, denominados 7.3B y 7.5D. El anticuerpo 7.3B reconocía el antígeno O del LPS, y el anticuerpo 7.5D reconocía una proteína de superficie con un peso molecular aparente de 40 kDa. Posteriormente, con el fin de identificar el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 7.5D, se generaron mutantes de *P. putida* KT2440 por mutagénesis al azar con el transposón mini-Tn5*phoA* (Ramos-González, 1993). Las fusiones génicas con el gen '*phoA*, que codifica la proteína fosfatasa alcalina de *E. coli* desprovista de su péptido señal, son muy útiles para el estudio de las proteínas de la envoltura celular. Dicha enzima sólo es activa cuando se exporta a través de la membrana interna al periplasma, por lo que sirve como sensor de señales de exportación de proteínas (secuencias señal procesables y segmentos transmembrana de proteínas de membrana interna que estén orientados adecuadamente) (Manoil *et al.*, 1990). Este sistema permitió reducir en un 90% el número de mutantes a analizar, al limitarse la búsqueda al conjunto de clones que portaban fusiones activas con '*PhoA*. De esta forma, entre más de 1.600 mutantes analizados, se seleccionó un único clon, al que se denominó *P. putida* 14G3, que no expresaba el producto de 40 kDa reconocido por el monoclonal 7.5D. Cuando se estudió la región de ADN interrumpida en dicho mutante, se encontró que el transposón se había insertado en el gen *oprL* de *P. putida*. Parte de este trabajo se ha dedicado al estudio de la cepa *P. putida* 14G3, y a la construcción y caracterización de dos nuevas cepas mutantes *oprL*, denominadas *P. putida* PX y *P. putida* T1PX, con objeto de dilucidar la función que dicha proteína desempeña en *P. putida*.

I. EL GEN MUTADO EN LA CEPA 14G3 CODIFICA LA LIPOPROTEÍNA ASOCIADA AL PEPTIDOGLICANO (OprL) DE *P. putida*

Los datos mostrados en la sección *Resultados* demuestran que la fase de lectura abierta interrumpida por el transposón mini-Tn5*phoA* en la cepa *P. putida* 14G3 corresponde al gen *oprL* (*pal*) de *P. putida*, que codifica una lipoproteína de membrana externa, asociada al peptidoglicano. En primer lugar, el polipéptido codificado por dicha región presentó una gran similitud con las proteínas PAL de otras bacterias gram negativas (Tabla 4, *Capítulo I*). Estas proteínas se caracterizan, entre otros aspectos, por su pequeño tamaño (las que existen secuenciadas varían entre 150 y 203 aminoácidos) y por poseer en su extremo amino terminal una secuencia señal procesable típica de las lipoproteínas. Como se explicó en la *Introducción*, todas las lipoproteínas tras su procesamiento poseen como primer aminoácido una glicerilcisteína, a la cual se unen tres ácidos grasos, dos de ellos a través de enlaces éster y un tercero a través de un enlace amida. A pesar de su importancia, ni el péptido señal ni la región lipídica son los elementos responsables de la localización final de las lipoproteínas en la envoltura celular. Ésta, en cambio, parece estar determinada por la carga eléctrica de los aminoácidos de las posiciones 2 y 3 de la proteína madura. Si alguno de ellos posee carga negativa, la proteína permanece anclada en la membrana interna, de lo contrario se dirige a la externa. En concreto, existen evidencias experimentales de que el aminoácido situado en la segunda posición es clave para determinar el destino último de la lipoproteína. Si éste es serina, la lipoproteína se dirige a la membrana externa, y si es ácido aspártico permanece en la interna (Yamaguchi *et al.*, 1988). Aunque en este trabajo no se aportan evidencias experimentales sobre la localización concreta de OprL en la membrana, la presencia de serina en la posición +2 y la ausencia de residuos cargados negativamente en dicha región sugieren una localización a nivel de la membrana externa. Además, se ha demostrado mediante experimentos de fraccionamiento subcelular que las proteínas PAL de *E. coli* y *H. influenzae*, la lipoproteína de Braun (Lpp) de *E. coli*, y las proteínas OprI y OprL de *P. aeruginosa*, entre otras, están situadas en la membrana externa (Braun, 1975; Chen y Henning, 1987; Cornelis *et al.*, 1989; Lim *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 1988). Dado que todas estas proteínas, al igual que OprL de *P. putida*, poseen dos serinas en las posiciones +2 y +3, es lógico suponer que OprL de *P. putida* también se localice en la membrana externa.

En segundo lugar, la fuerte interacción no covalente de OprL con el peptidoglicano, que precisó de un tratamiento a 50°C en presencia de SDS al 1% (p/v) para lograr su disociación del mismo (Fig. 36A), es otra de las características propias de las proteínas PAL (Mizuno, 1981). El hecho de que la proteína híbrida OprL-PhoA del mutante 14G3 no apareciese en la fracción de proteínas asociadas al peptidoglicano corroboraba

observaciones anteriores hechas por Lazzaroni y Portalier (1992), en las que se proponía que el dominio de unión al peptidoglicano de PAL de *E. coli* estaba situado en su extremo carboxilo terminal. La falta de interacción entre OprL' y el peptidoglicano en el mutante 14G3, implica que los 53 aminoácidos carboxilo terminales de OprL son fundamentales para una correcta asociación con el mismo, aunque esto no significa que sean suficientes. Sin embargo, esto no demuestra que en dicha región resida la zona de unión al mismo, ni tan siquiera una parte. El dominio de unión podría no ser único ni lineal, de manera que OprL podría poseer varias zonas alejadas entre sí a nivel de estructura primaria, implicadas en dicha unión. Incluso, podría ocurrir que la región carboxilo terminal no intervenga directamente en la interacción, siendo necesaria únicamente para que OprL adopte una conformación que le permita interaccionar a través de otro(s) dominio(s) con el peptidoglicano. La proteína OprL de *P. putida* también presentó similitud con otras proteínas como OprF, OmpA, MotB, etc. de distintos microorganismos (Tabla 4, Capítulo I), aunque ésta se limitó a las regiones carboxilo terminales (aproximadamente los últimos 100-120 residuos) (Fig. 33). El hecho de que estas proteínas también interaccionen con el peptidoglicano apoya la hipótesis de que esta región C-terminal conservada es importante para la interacción con el peptidoglicano. En este sentido, se ha demostrado recientemente que los últimos 111 aminoácidos de la proteína OprF de *P. aeruginosa* son necesarios para que se produzca la mencionada interacción (Rawling *et al.*, 1998). En 1995, Koebnik propuso un motivo con estructura en hélice α como posible responsable de la asociación de estas proteínas con el peptidoglicano. La secuencia consenso para dicho motivo sería $NX_2LSX_2RAX_2VX_3L$, donde X representa a un aminoácido cualquiera. Según este modelo, todos los aminoácidos conservados se dispondrían sobre un mismo lado de la hipotética hélice α (Fig. 82). En su extremo carboxilo, OprL de *P. putida* posee la secuencia (90)-NMALGERRAKAVQRYL-(105), que sólo difiere en el aminoácido glicina con respecto a la secuencia consenso (este aminoácido también está muy conservado en esta posición en el resto de las proteínas PAL) (Tabla 4 en Capítulo I). Esta hipótesis explicaría el hecho de que en el mutante 14G3 la proteína de fusión OprL-PhoA, que sólo posee los 92 primeros aminoácidos de la proteína OprL madura, no interaccionase con el peptidoglicano. En apoyo a esta propuesta, está también el hecho de que dos fusiones con PhoA producidas a distinta altura con PAL de *E. coli* y que varían en la secuencia (102)-ERRANAVKMYLQKG-(116) (que comprende parte del motivo mencionado anteriormente) difieren en su grado de asociación con el peptidoglicano. Sólo la que posee dicha secuencia es capaz de interaccionar fuertemente con el peptidoglicano (Lazzaroni y Portalier, 1992). En un trabajo reciente, Clavel y colaboradores han definido mediante mutagénesis al azar de PAL de *E. coli*, hasta siete aminoácidos a lo largo de la proteína que son esenciales para el mantenimiento de su asociación con el peptidoglicano (Clavel *et al.*, 1998) (Fig. 83).

Coincidiendo con observaciones anteriores, todas las mutaciones que afectaban a dicha interacción se localizaron en la mitad carboxilo terminal de la proteína, concretamente desde la posición 86 en adelante. Algunas de las mutaciones se produjeron en residuos altamente conservados dentro de la familia de proteínas asociadas al peptidoglicano (ver Fig. 32 y 83), mientras que otras afectaron a residuos que ya se habían demostrado claves para la funcionalidad de la proteína MotB de *E. coli* (De Mot y Vanderleyden, 1994) (Fig. 83). Esta proteína, que une la maquinaria del motor flagelar con la pared celular a través de interacciones con el peptidoglicano y MotA (Blair *et al.*, 1991),

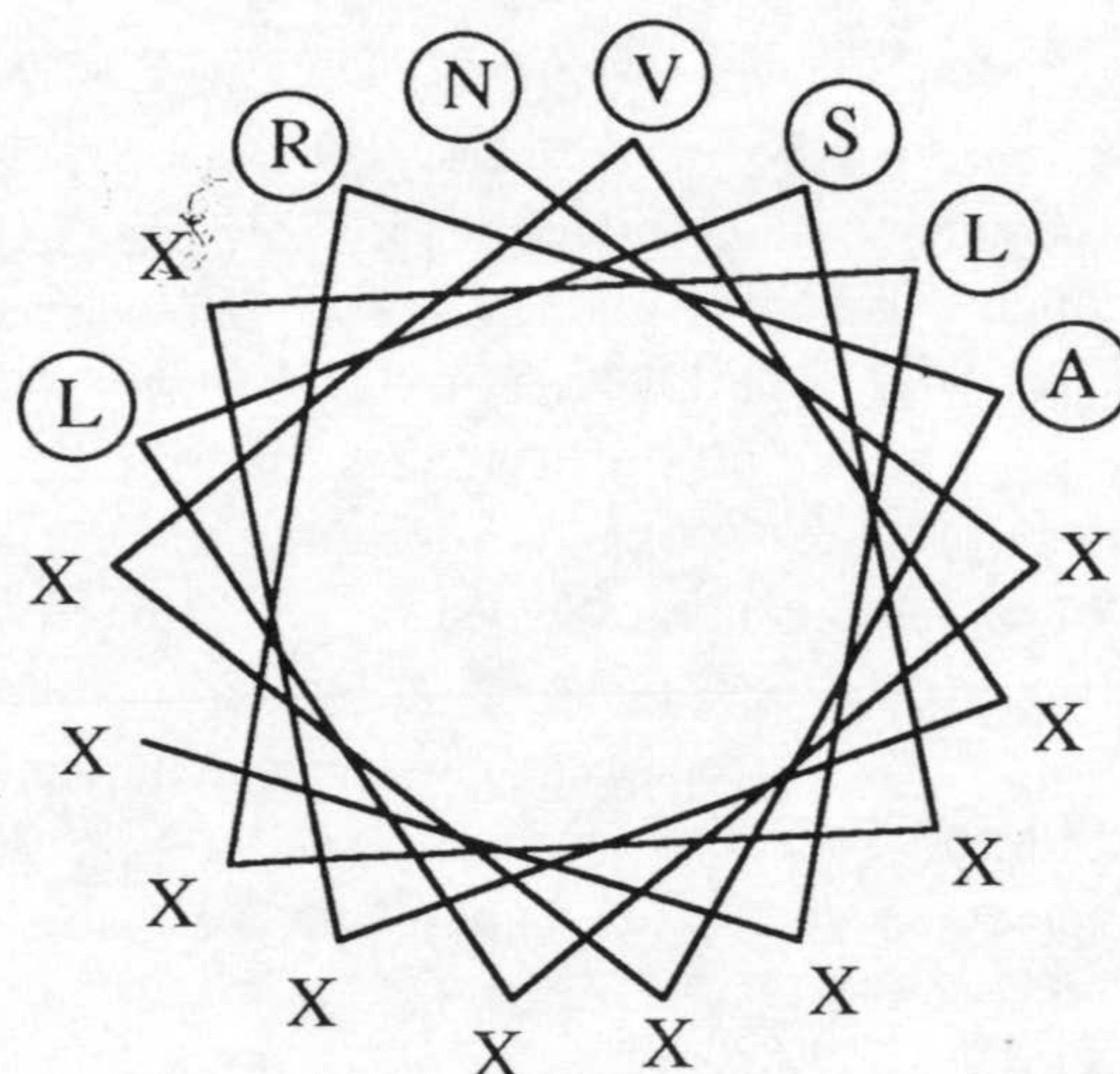


FIGURA 82. Representación sobre el plano de una proyección de la hélice α supuestamente responsable de la interacción con el peptidoglicano. Se muestran las distintas posiciones que ocuparían los restos de aminoácidos de la secuencia consenso $NX_2LSX_2RAX_2VX_3LX_2$ (donde la X representa a un aminoácido cualquiera). Se puede observar como los aminoácidos conservados, señalados con un círculo, se agrupan sobre una misma cara de la hélice (Koebnik, 1995).

también pertenece a la familia de proteínas asociadas al peptidoglicano y como tal presenta gran similitud con PAL en su extremo carboxilo terminal. Por supuesto, todos estos residuos claves también estaban conservados en OprL de *P. putida*. Por otra parte, algunas de las mutaciones mencionadas de PAL de *E. coli*, se localizaron en aminoácidos situados a una distancia considerable del supuesto motivo de unión en hélice α (posición 97-112), como por ejemplo el cambio de la glicina 86 a ácido aspártico, o el de la arginina 146 a histidina (Clavel *et al.*, 1998). Estas observaciones contradicen en parte resultados

previos mencionados anteriormente, de los mismos autores, en los que se mostraba como un híbrido PAL-PhoA con los 116 primeros aminoácidos de PAL de *E. coli*, era capaz de asociarse con el peptidoglicano (Lazzaroni y Portalier, 1992). En resumen, la situación actual es algo confusa, y se necesitarían más trabajos sobre el tema para distinguir qué aminoácidos son necesarios para que se produzca la interacción y cuáles están realmente implicados en la unión con el peptidoglicano.

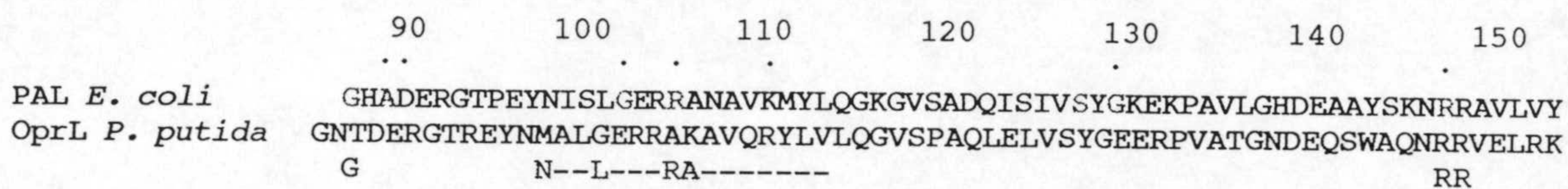


FIGURA 83. Aminoácidos de PAL de *E. coli* importantes para su interacción con el peptidoglicano. Se presenta el alineamiento de las regiones carboxilo terminales de PAL de *E. coli* y OprL de *P. putida*, donde se muestran en color rojo aquellos aminoácidos cuyo cambio provoca una pérdida de la asociación entre PAL de *E. coli* y el peptidoglicano (Clavel *et al.*, 1998). El segmento azul en la parte inferior de la figura, indica la posición de la supuesta hélice α de asociación con el peptidoglicano predicha por Koebnik (1995). Los residuos indicados en la parte inferior del alineamiento son aminoácidos que se encuentran absolutamente conservados en un gran número de proteínas, tanto de bacterias gram negativas como de gram positivas, pertenecientes a la familia de proteínas asociadas al peptidoglicano (de Mot y Vanderleyden, 1994). Las posiciones marcadas con un punto en la parte superior del alineamiento, son residuos que aparecen cambiados en mutantes MotB no funcionales de *E. coli* (de Mot y Vanderleyden, 1994). La numeración de la parte superior de la figura se refiere a la proteína madura de PAL de *E. coli*.

En tercer lugar, el anticuerpo monoclonal MA1-6, generado contra la proteína OprL de la membrana externa de *P. aeruginosa* (Hancock *et al.*, 1982), detectó un producto de un tamaño similar en los extractos de proteína celular total y en la fracción de proteínas asociadas al peptidoglicano de la cepa de *P. putida* parental. Sin embargo, no pudo reconocer ningún polipéptido en la cepa *P. putida* 14G3, en ninguno de ambos casos (Fig. 36B y C). Para comprobar que la falta de expresión de la supuesta proteína OprL en la cepa 14G3 era consecuencia directa de la mutación producida por el mini-*Tn5phoA*, se usó el anticuerpo MA1-6 para la detección inmunológica de OprL en extractos de proteína celular total de una cepa de *E. coli* que portaba un plásmido con el supuesto gen *oprL* de *P. putida* clonado. El anticuerpo reaccionó con un producto del mismo tamaño que en el caso de la cepa silvestre, lo que constituía la evidencia más directa de que, en efecto, el gen clonado correspondía a *oprL* (no mostrado). En cualquier caso, el tamaño aparente de la proteína OprL estimado a partir de los geles de proteína siempre fue mayor de lo esperado (19 kDa frente a los 16,5 kDa calculados para la lipoproteína madura), aún teniendo en cuenta la contribución de la parte lipídica (aproximadamente 800 Da). Este

fenómeno es característico de las lipoproteínas PAL, que por causas aún desconocidas presentan una movilidad electroforética aberrante, menor de la normal (Burnens *et al.*, 1995; Chen y Henning, 1987; Nelson *et al.*, 1988). Dado que la proteína de fusión OprL-PhoA del mutante 14G3 también presenta una movilidad electroforética menor de la esperada (Fig. 27), quizá sea la presencia del grupo lipídico la responsable de este comportamiento. Por otro lado, el hecho de que el monoclonal MA1-6 no reconociese la proteína OprL-PhoA en el mutante 14G3, indicaba que el epítipo reconocido por este anticuerpo, o al menos una parte del mismo, se localizaba dentro de los últimos 53 aminoácidos de la proteína.

Por último, se confirmó la naturaleza lipoproteica de la proteína OprL recién identificada. La presencia de un péptido señal con una secuencia consenso de reconocimiento para la enzima peptidasa señal II, se considera, en muchas ocasiones, evidencia suficiente para definir una lipoproteína como tal. Dentro de los criterios experimentales para la identificación de lipoproteínas bacterianas están, por ejemplo, los ensayos de incorporación metabólica de compuestos marcados radiactivamente como [³H]glicerol o [³H]palmitato, o los de inhibición del procesamiento de la prolipoproteína mediante el uso del antibiótico peptídico cíclico globomicina, un inhibidor específico de la enzima peptidasa señal II, que es exclusiva de lipoproteínas (Inukai *et al.*, 1978). Empleando esta última aproximación, y con ayuda del anticuerpo MA1-6, se demostró que OprL de *P. putida* era reconocida y procesada por dicha peptidasa (Fig. 45) y que, en consecuencia, debía estar sometida a todas las modificaciones postraduccionales propias de las lipoproteínas (ver *Introducción*). La presencia, en la muestra tratada con globomicina, de dos bandas correspondientes a la forma madura de la lipoproteína y a la prolipoproteína diglicérido (Fig. 45), se debió probablemente a que la concentración de globomicina usada en el ensayo (100 µg/ml) fue insuficiente para inhibir totalmente a la peptidasa. Aunque también pudo deberse a que la vida media de OprL sea lo suficientemente larga como para superar los 45 min que duró el tratamiento con el inhibidor, o a una combinación de ambas causas.

En relación a la conservación de OprL entre los distintos miembros de la familia *Pseudomonadaceae*, los estudios de Hancock *et al.* (1990) ya señalaban que la proteína OprL estaba muy conservada entre las pseudomonas pertenecientes al grupo I de ARN ribosómico. En este trabajo se analizó, mediante experimentos de hibridación de ADN, el grado de conservación de *oprL* a nivel de secuencia de nucleótidos, entre distintas pseudomonas que representaban a todos los grupos de ARN ribosómico. Sólo se obtuvo un resultado positivo en el caso de las cepas que pertenecían al grupo Ib de ARN ribosómico, confirmándose el alto grado de conservación indicado por Hancock dentro de este grupo. No se llegaron a realizar, sin embargo, experimentos de hibridación en

condiciones no estrictas que, posiblemente, hubiesen dado como resultado un número más amplio de bacterias con genes *oprL* que hibridasen con el de *P. putida*. Cabe destacar que las proteínas PAL suelen mostrar un alto grado de conservación entre las bacterias de un mismo género y a veces entre géneros relacionados, incluso a nivel de secuencia de ADN (Burnens *et al.*, 1995; Frey *et al.*, 1996; Spinola *et al.*, 1992; Tibor *et al.*, 1994), lo que sugiere que su función, además de estar estrechamente relacionada con su estructura, debe ser muy importante para la bacteria. A favor de esta idea, está el hecho de que se han encontrado proteínas tipo PAL en un gran número de bacterias gram negativas, muchas de las cuales están secuenciadas (ver Tabla 4, *Capítulo I*) aunque en otros muchos casos sólo se han caracterizado a nivel bioquímico (*Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* sv typhimurium, *Klebsiella aerogenes*, *Serratiamarcescens*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, etc.) (Mizuno, 1981).

II. EL GEN *oprL* DE *P. putida* SE ENCUENTRA FORMANDO PARTE DE LA DENOMINADA AGRUPACIÓN DE GENES DEL "SISTEMA *tol-oprL*"

Cuando se secuenciaron las regiones de ADN adyacentes al gen *oprL* de *P. putida*, se encontraron una serie de genes que mostraron gran similitud a los denominados genes del sistema *tol-pal* ya secuenciados total o parcialmente en otras bacterias gram negativas (Dennis *et al.*, 1996; Sen *et al.*, 1996; Vianney *et al.*, 1996). En la Tabla 12 se resumen las principales características de los genes del sistema *tol-oprL* (o "genes *tol-oprL*") de *P. putida*. En dicha tabla se indica además el grado de identidad que dichos genes presentan con los correspondientes genes *tol-pal* de *E. coli*, por ser éstos los más estudiados y los que van a servir de referencia constante a lo largo de esta discusión.

El primer gen que se localizó corriente arriba de *oprL* fue *tolB*, separado de éste por 54 pb (Tabla 12). Incluyendo *tolB* de *P. putida*, se han secuenciado hasta la fecha 7 posibles genes *tolB* (dos de ellos sólo parcialmente) (ver Tabla 6, *Capítulo III*), pero únicamente *tolB* de *E. coli* ha sido objeto de estudio. Entre las distintas proteínas TolB alineadas, las zonas de similitud aparecieron distribuidas por toda la secuencia (Fig. 49), aunque si se omite TolB de *R. prowazekii*, que parece algo alejada evolutivamente de las demás, las regiones amino y carboxilo terminales parecen estar algo más conservadas. Curiosamente, la región situada entre los aminoácidos 174 y 351 de la proteína madura TolB de *P. putida*, que constituye más del 40% de la proteína, está compuesta por 4 segmentos de 44 aminoácidos cada uno, muy similares entre sí, que quizá podrían haber surgido por duplicación sucesiva de un único segmento original. Esta unidad repetitiva también se ha encontrado en otras proteínas, incluida TolB de *E. coli* (Fig. 84), como son

Tabla 12. Características principales de los genes del sistema *tol-oprL* de *P. putida*

Gen	Longitud (pb)	Codón iniciador	Longitud proteína (aa) ^a	Peso molecular (Da)	Distancia hasta el gen anterior (pb) ^b	Distancia hasta el siguiente gen (pb) ^b	Péptido señal (longitud) ^c	Identd. a <i>E. c.</i> (%) ^d
<i>orf1</i>	453	AUG	150	17.194	181	2	-	48,0
<i>tolQ</i>	696	GUG	231	25.294	2	14	-	55,0
<i>tolR</i>	453	AUG	150	16.236	14	-1	-	34,5
<i>tolA</i>	1.119	AUG	372	40.108	-1	-4	-	37,8
<i>tolB</i>	1.302	GUG	433	47.401	-4	54	+ (21)	43,4
<i>oprL</i>	501	AUG	166	17.821	54	6	+ (21)	39,8
<i>orf2</i>	807	AUG	268	28.712	6	168	+ (21)	32,0

^a Longitud de la proteína en aminoácidos.

^b Distancia entre genes contiguos, en pares de bases. Un número negativo significa que los genes solapan en la cantidad de pares de bases indicada.

^c Presencia o ausencia de péptido señal. El símbolo "-" significa que no se predijo la existencia de péptido señal en dicha proteína. El símbolo "+" indica que se predijo la existencia de una secuencia señal procesable cuya longitud estimada, en aminoácidos, se indica entre paréntesis.

^d Se indica el grado de identidad presentado, en porcentaje de residuos idénticos, con los correspondientes genes del sistema *tol-pal* de *E. coli*.

el antígeno GA1 del nematodo parásito *Haemonchus contortus* (Jasmer *et al.*, 1996) y la proteína C31C9.1 de *Caenorhabditis elegans*, relacionada con esta última. Recientemente Ponting y Pallen (1999) han propuesto la existencia de hasta 6 repeticiones en tándem entre los aminoácidos 144-409 de la proteína TolB de *E. coli*, que podrían plegarse formando una estructura denominada "hélice β ", en la que las regiones repetidas se dispondrían radialmente sobre un eje central, semejando las aspas de una hélice. En las proteínas con dominios en "hélice β ", cuya estructura se ha determinado cristalográficamente, se ha visto que los sitios de unión para los sustratos o ligandos se localizan siempre en las mismas regiones dentro de dicho dominio. En base a estos datos Ponting y Pallen (1999) han propuesto una serie de residuos en TolB de *E. coli* que podrían estar implicados en su unión a ligandos. En cualquier caso, estas predicciones precisarían de una confirmación basada en estudios cristalográficos que, en el caso de TolB de *E. coli*, ya están en marcha (Abergel *et al.*, 1998).

Como se mencionó en la *Introducción*, se ha demostrado tanto la interacción *in vitro* de TolB de *E. coli* con las proteínas de la membrana externa OmpF, OmpC, PhoE y

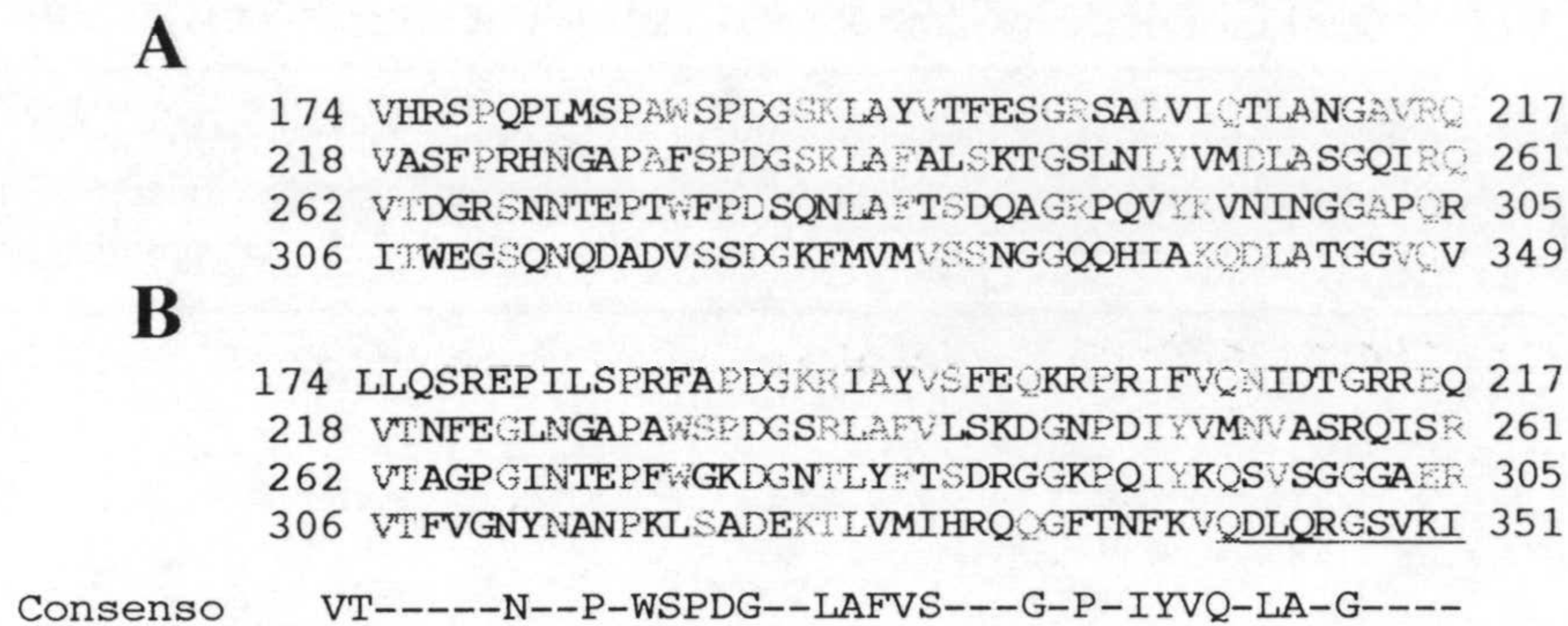


FIGURA 84. Zona repetitiva situada en la mitad carboxilo terminal de las proteínas TolB de *E. coli* y *P. putida*. Parte de las secuencias de TolB de *E. coli* (A) y de *P. putida* (B), se han dispuesto de manera que se aprecien los segmentos repetidos de 44 aminoácidos de longitud. Para cada secuencia se indican en rojo aquellos aminoácidos presentes en 3 ó más de las repeticiones, y en azul se señalan aquellos que sólo están presentes en 2 de ellas. En la parte inferior de la figura se muestra la secuencia consenso de la unidad repetitiva, deducida a partir de los 8 segmentos alineados. Un aminoácido forma parte del consenso cuando está presente en al menos 4 de las 8 secuencias alineadas. La numeración indicada al margen de las secuencias se refiere a la posición de cada segmento con respecto a la proteína madura (sin contar los 21 aminoácidos del péptido señal). La secuencia subrayada en el último segmento de *P. putida* no es contigua a la secuencia "...FKVQ" que le precede, sino que está separada de ésta por dos alaninas, pero se ha situado así para un mejor ajuste del alineamiento.

LamB (Rigal *et al.*, 1997), como su interacción *in vivo* con PAL, OmpA y Lpp (Bouveret *et al.*, 1995; Clavel *et al.*, 1998). En relación a ésta última, se han estudiado distintas proteínas mutantes TolB de *E. coli* afectadas en su estabilidad o en su capacidad de interacción con las proteínas mencionadas, y se han definido los aminoácidos responsables (Clavel *et al.*, 1998). De esta forma, cambios como el de la histidina 125 a asparagina, o la serina 384 a fenilalanina (numerados sobre la forma madura de la proteína), producen una proteína TolB altamente inestable, mientras que otros como el cambio de la alanina 227 a valina, o la inserción de dos aminoácidos (EL) en la posición 135 de la proteína, provocan la pérdida de las interacciones con Lpp, OmpA y PAL, o sólo con las dos primeras, respectivamente. Estas posiciones, tan importantes para la función de TolB de *E. coli*, se conservan totalmente en TolB de *P. putida* y en casi todas las demás proteínas TolB. Paralelamente al estudio por mutagénesis de TolB de *E. coli*, Clavel y colaboradores (1998) también han analizado que residuos de la proteína PAL influyen en su interacción con TolB. Así, han visto que cambios como el de la treonina 93 a isoleucina, o el glutámico 102 a lisina, provocan una pérdida completa de la interacción, mientras que los de glicina 101 a aspártico, y glutámico 130 a lisina, la disminuyen enormemente. Los aminoácidos de estas posiciones se encuentran bastante conservados en todas las proteínas PAL, siendo idénticos entre PAL de *E. coli* y OprL de *P. putida*

(Fig. 85). Clavel y colaboradores (1998) sugieren que existe un solapamiento entre los dominios de PAL que interaccionan con TolB y con el peptidoglicano. Sin embargo, una vez más, dichos estudios no demuestran que estos aminoácidos intervengan directamente en la unión. Probablemente, en muchos casos, su función sea la de mantener la conformación necesaria para que se produzcan los contactos adecuados, de ahí la presión selectiva que parece existir para conservar la estructura de este dominio carboxilo terminal. En referencia al posible solapamiento entre las regiones de PAL implicadas en la interacción con TolB y el peptidoglicano, es interesante destacar el hecho de que en los experimentos de entrecruzamiento con formaldehído realizados por Bouveret y colaboradores (1995) donde demuestran la interacción *in vivo* entre PAL y TolB, los complejos PAL-TolB se consiguieron solubilizar a 37°C, a pesar de que PAL necesita temperaturas muy superiores para disociarse del peptidoglicano. Esto podría significar que la fracción de PAL que interacciona con TolB no lo hace simultáneamente con el peptidoglicano o, al menos, no interacciona de una forma tan firme.

	90	100	110	120	130	140	150
PAL <i>E. coli</i>	GHADERG	PEYNISL	GERRANAVKMYL	QKGVSA	DQISIVSYGKE	KPAVLGHDEAA	YSKNRRRAVLVY
OprL <i>P. putida</i>	GNTDERG	TREYNMAL	GERRAKAVQRYL	LVLQGVSPA	QLELVSYGEER	PVATGNDEQSWA	QNRRLVELRK
	G	N--L---	RA-----				RR

FIGURA 85. Aminoácidos de PAL de *E. coli* importantes para su interacción con TolB. Se presenta el alineamiento de las regiones carboxilo terminales de PAL de *E. coli* y OprL de *P. putida*, donde se muestran en color azul claro aquellos aminoácidos cuyo cambio provoca una pérdida de la asociación entre PAL de *E. coli* y TolB (Clavel *et al.*, 1998). La mutación de la glicina 101, señalada en color verde, a aspártico afecta tanto a la interacción de PAL con TolB como con el peptidoglicano. El resto de la figura se explica en la leyenda de la figura 83.

Corriente arriba de TolB se localizaron los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA* (Tabla 12). Los productos codificados por estos genes, ampliamente estudiados en *E. coli*, forman un complejo a nivel de la membrana interna en el que las proteínas interaccionan entre sí a través de sus dominios transmembrana (Derouiche *et al.*, 1995; Germon *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1995). Como se puede deducir de los alineamientos múltiples (Fig. 52, 54 y 57), estos dominios coinciden con las regiones más conservadas entre las distintas proteínas. TolQ es la proteína más conservada de todas las del sistema *tol-oprL* (Tabla 9 y Fig. 57). Esto probablemente se deba al hecho de que TolQ es una proteína relativamente pequeña que posee 3 segmentos transmembrana claves para su función y por tanto muy conservados.

Además de los genes ya mencionados, también se encontraron otros dos genes, *orf1*, situado en 5' con respecto a *tolQ*, y *orf2*, situado en 3' con respecto a *oprL*, que

también están presentes en el caso de los demás sistemas Tol secuenciados, aunque sólo se han estudiado en el caso de *E. coli* (Sun y Webster, 1987; Vianney *et al.*, 1996). En base a su localización citoplásmica y a la posesión de un supuesto motivo de "cremallera de leucina" para la unión a ADN, se propuso en un principio que la proteína Orf1 podría actuar como un regulador transcripcional de los genes Tol. Sin embargo, pese a la alta similitud que presentan estas proteínas entre sí (Tabla 10 y Fig. 60), este supuesto motivo no se conserva en el resto de proteínas Orf1, por lo que probablemente no exista en realidad. Además, se ha comprobado que un mutante *orf1::Cm* de *E. coli* (Clavel, 1996; Sun y Webster, 1987) no presenta el fenotipo típico de los mutantes Tol, ni ningún otro fenotipo distintivo apreciable. Con respecto a Orf2, aunque experimentos de fraccionamiento subcelular han demostrado que es una proteína periplásmica, su función se desconoce puesto que un mutante *orf2::Km* de *E. coli* no posee ningún fenotipo obvio que lo diferencie de la cepa silvestre (Clavel, 1996; Vianney *et al.*, 1996). Sin embargo, resultados preliminares no publicados del grupo de J. C. Lazzaroni, sugieren que en este mutante el contenido de la membrana externa está algo alterado (Lazdunski *et al.*, 1998). Además también sugieren una posible interacción de la proteína Orf2 con PAL y TolB, pese a que experimentos previos de entrecruzamiento con formaldehído habían resultado negativos (Lazdunski *et al.*, 1998; Vianney *et al.*, 1996). Los experimentos de fusión de *orf2* de *P. putida* con '*phoA*', demuestran que, pese al resultado negativo de los ensayos de transcripción/traducción *in vitro*, dicha región realmente codifica un producto que se exporta a través de la membrana interna y que probablemente se localice enteramente en el periplasma. La falta de una señal correspondiente a Orf2 en dichos ensayos, podría deberse a una síntesis incompleta del ARN mensajero si es que *oprL* y *orf2* se cotranscriben, o a una traducción ineficiente a causa de una Shine-Dalgarno inadecuada o al diferente uso de codones que *E. coli*. Es probable que este gen no sea muy relevante para el funcionamiento del sistema Tol, porque en *H. influenzae* no existe, al menos corriente abajo de PAL, y en *P. aeruginosa* PAO1, *orf2* está interrumpido por el elemento de inserción IS222 (Fleischmann *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1997).

III. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES *tol* DE *E. coli* CON LOS GENES *tol* DE *P. putida*

Para comprobar el grado de homología existente entre los genes *tol* de *P. putida* y los de *E. coli*, se realizaron ensayos de complementación del fenotipo de tolerancia a colicinas, característico de los mutantes *tol* de *E. coli*. El principal problema que surgió fue la toxicidad asociada a los genes *tol* de *P. putida*, aparecida al transformar *E. coli* 1292 y sus derivados, que provocó entre otras cosas la filamentación de dichas células (Fig. 67 y 68). Un fenómeno similar también se observó al transformar los genes *tol* de

P. aeruginosa en *E. coli* HB101 (Lim *et al.*, 1997). En nuestro caso, la toxicidad se logró reducir en parte, usando un plásmido de bajo número de copias. Sin embargo, los genes *tol* aún en alto número de copias, no resultaron tóxicos para *E. coli* GM1 y sus derivados. No se conocen las causas de este comportamiento tan desigual ni se han encontrado diferencias genotípicas que lo expliquen. Tampoco se ha determinado el(los) gen(es) responsable de dicha toxicidad. En cualquier caso, usando un plásmido de alto número de copias se ha demostrado la existencia de complementación en el caso de la proteína TolR (Fig. 66). TolQ, sin embargo, pese a ser la más conservada de todas las proteínas *tol*, no complementó el defecto a nivel de tolerancia a colicinas de un mutante *tolQ* de *E. coli*. Dado que TolQ juega un papel clave en el establecimiento de muchas de las interacciones necesarias para el funcionamiento del sistema Tol (Germon *et al.*, 1998), cabe la posibilidad de que el grado de homología requerido para la complementación sea aún mayor del existente. Así, por ejemplo, se ha propuesto mediante experimentos de supresión genética, que los residuos de las posiciones 26, 29 y 30 de TolQ de *E. coli* pueden interactuar con el dominio transmembrana de TolA (Germon *et al.*, 1998), y curiosamente TolQ de *P. putida* y TolQ de *E. coli* difieren en los aminoácidos situados en estas tres posiciones. Con respecto a TolA y TolB, el ensayo sólo se pudo realizar en bajo número de copias, y los resultados no mostraron ningún grado de complementación (Fig. 69). Sin embargo, dada la enorme diferencia que existe a nivel de complementación de la cepa *tolR* cuando el gen está en alto o en bajo número de copias (Fig. 66 y 69), no se puede concluir definitivamente que TolA y TolB no complementen, simplemente puede que no lo hagan tan bien como TolR y que debido al bajo nivel de expresión no se pueda apreciar una posible complementación. En cualquier caso, puede que TolA de *P. putida* no sea capaz de complementar porque su tamaño (372 aminoácidos) es considerablemente menor que el de TolA de *E. coli* (421 aminoácidos). Aún así, siempre queda la duda de si los genes *tol* de *P. putida* se están expresando o no adecuadamente en *E. coli*. La respuesta es obvia en el caso de *tolR*, pero no en los demás. Aunque se intentó expresar específicamente estos genes bajo el control del promotor del fago T7, no se consiguieron transformar en la cepa *E. coli* BL21(DE3) que porta la ARN polimerasa del fago T7, ni siquiera en presencia del plásmido pLYSS, que expresa la lisozima de T7 utilizada para degradar parte de la polimerasa y evitar así los efectos secundarios de una posible expresión basal (Studier *et al.*, 1990). Otra aproximación que tampoco se ha intentado es la de estudiar la complementación de otros fenotipos, como la sensibilidad a deoxicolato, etc. Dennis y colaboradores (1996), también han estudiado la capacidad de complementación de los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA* de *P. aeruginosa*. Para ello, clonaron dichos genes en el plásmido pUC19, a favor del promotor P_{lac}. No lograron complementar ninguno de los mutantes de *E. coli* utilizados, incluyendo la cepa mutante TPS300 (*tolR*). Sin embargo, en este último caso el diseño del ensayo no parece factible,

ya que dicen haber utilizado la colicina E1, cuando ésta no precisa de TolR para su entrada en la célula, por lo que un mutante *tolR* presenta el mismo fenotipo que una cepa silvestre frente a esta colicina (James *et al.*, 1996). Un hecho interesante fue la capacidad de TolQ de *P. aeruginosa* para complementar un mutante *exbB* de *E. coli* aunque no pudo complementar un mutante *exbB* de *P. putida*. La explicación podría residir en el hecho de que incluso TolQ de *P. putida* (231 aminoácidos) guarda más similitud con ExbB de *E. coli* (244 aminoácidos) que con ExbB de *P. putida* (329 aminoácidos) (Tabla 9, Capítulo III). Además, Bitter y colaboradores (1993) sugirieron que la causa de que un mutante *P. putida exbB* presentase un claro fenotipo *tonB* (una vez descartado un efecto polar de la mutación), mientras que un mutante *exbB* de *E. coli* presentaba tan sólo un fenotipo *tonB* parcial, podría ser la incapacidad de TolQ de *P. putida* para complementar parcialmente esta mutación, complementación que en cambio sí se producía en *E. coli* (Braun, 1989).

IV. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS DISTINTOS SISTEMAS *tol* EXISTENTES

La organización transcripcional de los genes *tol* no se ha estudiado de manera demasiado exhaustiva, salvo quizá en *E. coli* aunque todos los estudios se han realizado sobre plásmidos. Los numerosos intentos de caracterizar el ARN mensajero siempre han resultado infructuosos debido probablemente a su inestabilidad o a un bajo nivel de transcripción (se ha calculado que la expresión de las proteínas Tol de *E. coli* es unas 100 veces menor que la de proteínas como OmpA o LamB) (Vianney *et al.*, 1996). En base al análisis de diversas fusiones transcripcionales se ha determinado la existencia de dos regiones promotoras P_B y P₁, la primera delante de *tolB* y la otra delante de *orf1*, aunque el mensajero producido a partir de esta último promotor abarcaría todo el conjunto de genes (Vianney *et al.*, 1996) (Fig. 86). Se ha calculado que P_B contribuye al 70% y P₁ al 30% de la transcripción total de los genes *tolB*, *pal* y *orf2*. Además, también se ha demostrado la existencia de un acoplamiento traduccional entre *tolQ* y *tolR*, que están separados por 3 pb (Vianney *et al.*, 1996). En el caso de *P. aeruginosa*, sólo se ha estudiado la transcripción de los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA*, y se ha sugerido mediante análisis por hibridación de ARN ("Northern"), la existencia de dos ARN mensajeros (Fig. 86), un transcrito de 1,5 kb para *tolQ* y *tolR*, y otro de 1, 2 kb para *tolA*, para el cual se ha determinado además el punto de iniciación de la transcripción (aunque el ARNm de *tolA* sólo se ha conseguido detectar tras sobreexpresarlo a partir de plásmido) (Dennis *et al.*, 1996; Lafontaine y Sokol, 1998). Con respecto a *H. influenzae* NTHI, sólo se ha estudiado a nivel de PAL, determinándose el punto de iniciación de la transcripción al final de la región codificante de *tolB* (Sen *et al.*, 1996) (Fig. 86).

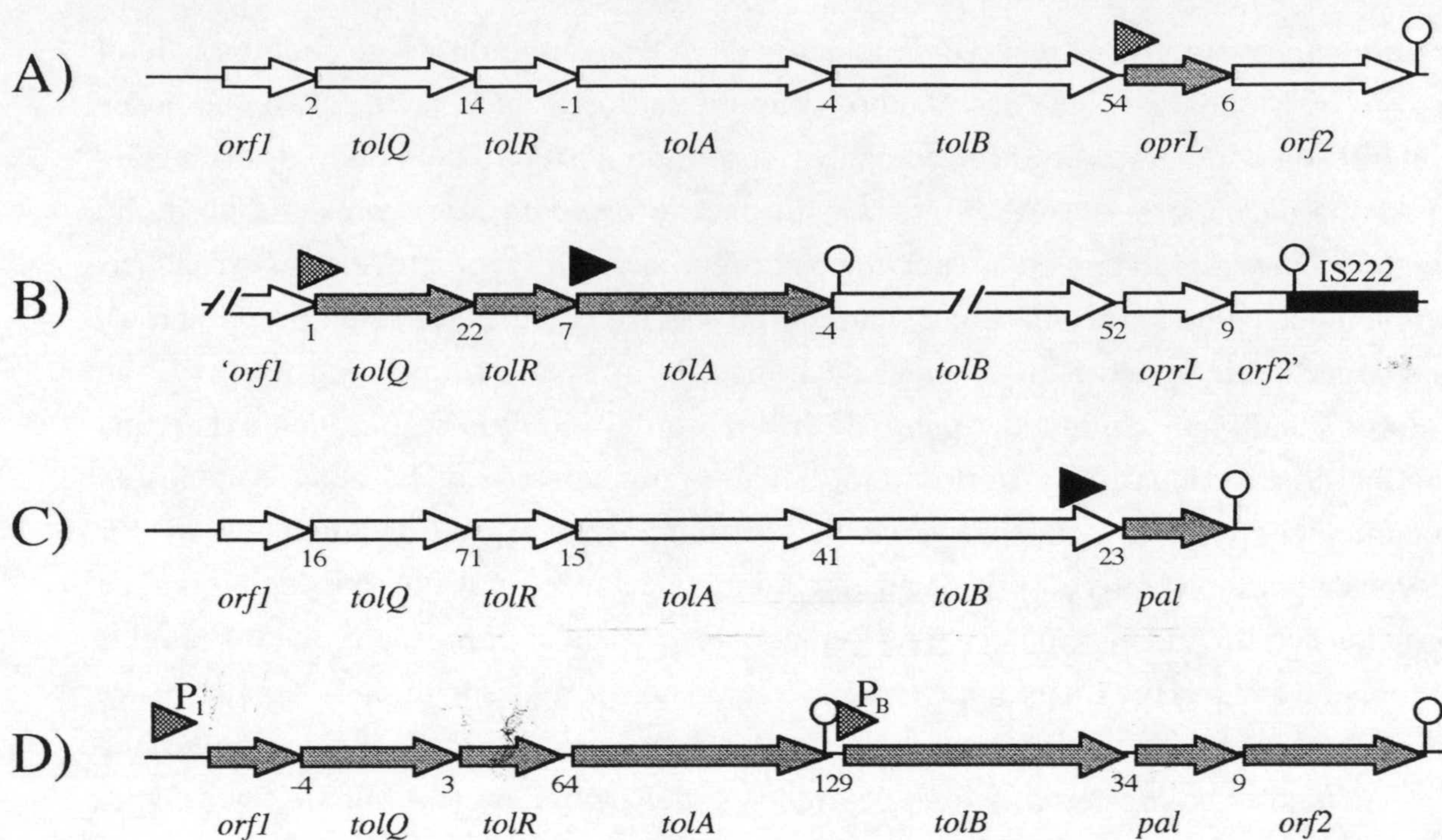


FIGURA 86. Esquema de los datos que se conocen sobre la organización transcripcional de los distintos sistemas *tol*. A, *P. putida* KT2440; B, *P. aeruginosa* PAO1; C, *H. influenzae* Rd; D, *E. coli* K-12. En color gris se indican aquellos genes en los que se ha estudiado la organización transcripcional, y en blanco los que aún no se han estudiado. En color negro se indica la posición del elemento de inserción IS222 de *P. aeruginosa* PAO1 (Lim *et al.*, 1997) y además se señalan los genes *tolB* y *orf1* secuenciados de forma incompleta. Los triángulos sombreados sobre las secuencias indican posibles promotores deducidos mediante evidencias experimentales pero de manera indirecta. Los triángulos de color negro indican promotores en los que se ha determinado el punto de iniciación de la transcripción mediante análisis de extensión a partir de un cebador. Por último, el símbolo "⓪" señala la posición de distintos terminadores transcripcionales teóricos, predichos a partir de los análisis de la secuencia de ADN. Bajo cada figura, en las regiones intergénicas, se indica la distancia en pares de bases existente entre genes contiguos (un número negativo significa que los genes solapan en la cantidad de pares de bases indicada).

Sorprendentemente, Sikkema y colaboradores (1992) han encontrado que la proteína P6 (PAL) de *H. influenzae* NTHI se une a su propio gen (dentro de la región codificante) a través de un dominio en hélice-giro-hélice, y sugieren que P6 podría regular de esta forma su propia expresión. A pesar de ser el primer ejemplo de una proteína de membrana externa que se une a su propio gen, nunca se ha vuelto a publicar nada más sobre el tema. En lo que se refiere a *P. putida*, se han realizado diversos intentos para localizar posibles promotores a través de análisis de extensión a partir de un cebador, sin embargo los resultados no fueron muy claros. Delante de *oprL*, a unos 15 pb por delante de su codón

iniciador parece situarse el punto de iniciación de la transcripción de un promotor débil (Fig. 86). Esta señal se sigue detectando en un mutante *P. putida tolB::ΩKm* que posee un interposón con paradas transcripcionales, insertado a 364 pb del codón de parada de *tolB* (datos no mostrados). Además, la cantidad de proteína OprL presente en dicho mutante era considerablemente menor que en la cepa silvestre, según revelaron los análisis de inmunodetección realizados con el anticuerpo MA1-6 (Llamas *et al.*, en preparación). Esto parece indicar que aunque *oprL* se transcribe mayoritariamente a partir de un promotor situado por encima del punto de inserción del interposón, también existe una débil transcripción a partir de un promotor situado muy cerca de dicho gen (al menos en las condiciones de crecimiento usadas en el experimento). La posibilidad de que la menor cantidad de proteína OprL observada en el mutante se debiese a una cierta inestabilidad de la proteína debido a la ausencia de TolB, quedó descartada al comprobar que los niveles de expresión de OprL en un mutante *tolB::xylE* eran comparables a los de la cepa silvestre (Llamas *et al.*, en preparación). En relación con los genes *tolA* y *tolB*, el fenotipo de una serie de mutantes polares en cada uno de dichos genes parece indicar que *tolA* y *tolB* no se cotranscriben (Llamas *et al.*, en preparación).

Sobre la regulación transcripcional de los operones *tol* se tienen pocos datos. En *E. coli*, por ejemplo, se sabe que la expresión a partir del promotor P₁ está regulada indirectamente por RcsC, una proteína de membrana interna que funciona como elemento sensor del sistema de dos componentes RcsC-RcsB, implicado en la regulación de la síntesis de la cápsula (Clavel *et al.*, 1996; Gottesman, 1995). Además, se ha encontrado que tanto *tolB* como *tolR* y *tolA*, se expresan a mayor nivel cuando baja la temperatura de crecimiento (Clavel *et al.*, 1996). En *P. aeruginosa* se ha demostrado que la expresión de *tolQ*, *tolR* y *tolA* disminuye en presencia de hierro y que también depende de la temperatura (siendo la expresión óptima a 37°C) (Lafontaine y Sokol, 1998). En *P. putida* se ha determinado, mediante análisis de inmunodetección de OprL con el anticuerpo MA1-6, que la expresión de esta proteína depende de la fase de crecimiento, siendo mayor en fase exponencial que en estacionaria (Llamas *et al.*, en preparación).

V. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES *oprL* DE *P. putida*

La similitud que presentan en su extremo carboxilo las proteínas OprL y OprF a nivel de estructura primaria, también se refleja en la semejanza fenotípica que existe entre el mutante *P. putida* 14G3 y un mutante OprF de *P. aeruginosa* (Gotoh *et al.*, 1989; Woodruff y Hancock, 1989). Ambos mutantes exhiben una membrana externa más frágil de lo normal y presentan evaginaciones en su superficie celular a modo de burbujas. Además, el mutante OprF es sensible a choque osmótico y presenta una tasa de

crecimiento notablemente menor a la cepa silvestre en medio LB con 0,1% (p/v) de NaCl. *P. putida* 14G3 por su parte, es incapaz de crecer en dicho medio y es sensible al choque salino hipotónico. El patrón de resistencia/sensibilidad a antibióticos de ambas cepas es similar al de sus correspondientes cepas parentales. Sin embargo, el fenotipo del mutante 14G3 no parece deberse a una ausencia de OprF, ya que al analizar la fracción de proteínas asociadas al peptidoglicano en dicho mutante (Fig. 36), aparece un producto muy abundante con una movilidad similar a la presentada por OprF de *P. aeruginosa* (Hancock *et al.*, 1981), lo que significa que además de estar presente, la asociación de OprF con el peptidoglicano no se ve afectada por la mutación *oprL*. Por otra parte, la fragilidad de la membrana externa en el mutante 14G3 se hace evidente por el gran número de discontinuidades que presenta cuando se observa al microscopio electrónico de transmisión (Fig. 21). Con toda probabilidad, estas discontinuidades son artefactos producidos durante el proceso de preparación de las muestras, ya que de lo contrario, el mutante sería hipersensible a antibióticos, en especial a los hidrofóbicos. Aún así, su presencia pone de manifiesto una mayor debilidad de la envoltura celular provocada probablemente por alguna alteración en su estructura. Esta falta de integridad de la envoltura también se pone de manifiesto por la presencia de "burbujas" sobre la superficie de muchas de las células cuando éstas se observan por microscopía electrónica de barrido (Fig. 20). El hecho de que estas evaginaciones no sean obvias en las muestras de microscopía de transmisión podría deberse, como sucedió en el caso del mutante *lpo* de *E. coli*, a su rotura durante las centrifugaciones usadas para recoger y lavar las células, fundamentalmente durante el paso fijación (Fung *et al.*, 1978; Hirota *et al.*, 1977). La falta de integridad de la envoltura del mutante 14G3 también se refleja en la mayor sensibilidad que esta cepa presenta en comparación con la cepa parental frente a EDTA, SDS y deoxicolato. Aunque la sensibilidad a estos compuestos no está acompañada, inexplicablemente, por una mayor sensibilidad a antibióticos. Otra consecuencia de los defectos provocados por la mutación *oprL* es la tendencia a lisarse que presenta la cepa 14G3 (Fig. 21). Probablemente, los grumos que aparecen en los cultivos del mutante 14G3 sean consecuencia de la adhesión celular debida a los restos celulares (ADN, polisacáridos, etc.) resultantes de dicha lisis.

Puesto que en el mutante 14G3 el gen *oprL* no se había eliminado completamente, debido a que la inserción del mini-Tn5*phoA* generó una proteína de fusión OprL-PhoA, surgió la necesidad de construir un mutante *oprL* nulo. El hecho de que dicho mutante sea viable demuestra que el gen *oprL* no es esencial, al menos para *P. putida*, en contra de la opinión generalizada existente hasta el momento (dada la imposibilidad de obtener un mutante *pal* nulo) de que *pal* era un gen esencial para la supervivencia bacteriana (Chen y Henning, 1987; Hayashi y Wu, 1990; Spinola *et al.*, 1996). Aunque en líneas generales el fenotipo de este mutante nulo, denominado *P. putida* PX, es similar al mostrado por el

mutante 14G3, también existen ciertas diferencias. El mutante PX es capaz de crecer en medio LB con 0.1% (p/v) de NaCl, no presenta discontinuidades en la membrana externa ni evaginaciones en su superficie celular cuando se observa al microscopio electrónico, no comienza a lisarse hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionario y es más sensible que la cepa parental a varios antibióticos (Fig. 37, 40 y 41). Estas diferencias fenotípicas posiblemente se deban al hecho de que, por causas desconocidas, las fusiones traduccionales con el gen *'phoA* con frecuencia resultan tóxicas para las bacterias que las portan (Manoil y Traxler, 1995). En el caso del mutante 14G3 esta toxicidad se acentuaría ante la falta de la proteína OprL silvestre, como demuestra el hecho de que OprL es capaz de complementar parte de los fenotipos mencionados anteriormente. Esta hipótesis se podría comprobar expresando la fusión OprL-PhoA en el mutante PX y comparando el fenotipo resultante, con el de la cepa 14G3. Por otro lado, es importante destacar el hecho de que, aunque los mutantes *pal* de *E. coli* presentan un fenotipo básicamente idéntico al resto de mutantes *tol*, PAL no es necesaria para que las colicinas entren en la célula. Sin embargo, recientemente se han identificado varias mutaciones puntuales en PAL (entre los residuos 88 y 128 de la proteína madura) que causan tolerancia a distintas colicinas (Clavel *et al.*, 1998). Aunque no se ha demostrado, se piensa que en dichos mutantes PAL podría estar interaccionando de forma inadecuada con TolB, lo que provocaría un fenotipo tipo *tolB*. Aplicando este razonamiento en el caso de la cepa 14G3, también podría suceder que el fenotipo de dicho mutante se deba en parte a que la proteína de fusión OprL-PhoA, por su gran tamaño, esté afectando a la función de TolB. En resumen, todos estos hechos no hacen sino confirmar la necesidad de construir mutantes nulos y advierten sobre el peligro de deducir la función de una proteína en base al fenotipo mostrado por mutantes de otro tipo.

El fenotipo de la cepa *P. putida* PX es muy similar al que exhiben los mutantes *pal* de *E. coli*. Así, por ejemplo, se ha visto que los mutantes *tolQ*, *tolR* y *tolA* de *E. coli* producen numerosas vesículas de membrana externa, mientras que los mutantes *tolB* y *pal* producen muy pocas (Bernadac *et al.*, 1998). Esto coincide con nuestras observaciones, ya que ni PX (Fig. 40) ni un mutante *tolB::xylE* de *P. putida* (Llamas *et al.*, en preparación) mostraron "burbujas" en su superficie celular, mientras que sí se observaron numerosas evaginaciones en el caso de los mutantes *tolQ*, *tolR* y *tolA* de *P. putida* (Llamas *et al.*, en preparación). Por otra parte, uno de los fenotipos más característicos de los mutantes *tol-pal* de *E. coli*, es el de la liberación de enzimas periplásmicos al medio extracelular. De hecho, muchos de ellos se aislaron originariamente como mutantes "excretorios" y se denominaron *exc* o *lky* (Bernadac *et al.*, 1998; Fognini-Lefebvre *et al.*, 1987; Lazzaroni y Portalier, 1981; Lazzaroni y Portalier, 1992). En el presente trabajo, se ha demostrado la liberación al medio de cultivo de β -lactamasa de codificación plasmídica, por parte de la cepa *P. putida* PX (Fig. 42). Además, se ha comprobado que este mutante

también libera al medio extracelular otras enzimas periplásmicas, como fosfatasa alcalina y ARNasa periplásmica (datos no mostrados). Estas liberaciones son específicas para proteínas periplásmicas ya que nunca se ha detectado la presencia en el medio de la proteína RpoS, usada como marcador citoplásmico (Fig. 42). Este fenotipo probablemente sea producto de una alteración generalizada en la permeabilidad de la membrana externa. Apoyando esta hipótesis está el hecho de que el mutante *oprL* nulo es más sensible que la cepa silvestre a los detergentes aniónicos SDS y DOC, al agente quelante EDTA y a varios antibióticos (Fig. 37 y 38). Aunque ambas cepas fueron resistentes a las concentraciones de vancomicina y eritromicina suministradas en los discos, posiblemente PX también sea más sensible que la cepa silvestre a dichos antibióticos hidrofóbicos. Esto se podría haber comprobado usando dichos antibióticos a unas concentraciones más adecuadas. En resumen, todo este conjunto de alteraciones sugieren que OprL es una proteína estructural, necesaria para mantener la integridad de la membrana externa.

Los mutantes *lpo* de *E. coli* y *lkyD* de *S. enterica (typhimurium)*, que carecen de la lipoproteína de Braun (Lpp) o que presentan cantidades reducidas de la forma unida covalentemente al peptidoglicano, respectivamente, también presentan un fenotipo similar al mutante *P. putida* PX. Estas cepas liberan proteínas periplásmicas al medio (ARNasa I, fosfatasa alcalina), son sensibles a EDTA, SDS, DOC, Rif y a varios agentes catiónicos (Fung *et al.*, 1978; Hirota *et al.*, 1977). Además, estos mutantes son defectuosos en el proceso de división celular al presentar evaginaciones de la membrana externa a nivel de los sitios de septación (Fung *et al.*, 1978; Rothfield y Justice, 1997). Los mutantes *lkyD* de *Salmonella*, forman incluso pequeñas cadenas de células que se mantiene unidas entre sí a través de puentes de membrana externa (Chakraborti *et al.*, 1986). Los mutantes *P. putida* 14G3 y PX también formaron cadenas celulares, debido posiblemente a defectos en el proceso de división celular, si bien, no se observaron puentes de membrana externa ni ningún otro defecto apreciable en las zonas de unión entre células (Fig. 40 y 41). El hecho de que en la mayoría de los filamentos, las unidades celulares aparezcan claramente delimitadas, a veces con tabiques de división completamente formados, sugiere que la división celular está afectada en uno de sus últimos estadios. El fenómeno de formación de filamentos también se ha observado en los demás mutantes *tol* de *P. putida* analizados por ahora (Llamas *et al.*, en preparación). Dado que los mutantes *tol-pal* de *E. coli* no presentan este fenotipo, probablemente el sistema *tol* no intervenga directamente en el proceso de división celular, aunque en el caso de *P. putida* las alteraciones producidas al mutar estos genes podrían afectar indirectamente a otras proteínas implicadas en la división celular.

VI. POSIBLES FUNCIONES DEL SISTEMA Tol-PAL

Se han propuesto varias funciones para el sistema Tol-PAL. La más probable y evidente es la función estructural. Se sabe que TolB además de interaccionar con porinas triméricas, interacciona con las principales proteínas de membrana externa asociadas al peptidoglicano, Lpp, OmpA y PAL, y que esta última, a su vez, interacciona con OmpA (Bouveret *et al.*, 1995; Clavel *et al.*, 1998; Rigal *et al.*, 1997). También se ha demostrado que OmpA y Lpp poseen un papel estructural, entre otras posibles funciones (Sonntag *et al.*, 1978). En el género *Pseudomonas* OprF, que también está asociada con el peptidoglicano, probablemente desempeñe una función equivalente a la de OmpA (Woodruff y Hancock, 1989). De esta forma, todas estas proteínas y quizá también Orf2 (Lazdunski *et al.*, 1998), formarían un complejo que uniría el peptidoglicano con la membrana externa. Esto concuerda en parte con el hecho de que una mutación en cualquiera de estas proteínas produce un fenotipo similar. Además de este complejo de membrana externa, también existe otro en la membrana interna formado por las proteínas TolQ, TolR y TolA (Derouiche *et al.*, 1995; Germon *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1995). Las mutaciones en estos genes también causan el mismo fenotipo de pérdida de integridad de la membrana externa. Aunque aún no existen evidencias experimentales de la interacción entre ambos complejos, el complejo TolQRA podría intervenir en algún tipo de asociación entre membrana interna, membrana externa y peptidoglicano, gracias a una interacción transitoria de TolA, a través de su dominio central, con porinas de la membrana externa (Derouiche *et al.*, 1996). De hecho, las proteínas del complejo Tol se han localizado de manera preferente en los "sitios de contacto" entre membrana externa e interna (Guihard *et al.*, 1994). De esta forma, las proteínas Tol-Pal podrían formar un complejo proteico a través de la envoltura celular que acercase en cierta medida ambas membranas. En este sentido, aunque se desconoce la estequiometría del complejo Tol, parece que ésta es clave para su estabilidad, como sugiere el hecho de que la sobreexpresión de un derivado periplásmico del dominio carboxilo terminal de TolA en células de *E. coli* silvestres, provoca un aumento de la sensibilidad a DOC, la liberación de enzimas periplásmicos y una mayor tolerancia a ciertas colicinas (Levengood-Freyermuth *et al.*, 1993). Esto también podría explicar por qué al complementar el mutante *P. putida* PX con el gen *oprL* no se recupera por completo el fenotipo silvestre.

Otra de las funciones del sistema Tol-PAL, compatible con la anterior, podría ser la de contribuir a la integración de nuevos componentes en la membrana externa, quizá ayudando a atravesar el peptidoglicano a aquellas moléculas cuyo peso molecular supere el "límite de permeabilidad" del mismo, calculado en unos 50 kDa para proteínas globulares (Demchick y Koch, 1996). En este sentido, y de manera análoga a su función en la entrada de colicinas, se ha propuesto que las proteínas Tol podrían intervenir en la

exportación y ensamblaje de las porinas. Sin embargo, parece que las mutaciones en los genes del sistema Tol-PAL no impiden este proceso, ya que dichos mutantes presentan porinas correctamente ensambladas en su membrana externa, aunque algunas como OmpF y LamB aparecen en menor cantidad (Lazzaroni *et al.*, 1986). Aunque su papel podría ser simplemente catalítico, de manera que en dichos mutantes habría un retraso en la velocidad de transporte de algunos componentes de la membrana externa. En el caso del mutante *P. putida* PX, la cantidad y apariencia de los LPS analizados por electroforesis (Fig. 71) son similares a los de la cepa silvestre por lo que parece que este componente no se ve afectado por dicha mutación. Lo mismo ocurre en el resto de mutantes *tol* de *P. putida* analizados hasta ahora (Llamas *et al.*, en preparación). Sin embargo, se ha encontrado que dichos mutantes no son capaces de utilizar, o crecen muy lentamente, en presencia de compuestos como fructosa, arginina o glicerol, cuando éstos se suministran como única fuente de carbono (Llamas *et al.*, en preparación). Aunque aún no se ha analizado la composición de la membrana externa en dichos mutantes, estos datos sugieren la presencia de algún tipo de defecto a nivel de las porinas que sirven de entrada a dichos compuestos.

VII. LA CEPA *P. putida* DOT-OX3 ESTÁ MUTADA EN EL GEN *wzy*, QUE CODIFICA LA POLIMERASA DEL ANTÍGENO O

En los últimos diez años se ha avanzado mucho en el estudio de la síntesis y estructura química de los LPS, así como en la genética molecular de su ensamblaje (Heinrichs *et al.*, 1998; Raetz, 1996; Reeves, 1994; Whitfield *et al.*, 1997). La mayoría de los trabajos se han realizado con enterobacteriáceas, aunque *Pseudomonas aeruginosa* también se ha estudiado extensamente (Burrows *et al.*, 1996; Dasgupta y Lam, 1995; de Kievit *et al.*, 1995, Rocchetta *et al.*, 1998). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la genética de los LPS en bacterias del suelo. En *P. putida*, por ejemplo, existe un número muy limitado de estudios, en su mayoría sobre composición química de los LPS (de Weger *et al.*, 1987a; de Weger *et al.*, 1989; Dekkers *et al.*, 1998). En el presente trabajo se ha aislado y caracterizado un mutante de *P. putida* que carece de la cadena lateral O del LPS, y que se mostró más sensible que la cepa silvestre a varios compuestos químicos. El gen mutado parece codificar la polimerasa del antígeno O de *P. putida*, y se denominó *wzy* conforme a la nueva nomenclatura existente. Los mutantes defectuosos en dicha polimerasa sintetizan LPS denominados "semirugosos" (SR-LPS) debido a que la enzima WaaL, encargada de unir el polímero de superficie a la molécula de lípido A-oligosacárido de la región central, aún es capaz de unir una unidad repetitiva O a dicha molécula (de Kievit, 1995; Raetz, 1996; Reeves, 1994). Los análisis electroforéticos del patrón de LPS de la cepa DOT-OX3, no han sido lo suficientemente resolutivos como para poder

apreciar la presencia de dicha unidad repetitiva (Fig. 71). Por otro lado, el hecho de que el anticuerpo monoclonal 7.3B no reconozca dicha molécula de LPS modificada, sugiere que al menos dos unidades O repetitivas deben participar en la estructura del epítipo reconocido por este anticuerpo. Con respecto a la secuencia de proteína, es sorprendente que la secuencia de aminoácidos Wzy de *P. putida* presente alguna similitud con la de la proteína Wzy de *S. enterica* (*muenchen*), porque generalmente las proteínas Wzy suelen mostrar cierta similitud estructural (perfiles de hidrofobicidad parecidos), pero muy poca identidad a nivel de estructura primaria, incluso dentro de la misma especie (Curd *et al.*, 1998; Morona *et al.*, 1994). Basándose en la alta hidrofobicidad que presentan las proteínas Wzy, se ha sugerido que éstas son proteínas integrales de la membrana interna. El análisis estructural de la secuencia parcial de Wzy de *P. putida* predecía 7 segmentos transmembrana (Fig. 75), y su distribución fue idéntica a la de los 7 segmentos carboxilo terminales predichos para Wzy de *S. enterica* (*muenchen*) (Brown *et al.*, 1992; Morona *et al.*, 1994). Además, las proteínas Wzy presentan generalmente tres aminoácidos mayoritarios, a saber, leucina, isoeucina y fenilalanina (de Kievit *et al.*, 1995; Morona *et al.*, 1994). Estos tres aminoácidos comprenden el 27, 30, 30 y 37% del total de aminoácidos de las proteínas Wzy de *S. enterica* (*typhimurium*), *S. enterica* (*muenchen*), *P. aeruginosa*, y *Shigella flexneri*, respectivamente (de Kievit *et al.*, 1995). En la proteína Wzy de *P. putida*, estos aminoácidos representan el 25,2% del total. En resumen, todos estos hechos apoyan la idea de que el gen mutado en *P. putida* DOT-OX3 codifica la polimerasa del antígeno O.

Otra de las características compartidas por todos los genes *wzy* secuenciados hasta la fecha y, en general, por todos los genes de la agrupación *rfb*, es el bajo porcentaje de contenido en G+C que presentan sus secuencias codificantes en comparación con el contenido medio de G+C del genoma (Morona *et al.*, 1994). Además, los genes *wzy* también poseen una alta proporción de codones poco frecuentes (codones moduladores). Estos datos sugieren que todos estos genes deben haber evolucionado en una especie que poseía un bajo contenido en G+C y/o que están sujetos a presión selectiva debido a la regulación traduccional a través de especies de ARN transferentes poco frecuentes (Morona *et al.*, 1994). El gen *wzy* de *P. putida*, sin embargo, posee un uso de codones y un contenido en G+C muy similar al del resto del genoma. Nosotros hemos clonado y secuenciado otro gen de *P. putida* implicado en la biosíntesis del LPS (Rodríguez-Herva, datos sin publicar), con alta similitud (62,5% de identidad) con el gen *wbpL* de *P. aeruginosa* (Burrows *et al.*, 1996). En *P. aeruginosa*, *wbpL* forma parte de la agrupación de genes *rfb* y tiene un contenido menor en G+C (55,5%) que la media del genoma (66%). Esto no ocurre con el gen *wbpL* de *P. putida* que presenta un 60,9% de G+C, muy parecido al contenido medio del cromosoma de *P. putida* (60%). En este

sentido parece que estos genes de *P. putida* difieren de los restantes genes de biosíntesis de LPS secuenciados hasta la fecha.

Por otra parte, en los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, los genes implicados en la biosíntesis del antígeno O y en su ensamblaje se localizan en la agrupación de genes *rfb*. En cambio, la localización del gen *wzy* varía dependiendo de la especie de que se trate. Así, en los grupos A, B y D1 de *Salmonella*, *wzy* se encuentra muy alejado de la agrupación *rfb*, mientras que en los grupos C2 (*muenchen*), D2, D3 y E1, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *P. aeruginosa*, el gen *wzy* se localiza dentro de la agrupación de genes *rfb* (agrupación *wbp* en el caso de *P. aeruginosa*) (de Kievit *et al.*, 1995; Burrows *et al.*, 1996). En *P. putida*, el gen *wzy* se encuentra muy alejado de la agrupación *rfb* (*wbp*) puesto que los genes *wzy* y *wbpL* están separados al menos 1.400 kb según se determinó por hibridación de ADN total de *P. putida* KT2440 tras digerirlo enzimáticamente y separarlo por electroforesis en campo pulsante (Ramos-Díaz, sin publicar).

VIII. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES *wzy* y *wzy oprL* DE *P. putida*

Las bacterias gram negativas son resistentes a un gran número de agentes nocivos gracias a que su membrana externa funciona como una barrera de permeabilidad altamente efectiva (Lugtenberg y van Alphen, 1983). Las moléculas de LPS aniónicas de dicha membrana se asocian entre sí a través de uniones con cationes divalentes y, además, también forman fuertes asociaciones con las moléculas de proteínas colindantes. Estas interacciones son críticas para el mantenimiento de dicha barrera (Hancock, 1991). Confirmando esta hipótesis está el hecho de que mutantes de *E. coli* y *S. typhimurium* que carecen de la parte interna de la región central del LPS, denominados "deep rough", son hipersensibles a detergentes y a EDTA, al presentar una membrana externa con una permeabilidad alterada, posiblemente debido a interacciones debilitadas entre las moléculas de LPS y/o a la presencia de fosfolípidos en la monocapa externa de dicha membrana (Nikaido y Vaara, 1985). Los mutantes *P. putida* DOT-OX3 (*wzy*) y DOT-OX5 (*wzy oprL*) también presentaron un fenotipo de permeabilidad alterada, mostrándose más sensibles a algunos compuestos hidrofóbicos y a EDTA, que la cepa parental. Se sabe desde hace tiempo que este agente quelante, al secuestrar los cationes divalentes que están estabilizando las interacciones antes mencionadas, causa la separación de cantidades significativas de LPS de la membrana, junto con pequeñas cantidades de proteínas y fosfolípidos (Leive, 1965). También ha visto que se necesita una concentración de EDTA menor de la usual para provocar dichas pérdidas en aquellas cepas que contienen LPS con cadenas laterales más cortas (Marvin *et al.*, 1989). Esto explicaría la mayor sensibilidad a

EDTA presentada por los mutantes *P. putida wzy* y *P. putida wzy oprL*, que carecen casi por completo del antígeno O del LPS. Por otro lado, el mutante *wzy* presentó una capacidad de migración reducida cuando ésta se ensayó en medio LB semisólido. La falta de movilidad como resultado de mutaciones en los LPS se ha descrito previamente en el caso de mutantes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, mutantes "sin heptosa" de *E. coli* K-12 y mutantes "deep rough" de *S. typhimurium* (Ames *et al.*, 1974; Havekes *et al.*, 1976; de Maagd *et al.*, 1989; Priefer, 1989). Al menos en este último caso, la falta de movilidad se debió a una incapacidad de sintetizar flagelo. Recíprocamente, cuando se seleccionan mutantes no móviles, además de mutantes sin de flagelo aparecen con cierta frecuencia mutantes carentes de la cadena lateral O del LPS (de Maagd *et al.*, 1989). Sin embargo, las bases moleculares de dicho defecto aún no se han determinado. Convendría destacar que en los ensayos de migración en medio semisólido influyen diversos factores: el comportamiento quimiotáctico, el crecimiento bacteriano, así como la movilidad en un ambiente cuasi rígido, entre otros (Wolfe and Berg, 1989). De esta forma, durante el proceso de migración, las células crecen y se dividen, consumiendo los compuestos del medio circundante, debido a lo cual se forman gradientes espaciales de nutrientes que actúan como atrayentes, provocando un desplazamiento de las células hacia los territorios vírgenes cercanos, que son entonces poblados mediante nuevos procesos de crecimiento y división celular. Esto quiere decir que diferencias en la tasa de crecimiento y división celular provocarían diferencias en el comportamiento migratorio. En nuestro caso, esto queda descartado porque las cepas poseen tiempos de generación similares que de ningún modo serían responsables de las diferencias tan significativas que presentan sus patrones de migración. Además, las observaciones al microscopio óptico de contraste de fases de la cepa *P. putida wzy* muestran un defecto de movilidad, aunque no se ha determinado si se debe a una carencia de flagelo o si éste está presente pero no es funcional. Con respecto a los mutantes *P. putida oprL* y *wzy oprL*, uno podría pensar que su tendencia a formar filamentos (que también se producen en medio sólido), puede producir una disminución del número de células disponibles para explorar y colonizar nuevos territorios, con lo cual se reducirá la tasa de migración. Si bien este parámetro probablemente sea importante, también existen otros factores a considerar, seguramente más claves. Dado que *P. putida* posee un flagelo de inserción polar, cuando se forman filamentos celulares como los observados en los mutantes *oprL*, posiblemente sólo las células distales posean flagelo. Incluso en el improbable caso de que todas las unidades de una cadena celular portasen un flagelo funcional (a pesar de que el tabique de división entre células aún está presente), éste seguramente no podría desempeñar su función correctamente en tales circunstancias debido a impedimentos de tipo físico. Mediante microscopía óptica de contraste de fases se ha podido observar que, cuando los filamentos celulares formados por *P. putida oprL* se mueven, lo hacen de forma serpenteante y a una velocidad mucho menor que en el caso

de las células individuales. Por último, otro dato a tener en cuenta son las características que presenta un medio semisólido con una concentración de agar del 0,3% (p/v). Este tipo de medio muestra una textura granulosa, heterogénea, con partículas de agar de un tamaño de varios micrómetros, de manera que a escala bacteriana se asemejaría a un laberinto tridimensional (Wolfe and Berg, 1989). Las células bacterianas se mueven ejecutando desplazamientos en línea recta interrumpidos por virajes aleatorios periódicos. En un medio homogéneo, por ejemplo en un medio líquido estándar, las células avanzan de manera más eficiente cuanto más infrecuentes son los virajes. En el caso del medio semisólido ocurre prácticamente lo opuesto, las células se desplazan de manera más eficaz cuando los virajes son relativamente frecuentes. La razón es que las células que viran poco, se quedan atrapadas durante más tiempo en las partículas de agar cuando colisionan con ellas. Siguiendo este razonamiento, parece obvio que los filamentos celulares de *P. putida oprL* se muevan con más dificultad en un medio de tales características, debido por una parte a su mayor tamaño, y por otra al tipo de movimiento que exhiben, lento y carente de los enérgicos virajes propios de las células individuales. Estos filamentos celulares se quedarán, con mucha probabilidad, atrapados en el agar. Por último, mencionar que el mutante doble, debido a la suma de ambos defectos de movilidad, no mostró capacidad alguna de migrar en dicho medio, ni siquiera alargando el tiempo de incubación.

IX. SUPERVIVENCIA EN SUELO Y ADHESIÓN A SEMILLAS DE MAÍZ DE LOS MUTANTES *wzy*, *oprL* y *wzy oprL* DE *P. putida*

Las características que permiten a los microorganismos sobrevivir y colonizar un ecosistema como el suelo, son muy variadas y se comprenden poco. El suelo es, además, una materia de difícil estudio debido a la enorme heterogeneidad y complejidad de sus propiedades tanto biológicas como físico-químicas. En el presente trabajo, aprovechando la disponibilidad de mutantes de *P. putida* afectados a nivel de la envoltura celular, se analizó la influencia que dichos defectos tenían sobre la capacidad de colonización del suelo. Por otra parte, es bien sabido que muchas *Pseudomonas* presentan la capacidad de potenciar el crecimiento de plantas, a través de procesos como la producción de sideróforos, antibióticos, cianuro de hidrógeno, hormonas de crecimiento vegetal, procesos de competencia por nutrientes con microorganismos patógenos, etc (Dowling y O'Gara, 1994; O'Sullivan y O'Gara, 1992). Para ejercer su actividad como agentes de biocontrol, estas bacterias deben colonizar de forma eficiente la rizosfera y la superficie de la raíz vegetal, para lo cual es importante, en muchas ocasiones, que las bacterias presenten una buena capacidad de adhesión a distintas superficies (Vande Broek y Vanderleyden, 1995). En el presente estudio, se analizó si las mutaciones *wzy* y *oprL*

afectaban a la capacidad de adhesión de *P. putida* a semillas de maíz. Este tipo de ensayo se eligió por su fácil realización y porque en muchas ocasiones el proceso de biocontrol comienza con la aplicación de los inóculos bacterianos sobre las semillas, antes de la siembra.

En lo referente al primer punto, la colonización de suelos no estériles, se pudo observar como los mutantes sencillos, *wzy* y *oprL*, se establecieron a una densidad de población entre uno y dos órdenes de magnitud inferior a la de la cepa silvestre. La supervivencia del doble mutante fue particularmente pobre. Ahora bien, habría que introducir un factor de corrección en el caso de los mutantes *oprL* debido al fenotipo de filamentación, suponiendo que ésta también se produzca en suelos, situación bastante probable. Cuando se establece la correlación entre DO_{660} y UFC/ml para la cepa *P. putida* PX y se compara con la de la cepa parental se puede observar entre ellas una diferencia de casi un orden de magnitud, seguramente a causa de la formación de filamentos. Pero en el caso de las células introducidas en suelo, también intervendrían cuestiones como la supervivencia bacteriana, de manera que tampoco bastaría con incrementar simplemente los valores de UFC/g de suelo en un orden de magnitud, puesto que cada filamento, independientemente del porcentaje de células inviables que posea, daría lugar a la formación de una única colonia. Por lo tanto y de forma grosera, el número real de células debe estar en algún punto comprendido entre el valor de UFC/g de suelo obtenido en el ensayo, y un valor 10 veces superior. Teniendo en cuenta esto, parece que las mutaciones sencillas tan sólo provocan una leve disminución en la capacidad de colonizar el suelo (de casi un orden de magnitud). En cambio, cuando las dos mutaciones se combinan, se observa una bajada significativa y progresiva en el número de UFC/g de suelo, que a los 30 días se sitúa a más de 3 órdenes de magnitud por debajo de la cepa silvestre, incluso teniendo en cuenta las correcciones anteriormente mencionadas. En este sentido, parece producirse un efecto sinérgico sobre la capacidad de colonizar el suelo que, en cambio, no se observa cuando se realizan los ensayos de sensibilidad a distintos compuestos. Se supone que la motilidad bacteriana confiere a las bacterias ventajas de supervivencia, al permitirles competir por los ambientes más favorables evitando a la vez las condiciones perjudiciales. Sin embargo, el desplazamiento mediado por flagelos explica tan sólo una pequeña parte del movimiento bacteriano que se observa a nivel del suelo, donde existen otros, probablemente más importantes, como el movimiento mediado por las raíces de las plantas o por el agua de percolación (Kluepfel, 1993; Vande Broek y Vanderleyden, 1995). Para comprobar el papel que desempeña la movilidad por flagelos en el proceso de colonización del suelo, se analizó el comportamiento de un mutante *fliP* no móvil de *P. putida* DOT-T1 (Duque y Segura, datos sin publicar). El comportamiento de dicho mutante en suelo fue similar al de su cepa parental, de lo que se deduce que la movilidad no juega un papel destacado en la colonización del suelo, al menos en las condiciones

experimentales usadas. Experimentos de colonización de maíz por parte de *P. putida* *wzy*, *oprL* y *wzy oprL* usando el marcador Lux⁺ (datos no mostrados), demostraron una incapacidad de estos mutantes para colonizar de forma eficiente el sistema radicular de dicha planta (Reniero *et al.*, en preparación). Los mutantes sencillos, aunque se detectaron en la base de la raíz, fueron incapaces de colonizar las partes más jóvenes y profundas. Lo mismo sucedió con el mutante *fliP* de *P. putida* DOT-T1 mencionado anteriormente. El doble mutante apenas se detectó en una raíz de 14 días. Estas observaciones corroboran otras previas que sugieren que la motilidad juega un papel importante en la colonización de la raíz. Otros dato a favor de la importancia de la movilidad, es que la mayoría de las bacterias de la rizosfera estudiadas hasta la fecha son móviles, y también que la mayoría de los mutantes deficientes en colonización seleccionados son inmóviles (de Weger *et al.*, 1987b; Dekkers *et al.*, 1998; Simons *et al.*, 1996; Vande Broek y Vanderleyden, 1995). Sin embargo, Howie y colaboradores (1987) no observaron diferencia alguna entre mutantes no flagelados de *P. fluorescens* y su cepa parental, en la capacidad de colonizar la raíz de trigo. La causa de estas diferencias no está clara, aunque se han achacado a diferencias en el diseño experimental. De cualquier forma, sirven para ilustrar lo complicado que es determinar la contribución de cada uno de los factores que intervienen en el proceso de colonización, factores tales como la supervivencia, el crecimiento, la adhesión y la distribución bacteriana a lo largo de la raíz (de Weger *et al.*, 1995; Vande Broek y Vanderleyden, 1995).

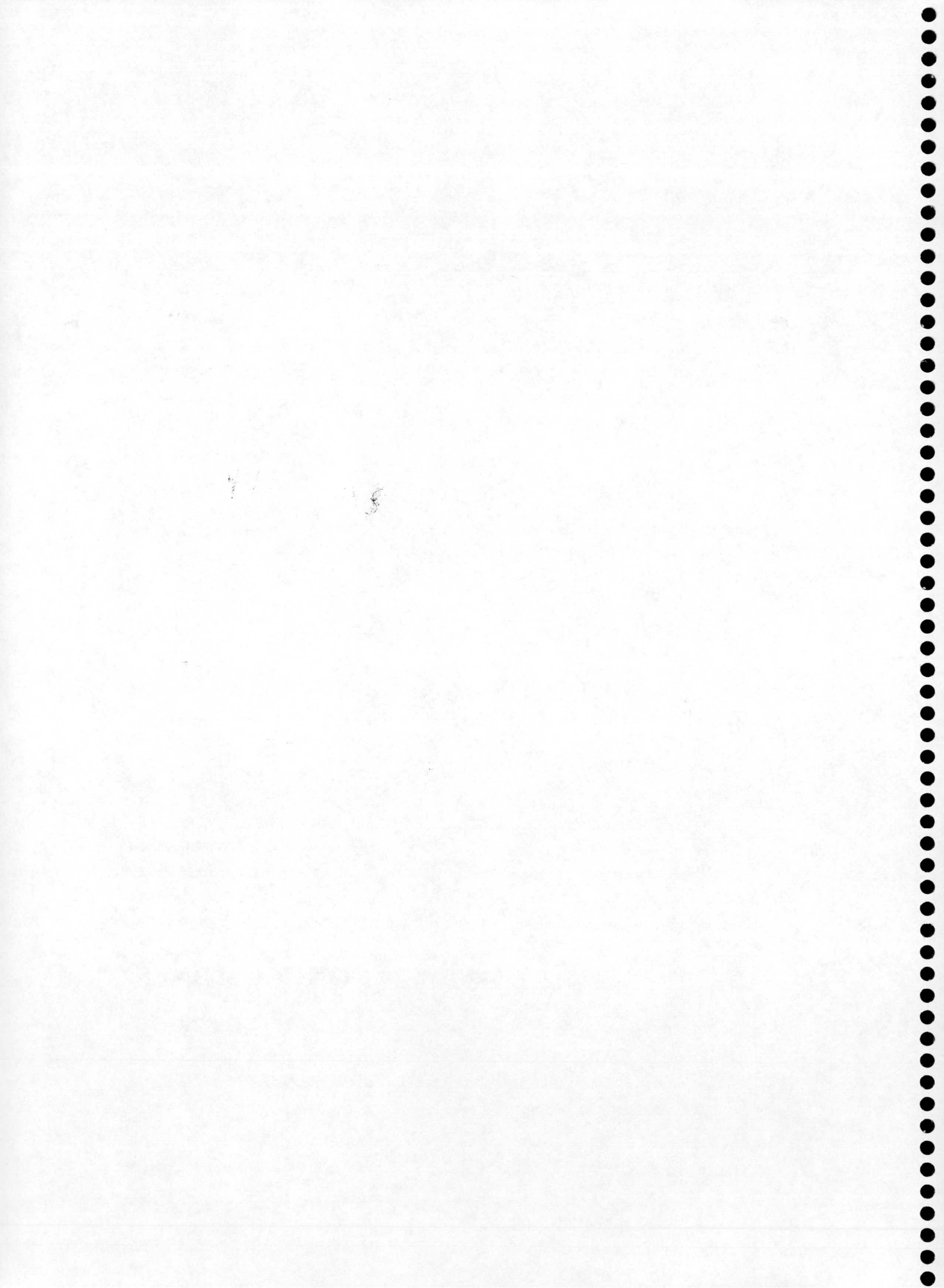
En lo referente a la capacidad de adhesión a semillas de maíz presentada por los distintos mutantes, no parecen existir cambios significativos si se aplica el factor de corrección antes mencionado en el caso de las cepas *oprL* y *wzy oprL*. En estudios realizados por de Weger y colaboradores (1989a) con mutantes de *P. putida* y *P. fluorescens* afectados en el antígeno O del LPS, pero móviles, no se encontró ninguna diferencia en la capacidad de adhesión de dichas cepas a raíces de patata, aunque sí en su capacidad de colonización puesto que fueron incapaces de colonizar las partes más profundas de la raíz. En las *Pseudomonas* se han identificado varias moléculas de superficie implicadas en la adhesión a raíces, como los pili, la proteína OprF y una proteína sin identificar que interacciona con una glicoproteína (denominada aglutinina) que se encuentra en la raíz de judías (Buell y Anderson, 1992; De Mot *et al.*, 1992; Vesper, 1987). Aún no se sabe a ciencia cierta el número de componentes de la superficie bacteriana que están implicados en el proceso de adhesión, ni si interaccionan de forma sinérgica para determinar conjuntamente las propiedades de adhesión celular. Probablemente, los componentes de la superficie celular que intervienen en cada caso, varíen ligeramente dependiendo de cada sistema bacteria-planta concreto. De los resultados obtenidos en este trabajo se deduce que ni OprL ni el antígeno O de los LPS

son importantes para la adhesión de *P. putida* a semillas de maíz, al menos en las condiciones experimentales utilizadas.

Aunque la movilidad parece ser el factor más crítico en la colonización de la raíz de maíz por parte de los mutantes *wzy* y *oprL P. putida*, en el caso del doble mutante el factor clave sería la supervivencia, que a la vez explicaría la incapacidad de dicha cepa para establecerse en el suelo a niveles normales. La envoltura celular y demás estructuras de la superficie celular proporcionan a las bacterias protección frente a distintos eventos perjudiciales, como la desecación, la predación, la presencia de compuestos nocivos, etc., de manera que cuando ésta presenta alteraciones importantes la supervivencia del microorganismo se puede ver gravemente comprometida.

Por último, mencionar brevemente la importancia de realizar ensayos de competencia en lugar de ensayos de colonización con cada cepa individualmente, ya que se han dado casos de microorganismos mutados en genes que aparentemente no influían en la colonización de la raíz cuando se ensayaban las cepas por separado pero que, sin embargo, parecían jugar un papel importante cuando se hacían ensayos de competencia con la cepa silvestre (Dekkers *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES



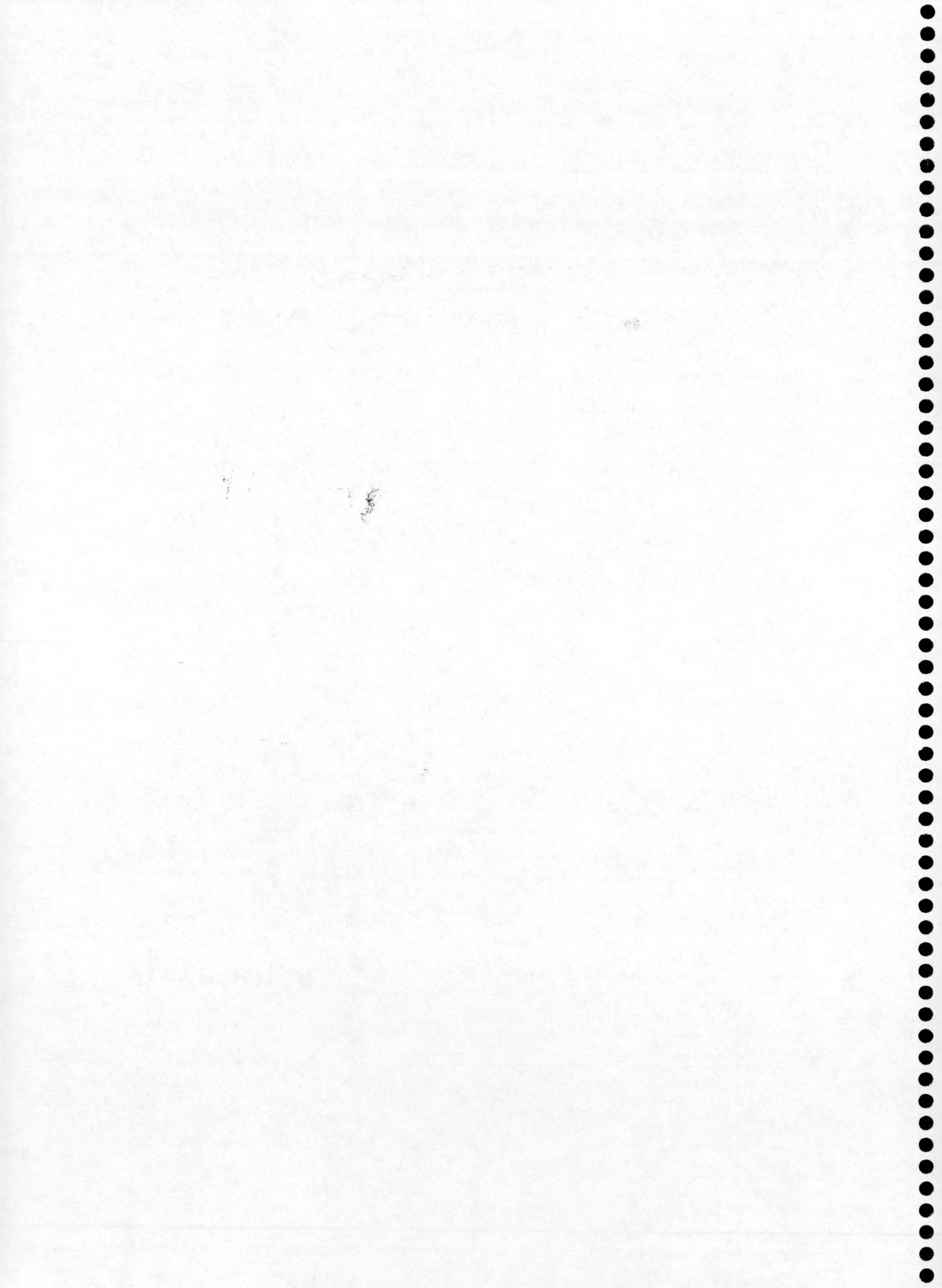
CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. El gen mutado en la cepa *Pseudomonas putida* 14G3 codifica la proteína OprL de *Pseudomonas putida*, que pertenece a la familia PAL de lipoproteínas asociadas a peptidoglicano de bacterias gram negativas.
2. La ausencia de la proteína OprL, en *Pseudomonas putida*, provoca un aumento de la sensibilidad celular a diversos compuestos químicos junto con la liberación de proteínas periplásmicas al medio extracelular, lo que implica que OprL posee una función principalmente estructural, participando en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa. Además, la presencia de OprL también es importante, de manera directa o indirecta, durante los estadios finales de la división celular.
3. La proteína OprL no es esencial para la supervivencia de *Pseudomonas putida*, puesto que los mutantes *oprL* fueron viables tanto en las condiciones de cultivo en laboratorio utilizadas a lo largo de este trabajo, como durante los experimentos que simulaban las condiciones de su hábitat natural.
4. El gen *oprL* se localiza dentro de un grupo de genes cuyos productos presentan gran similitud con los del sistema Tol-Pal de *Escherichia coli* y otras bacterias gram negativas. El orden de dichos genes en *P. putida* es *orfU*, *tolQ*, *tolR*, *tolA*, *tolB*, *oprL* y *orf2*. Esta organización génica se conserva entre los distintos sistemas *tol-pal* secuenciados hasta el momento. El alto grado de conservación del sistema Tol-Pal sugiere que la función/es desempeñadas por este complejo proteico son de gran importancia para la célula.
5. La función del producto codificado por el gen *tolR* de *Pseudomonas putida* es equivalente a la de la proteína TolR de *Escherichia coli*, como se deduce del hecho de que es capaz de complementar el fenotipo de tolerancia a colicinas de un mutante *tolR* de dicha bacteria.

6. El gen interrumpido por el minitransposón miniTn5*luxABK*m en la cepa *Pseudomonas putida* DOT-OX3 posiblemente codifique la enzima Wzy, responsable de la polimerización del cadena lateral O del lipopolisacárido de *Pseudomonas putida*.
7. En *Pseudomonas putida*, la función de la proteína OprL no parece importante para el ensamblaje del lipopolisacárido en la membrana externa de la célula, según se deduce del fenotipo mostrado por el mutante *oprL*, y del análisis electroforético de la fracción polisacáridica de dicha bacteria.
8. Tanto la mutación del gen *oprL* como la del gen *wzy* influyen en la viabilidad de las células de *Pseudomonas putida* en suelo, efecto que se acentúa cuando ambas mutaciones se combinan.
9. Las mutaciones *oprL* y *wzy*, ni combinadas ni de forma independiente, influyen en las propiedades de adhesión de *Pseudomonas putida* a semillas de maíz.

BIBLIOGRAFÍA



- Abergel, C., A. Rigal, S. Chenivesse, C. Lazdunski, J. M. Claverie, E. Bouveret y H. Bénédicti. 1998. Crystallization and preliminary crystallographic study of a component of the *Escherichia coli* Tol system: TolB. *Acta Crystallogr. D* **54**:101-104.
- Abril, M.-A., C. Michán, K. N. Timmis y J. L. Ramos. 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.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Ames, G. F., E. N. Spudich y H. Nikaido. 1974. Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutations. *J. Bacteriol.* **117**:406-416.
- Anderson, T. F. 1951. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **13**:130.
- Andersson, S. G., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, H. H. Winkler y C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**:133-140.
- Antoine, R. y C. Loch. 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol. Microbiol.* **6**:1785-1799.
- Aono, R., N. Tsukagoshi y M. Yamamoto. 1998. Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the *mar-sox* regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **180**:938-944.
- Ariza, R. F., S. P. Cohen, N. Bachhawat, S. B. Levy y B. Demple. 1994. Repressor mutations in the *marRAB* operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**:143-148.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl (eds.) 1999. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Battisti, L., J. C. Lara y J. A. Leigh. 1992. Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5625-5629.
- Bauer, K., M. Struyve, D. Bosch, R. Benz y J. Tommassen. 1989. One single lysine residue is responsible for the special interaction between polyphosphate and the outer membrane porin PhoE of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **264**:16393-16398.
- Bayer, M. E. y J. L. Sloyer. 1990. The electrophoretic mobility of gram-negative and gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis. *J. Gen. Microbiol.* **136**:867-874.
- Beck, E. y E. Bremer. 1980. Nucleotide sequence of the gene *ompA* coding the outer membrane protein II of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **8**:3011-3024.
- Becker, A., H. Kuester, K. Niehaus y A. Puehler. 1995. Extension of the *Rhizobium meliloti* succinoglycan biosynthesis gene cluster: identification of the *exsA* gene encoding an ABC transporter protein, and the *exsB* gene which probably codes for a regulator of succinoglycan biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **249**:487-497.
- Bénédicti, H., C. Lazdunski y R. Llobès. 1991. Protein import into *Escherichia coli*: colicins A and E1 interact with a component of their translocation system. *EMBO J.* **10**:1989-1995.
- Bénédicti, H., R. Llobès, C. Lazdunski y L. Letellier. 1992. Colicin A unfolds during its translocation in *Escherichia coli* cells and spans the whole cell envelope when its pore has formed. *EMBO J.* **11**:441-447.
- Bernadac, A., M. Gavioli, J.-C. Lazzaroni, S. Raina y R. Llobès. 1998. *Escherichia coli tol-pal* mutants form outer membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **180**:4872-4878.

- Biswas, G. D., J. E. Anderson y P. F. Sparling.** 1997. Cloning and functional characterization of *Neisseria gonorrhoeae* *tonB*, *exbB* and *exbD* genes. *Mol. Microbiol.* **24**:169-179.
- Bitter, W., J. Tommassen y P. J. Weisbeek.** 1993. Identification and characterization of the *exbB*, *exbD* and *tonB* genes of *Pseudomonas putida* WCS358: their involvement in ferric-pseudobactin transport. *Mol. Microbiol.* **7**:117-130.
- Blair D. F., D. Y. Kim y H. C. Berg.** 1991. Mutant MotB proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:4049-4055.
- Blatny, J. M., T. Brautaset, H. C. Winther-Larsen, K. Haugan y S. Valla.** 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:370-379.
- Bouveret, E., A. Rigal, C. Lazdunski y H. Bénédicti.** 1997. The N-terminal domain of colicin E3 interacts with TolB which is involved in the colicin translocation step. *Mol. Microbiol.* **23**:909-920.
- Bouveret, E., A. Rigal, C. Lazdunski y H. Bénédicti.** 1998. Distinct regions of the colicin A translocation domain are involved in the interaction with TolA and TolB proteins upon import into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **27**:143-157.
- Bouveret, E., R. Derouiche, A. Rigal, R. Lloubès, C. Lazdunski y H. Bénédicti.** 1995. Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. *J. Biol. Chem.* **270**:11071-11077.
- Boyer, H. W. y D. Roulland-Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472.
- Bradbeer, C.** 1993. The proton motive force drives de outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:3146-3150.
- Braun V. y C. Herrmann.** 1993. Evolutionary relationship of uptake systems for biopolymers in *Escherichia coli*: cross-complementation between the TonB-ExbB-ExbD and the TolA-TolQ-TolR proteins. *Mol. Microbiol.* **8**:261-268.
- Braun, V.** 1975. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **415**:335-377.
- Braun, V.** 1989. The structurally related *exbB* and *tolQ* genes are interchangeable in conferring tonB-dependent colicin, bacteriophage, and albomycin sensitivity. *J. Bacteriol* **171**:6387-6390.
- Braun, V.** 1989. The structurally related *exbB* and *tolQ* genes are interchangeable in conferring tonB-dependent colicin, bacteriophage, and albomycin sensitivity. *J. Bacteriol.* **171**:6387-6390.
- Braun, V. y H. C. Wu.** 1994. Lipoproteins, structure, function, biosynthesis and model for protein export, p. 319-341. In J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam.
- Braun, V. y K. Rehn.** 1969. Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur. J. Biochem.* **10**:426-438.
- Bremer, E., J. Middendorf, J. Martinussen y P. Valentin-Hansen.** 1990. Analysis of the *tsx* gene, which encodes a nucleoside-specific channel-forming protein (Tsx) in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene.* **96**:59-65.
- Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blocker y L. A. Marky.** 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:3746-3750.
- Brown, P. K., L. K. Romana y P. R. Reeves.** 1992. Molecular analysis of the *rfb* gene cluster of *Salmonella* serovar muenchen (strain M67): the genetic basis of the polymorphism between groups C2 and B. *Mol. Microbiol.* **6**:1385-1394.
- Buchanan, S. K., B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm, y J. Deisenhofer.** 1999. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**:56-63.

- Buell, C. R. y A. J. Anderson. 1992. Genetic analysis of the *aggA* locus involved in agglutination and adherence of *Pseudomonas putida*, a beneficial fluorescent pseudomonad. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**:154-162.
- Burnens, A., U. Stucki, J. Nicolet y J. Frey. 1995. Identification and characterization of an immunogenic outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2826-2832.
- Burrows, L. L., D. F. Charter y J. S. Lam. 1996. Molecular characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 (PAO1) B-band lipopolysaccharide gene cluster. *Mol. Microbiol.* **22**:481-495.
- Clavel, T. 1996. Le système Tol-Pal d'*Escherichia coli* K12: organisation génétique et relation avec la synthèse de la capsule bactérienne. Tesis doctoral. Université Claude Bernard, Lyon, France.
- Clavel, T., J. C. Lazzaroni, A. Vianney y R. C. Portalier. 1996. Expression of the tolQRA genes of *Escherichia coli* K-12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis. *Mol. Microbiol.* **19**:19-25.
- Clavel, T., P. Germon, A. Vianney, R. Portalier y J. C. Lazzaroni. 1998. TolB protein of *Escherichia coli* K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan-associated proteins Pal, Lpp and OmpA. *Mol. Microbiol.* **29**:359-367.
- Click, E. M. y R. E. Webster. 1997. Filamentous phage infection: required interactions with the TolA protein. *J. Bacteriol.* **179**:6464-6471.
- Click, E. M. y R. E. Webster. 1998. The TolQRA proteins are required for membrane insertion of the major capsid protein of the filamentous phage f1 during infection. *J. Bacteriol.* **180**:1723-1728.
- Cornelis, P., A. Bouia, A. Belarbi, A. Guyonvarch, B. Kammerer, V. Hannaert y J. C. Hubert. 1989. Cloning and analysis of the gene for the major outer membrane lipoprotein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **3**:421-428.
- Cowan, S. W. y T. Schirmer. 1994. Structures of non-specific diffusion pores from *Escherichia coli*, p. 353-362. In J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam.
- Cowan, S. W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R. A. Pauptit, J. N. Jansonius y J. P. Rosenbusch. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**:727-733.
- Curd, H., D. Liu y P. R. Reeves. 1998. Relationships among the O-antigen gene clusters of *Salmonella enterica* groups B, D1, D2, and D3. *J. Bacteriol.* **180**:1002-1007.
- Chakraborti, A. S., K. Ishidate, W. R. Cook, J. Zrike y L. I. Rothfield. 1986. Accumulation of a murein-membrane attachment site fraction when cell division is blocked in *lkyD* and *cha* mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**:1422-1429.
- Chen, R. y U. Henning. 1987. Nucleotide sequence of the gene for the peptidoglycan-associated lipoprotein of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **163**:73-77.
- Choi, D.-S., H. Yamada, T. Mizuno y S. Mizushima. 1987. Molecular assembly of the lipoprotein trimer on the peptidoglycan layer of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **102**:975-983.
- Dasgupta, T. y J. S. Lam. 1995. Identification of *rfbA*, involved in B-band lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5. *Infect. Immun.* **63**:1674-1680.
- De Mot, R. y J. Vanderleyden. 1994. The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both Gram-positive and Gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* **12**:333-334.
- De Mot, R., G. Schoofs, A. Roelandt, P. Declerck, P. Proost, J. Van Damme y J. Vanderleyden. 1994. Molecular characterization of the major outer-membrane protein OprF from plant root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* **140**:1377-1387.
- De Mot, R., P. Proost, J. Van Damme y J. Vanderleyden. 1992. Homology of the root adhesin of *Pseudomonas fluorescens* OE28.3 with porin F of *P. aeruginosa* and *P. syringae*. *Mol. Gen. Genet.* **231**:489-493.

- de Kievit, T. R., T. Dasgupta, H. Schweizer y J. S. Lam. 1995. Molecular cloning and characterization of the *rfc* gene of *Pseudomonas aeruginosa* (serotype O5). *Mol. Microbiol.* **16**:565-574.
- de Lorenzo, V. y K. N. Timmis. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**:386-405.
- de Lorenzo, V., L. Eltis, B. Kessler y K. N. Timmis. 1993. Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacI^Q/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**:17-24.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik y K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6568-6572.
- de Maagd, R. A., A. S. Rao, I. H. M. Mulders, L. G. de Roo, M. C. M. van Loosdrecht, C. A. Wijffelman y B. J. J. Lugtenberg. 1989. Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides: possible role of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from the infection thread. *J. Bacteriol.* **171**:1143-1150.
- de Weger, L. A., A. J. van der Bij, L. C. Dekkers, M. Simons, C. A. Wijffelman y B. J. J. Lugtenberg. 1995. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**:221-228.
- de Weger, L. A., B. Jann, K. Jann y B. Lugtenberg. 1987. Lipopolysaccharides of *Pseudomonas* spp. that stimulate plant growth: composition and use for strain identification. *J. Bacteriol.* **169**:1441-1446.
- de Weger, L. A., C. I. M. van der Vlugt, A. H. M. Wijfjes, P. A. H. M. Bakker, B. Schippers y B. Lugtenberg. 1987. Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* **169**:2769-2773.
- de Weger, L. A., G. V. Bloemberg, T. van Wezel, M. van Raamsdonk, D. C. M. Glandorf, J. van Vuurde, K. Jann y B. J. J. Lugtenberg. 1996. A novel cell surface polysaccharide in *Pseudomonas putida* WCS358, which shares characteristics with *Escherichia coli* K antigens, is not involved in root colonization. *J. Bacteriol.* **178**:1955-1961.
- de Weger, L. A., M. C. M. van Loosdrecht, H. E. Klaassen y B. Lugtenberg. 1989. Mutational changes in physicochemical cell surface properties of plant-growth-stimulating *Pseudomonas* spp. do not influence the attachment properties of the cells. *J. Bacteriol.* **171**:2756-2761.
- de Weger, L. A., P. A. H. M. Bakker, B. Schippers, M. C. M. van Loosdrecht y B. J. J. Lugtenberg. 1989. *Pseudomonas* spp. with mutational changes in the O-antigenic side chain of their lipopolysaccharide are affected in their ability to colonize potato roots, p. 197-202. In B. J. J. Lugtenberg (ed.), *Signal molecules in plants and plant-microbe interactions*. Springer-Verlag, Berlin.
- Death, A., L. Notley y T. Ferenci. 1993. Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress. *J. Bacteriol.* **175**:1475-1483.
- Deckert, G., P. V. Warren, T. Gaasterland, W. G. Young, A. L. Lenox, D. E. Graham, R. Overbeek, M. A. Snead, M. Keller, M. Aujay, R. Huber, R. A. Feldman, J. M. Short, G. J. Olson y R. V. Swanson. 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**:353-358.
- Deich, R. A., B. J. Metcalf, C. W. Finn, J. E. Farley y B. A. Green. 1988. Cloning of genes encoding a 15,000-Dalton peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein and an antigenically related 15,000-Dalton protein from *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **170**:489-498.
- Dekkers, L. C., A. J. van der Bij, I. H. M. Mulders, C. C. Phoelich, R. A. R. Wentwoord, D. C. M. Glandorf, C. A. Wijffelman y B. J. J. Lugtenberg. 1998. Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (*nuo*) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**:763-771.
- Delcour, A. H. 1997. Function and modulation of bacterial porins: insights from electrophysiology. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**:115-123.

- Demchick, P. y A. L. Koch. 1996. The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**:768-773.
- Dennis, J. J., E. R. Lafontaine y P. A. Sokol. 1996. Identification and characterization of the *tolQRA* genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **178**:7059-7068.
- Derouiche, R., G. Zeder-Lutz, H. Bénédicti, M. Gavioli, A. Rigal, C. Lazdunski y R. Llobès. 1997. Binding of colicins A and E1 to purified TolA domains. *Microbiology* **143**:3185-3192.
- Derouiche, R., H. Bénédicti, J. C. Lazzaroni, C. Lazdunski y R. Llobès. 1995. Protein complex within *Escherichia coli* inner membrane. *J. Biol. Chem.* **270**:11078-11084.
- Derouiche, R., M. Gavioli, H. Bénédicti, A. Prilipov, C. Lazdunski y R. Llobès. 1996. TolA central domain interacts with *Escherichia coli* porins. *EMBO J.* **15**:6408-6415.
- Ditty, J. L., A. C. Grimm y C. S. Harwood. 1998. Identification of a chemotaxis gene region from *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **159**:267-273.
- Dowling, D. N. y F. O'Gara. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotech.* **12**:133-141.
- Duché, D., D. Baty, M. Chartier y L. Letellier. 1994. Unfolding of colicin A during its translocation through the *Escherichia coli* envelope as demonstrated by disulfide bond engineering. *J. Biol. Chem.* **269**:24820-24825.
- Duchêne, M., A. Schweizer, F. Lottspeich, G. Krauss, M. Marget, K. Vogel, B. U. von Specht y H. Domdey. 1988. Sequence and transcriptional start site of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F gene. *J. Bacteriol.* **170**:155-162.
- Eick-Helmerich, K. y V. Braun. 1989. Import of biopolymers into *Escherichia coli*: nucleotide sequences of the *exbB* and *exbD* genes are homologous to those of the *tolQ* and *tolR* genes, respectively. *J. Bacteriol.* **171**:5117-5127.
- Eick-Helmerich, K. y V. Braun. 1989. Import of biopolymers into *Escherichia coli*: nucleotide sequences of the *exbB* and *exbD* genes are homologous to those of the *tolQ* and *tolR* genes respectively. *J. Bacteriol.* **171**:5117-5126.
- Elkins, P. A., A. Bunker, W. A. Cramer y C. V. Stauffacher. 1997. A mechanism for toxin insertion into membranes is suggested by the crystal structure of the channel-forming domain of colicin E1. *Structure* **5**:443-458.
- Engleberg, N. C., D. C. Howe, J. E. Rogers, J. Arroyo y B. I. Eisenstein. 1991. Characterization of a *Legionella pneumophila* gene encoding a lipoprotein antigen. *Mol. Microbiol.* **5**:2021-2029.
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J.-F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, K. McKenney, G. Sutton, W. FitzHugh, C. Fields, J. D. Gocayne, J. Scott, R. Shirley, L.-I. Liu, A. Glodek, J. M. Kelley, J. F. Weidman, C. A. Phillips, T. Spriggs, E. Hedblom, M. D. Cotton, T. R. Utterback, M. C. Hanna, D. T. Nguyen, D. M. Saudek, R. C. Brandon, L. D. Fine, J. L. Fritchman, J. L. Fuhrmann, N. S. M. Geoghagen, C. L. Gnehm, L. A. McDonald, K. V. Small, C. M. Fraser, H. O. Smith y J. C. Venter. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**:496-512.
- Fognini-Lefebvre, N., J. C. Lazzaroni y R. C. Portalier. 1987. *tolA*, *tolB*, and *excC*, three cistrons involved in the control of pleiotropic release of periplasmic proteins by *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **209**:391-395.
- Forst, D., K. Schulein, T. Wacker, K. Diedrichs, W. Kreutz, R. Benz y W. Welte. 1993. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of ScrY, a specific bacterial outer membrane porin. *J. Mol. Biol.* **229**:258-262.

- Franklin, F. C. H., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian y K. N. Timmis. 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.
- Fraser C. M., S. J. Norris, G. M. Weinstock, O. White, G. G. Sutton, R. Dodson, M. Gwinn, E. K. Hickey, R. Clayton, K. A. Ketchum, E. Sodergren, J. M. Hardham, M. P. Mcleod, S. Salzberg, J. Peterson, H. Khalak, D. Richardson, J. K. Howell, M. Chidambaram, T. Utterback, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, M. D. Cotton, C. Fujii, S. Garland, B. Hatch, K. Horst, K. Roberts, L. Watthey, J. Weidman, H. O. Smith y J. C. Venter. 1998. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science **281**:375-388.
- Freudl, R., H. Schwarz, Y.-D. Stierhof, K. Gamon, I. Hindennach y U. Henning. 1986. An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* K-12 undergoes a conformational change during export. J. Biol. Chem. **261**:11355-11361.
- Frey, J., P. Kuhnert, L. Villiger y J. Nicolet. 1996. Cloning and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein belonging to the family of PAL lipoproteins. Res. Microbiol. **147**:351-361.
- Friedman, A. M., S. R. Long, S. E. Brown, W. J. Buikema y F. M. Ausubel. 1982. Construction of a broad-host-range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. Gene **18**:289-296.
- Fuchs, P., F. Breitling, S. Dübel, T. Seehaus y M. Little. 1991. Targeting recombinant antibodies to the surface of *Escherichia coli*: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein. Bio/Technology **9**:1369-1372.
- Fung, J., T. J. MacAlister y L. I. Rothfield. 1978. Role of murein lipoprotein in morphogenesis of the bacterial division septum: phenotypic similarity of *lkyD* and *lpo* mutants. J. Bacteriol. **133**:1467-1471.
- García-Valdés, E., E. Cózar, R. Rotger, J. Lalucat y J. Ursing. 1988. New naphthalene-degrading marine *Pseudomonas* strains. Appl. Environ. Microbiol. **54**:2478-2485.
- Garinot-Schneider, C., C. N. Penfold, G. R. Moore, C. Kleanthous y R. James. 1997. Identification of residues in the putative TolA box which are essential for the toxicity of the endonuclease toxin colicin E9. Microbiology **143**:2931-2938.
- Gentry-Weeks, C. R., A. L. Hultsch, S. M. Kelly, J. M. Keith y R. Curtiss, III. 1992. Cloning and sequencing of a gene encoding a 21-kilodalton outer membrane protein from *Bordetella avium* and expression of the gene in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **174**:7729-7742.
- Germon, P., T. Clavel, A. Vianney, R. Portalier y J. C. Lazzaroni. 1998. Mutational analysis of the *Escherichia coli* K-12 TolA N-terminal region and characterization of its TolQ-interacting domain by genetic suppression. J. Bacteriol. **180**:6433-6439.
- Ghrayeb, J. y M. Inouye. 1984. Nine amino acid residues at the NH₂-terminal of lipoprotein are sufficient for its modification, processing, and localization in the outer membrane of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **259**:463-467.
- Gibson, D. T. y V. Subramanian. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In D. T. Gibson (ed.), Microbial degradation of organic compounds. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Gibson, D. T., G. J. Zylstra y S. Chauhan. 1990. Biotransformations catalyzed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1, p. 121-132. In S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas*: biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Gotoh, N., H. Wakebe, E. Yoshihara, T. Nakae y T. Nishino. 1989. Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. J. Bacteriol. **171**:983-990.
- Gottesman, S. 1995. Regulation of capsule synthesis: modification of the two-component paradigm by an accessory unstable regulator, p. 253-262. In J. A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.), Two-component signal transduction. ASM Press, Washington, D.C.

- Graeme-Cook, K. A., G. May, E. Bremer y C. F. Higgins. 1989. Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **3**:1287-1294.
- Guihard, G., P. Boulanger, H. Bénédicti, R. Llobès, M. Besnard y L. Letellier. 1994. Colicin A and the Tol proteins involved in its translocation are preferentially located in the contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **269**:5874-5880.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Hancock, R. E. W. 1991. Bacterial outer membranes: evolving concepts. *ASM News* **57**:175-182.
- Hancock, R. E. W., A. A. Wieczorek, L. M. Mutharia y K. Poole. 1982. Monoclonal antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane antigens: isolation and characterization. *Infect. Immun.* **37**:166-171.
- Hancock, R. E. W. y R. Benz. 1986. Demonstration and chemical modification of a specific phosphate binding site in the phosphate-starvation-inducible outer membrane porin protein P of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **860**:699-707.
- Hancock, R. E. W., C. Egli, R. Benz y R. J. Siehnel. 1992. Overexpression in *Escherichia coli* and functional analysis of a novel PPI-selective porin, *oprO*, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **174**:471-476.
- Hancock, R. E. W., D. N. Karunaratne y C. Bernegger-Egli. 1994. Molecular organization and structural role of outer membrane macromolecules, p. 263-279. In J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam.
- Hancock, R. E. W., K. Poole y R. Benz. 1982. Outer membrane protein P of *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by phosphate deficiency and formation of small anion-specific channels in lipid bilayer membranes. *J. Bacteriol.* **150**:730-738.
- Hancock, R. E. W., R. Siehnel y N. Martin. 1990. Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* **4**:1069-1075.
- Hancock, R. E. W., R. T. Irvin, J. W. Costerton y A. M. Carey. 1981. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane: peptidoglycan-associated proteins. *J. Bacteriol.* **145**:628-631.
- Hattermann, D. R. y S. M. Ries. 1989. Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in infection. *Phytopathology* **79**:284-289.
- Havekes, L. M., B. J. J. Lugtenberg y W. P. M. Hoekstra. 1976. Conjugation deficient *E. coli* K12 F⁻ mutants with heptose-less lipopolysaccharide. *Mol. Gen. Genet.* **146**:43-50.
- Hayashi, S. y H. C. Wu. 1990. Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**:451-471.
- Heinrichs, D. E., J. A. Yethon y C. Whitfield. 1998. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **30**:221-232.
- Henning, U. y R. Koebnik. 1994. Outer membrane proteins of *Escherichia coli*: mechanism of sorting and regulation of synthesis, p. 381-395. In J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam.
- Herrero, M., V. de Lorenzo y K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557-6567.
- Higgs, P. I., P. S. Myers y K. Postle. 1998. Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J. Bacteriol.* **180**:6031-6038.
- Hirota, Y., H. Suzuki, Y. Nishimura y S. Yasuda. 1977. On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a mutant of *E. coli* lacking a murein-lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:1417-1420.

- Hishida, T., H. Iwasaki, K. Ishioka y H. Shinagawa. 1996. Molecular analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes, *ruvA*, *ruvB* and *ruvC*, involved in processing of homologous recombination intermediates. *Gene* **182**:63-70.
- Hitchcock, P. J. y T. M. Brown. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**:269-277.
- Holloway, B. W., H. Rossiter, D. Burgess y J. Dodge. 1973. Aeruginocin tolerant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet. Res. Camb.* **22**:239-253.
- Howie, W. J., R. J. Cook y D. M. Weller. 1987. Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology* **77**:286-292.
- Hutchinson, C. A., 3d, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke y M. Smith. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.* **253**:6551-6560.
- Ichihara, S., M. Hussain y S. Mizushima. 1982. Mechanism of export of outer membrane lipoproteins through the cytoplasmic membrane in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257**:495-500.
- Inoue, A. y K. Horikoshi. 1989. A *Pseudomonas* that thrives in high concentration of toluene. *Nature (London)* **338**:264-266.
- Inoue, H., H. Nojima y H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
- Inukai, M., M. Takeuchi, K. Shimizu y M. Arai. 1978. Mechanism of action of globomycin. *J. Antibiot.* **31**:1203-1205.
- Isnard, M., A. Rigal, J. C. Lazzaroni, C. Lazdunski y R. Llobès. 1994. Maturation and localization of the TolB protein required for colicin import. *J. Bacteriol.* **176**:6392-6396.
- James, R., C. Kleantous y G. R. Moore. 1996. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology* **142**:1569-1580.
- Jasmer, D. P., L. E. Perryman y T. C. McGuire. 1996. *Haemonchus contortus* GA1 antigens: related, phospholipase C-sensitive, apical gut membrane proteins encoded as a polyprotein and released from the nematode during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:8642-8647.
- Jeanteur, D., T. Schirmer, D. Fourel, V. Simonet, G. Rummel, C. Widmer, J. P. Rosenbusch, F. Pattus y J. M. Pagès. 1994. Structural and functional alterations of a colicin-resistant mutant of OmpF porin from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10675-10679.
- Kado, C. I. y S.-T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**:1365-1373.
- Kamio, Y. y H. Nikaido. 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase C and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry* **15**:2561-2570.
- Kaniga, K., I. Delor y G. R. Cornelis. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137-141.
- Kasten, R. W., L. M. Hansen, J. Hinojoza, D. Bieber, W. W. Ruehl y D. C. Hirsh. 1995. *Pasteurella multocida* produces a protein with homology to the P6 outer membrane protein of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **63**:989-993.
- Kessler, B., V. de Lorenzo y K. N. Timmis. 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the *Pm* promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* **233**:293-301.
- Kim, K., L. Sungjin, L. Kyunghye y L. Dongbin. 1998. Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. *J. Bacteriol.* **180**:3692-3696.

- Kleanthous, C., A. M. Hemmings, G. R. Moore y R. James. 1998. Immunity proteins and their specificity for endonuclease colicins: telling right from wrong in protein-protein recognition. *Mol. Microbiol.* **28**:227-233.
- Kluepfel, D. A. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**:441-472.
- Koebnik, R. 1995. Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins. *Mol. Microbiol.* **16**:1269-1270.
- Koebnik, R. 1999. Membrane assembly of the *Escherichia coli* outer membrane protein OmpA: exploring sequence constraints on transmembrane β -strands. *J. Mol. Biol.* **285**:1801-1810.
- Konkel, M. E., D. J. Mead y W. Cieplak, Jr. 1996. Cloning, sequencing, and expression of a gene from *Campylobacter jejuni* encoding a protein (Omp18) with similarity to peptidoglycan-associated lipoproteins. *Infect. Immun.* **64**:1850-1853.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II y K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-176.
- Kovach, M. E., R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop II y K. M. Peterson. 1994. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques* **16**:800-802.
- Kreusch, A., A. Neubuser, E. Schlitz, J. Weckesser y G. E. Schulz. 1994. Structure of the membrane channel porin from *Rhodospseudomonas blastica* at 2.0 Å resolution. *Protein Sci.* **3**:58-63.
- Kyte, J. y R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**:680-685.
- Lafontaine, E. R. y P. A. Sokol. 1998. Effects of iron and temperature on expression of the *Pseudomonas aeruginosa* tolQRA genes: role of the ferric uptake regulator. *J. Bacteriol.* **180**:2836-2841.
- Larsen, R. A., M. G. Thomas y K. Postle. 1999. Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.* **31**:1809-1824.
- Lazdunski, C. 1995. Colicin import and pore formation: a system for studying protein transport across membranes? *Mol. Microbiol.* **16**:1059-1066.
- Lazdunski, C. J., E. Bouveret, A. Rigal, L. Journet, R. Lloubès y H. Bénédicti. 1998. Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **180**:4993-5002.
- Lazzaroni, J. C., A. Vianney, J. L. Popot, H. Bénédicti, F. Samatey, C. Lazdunski, R. C. Portalier y V. Géli. 1995. Transmembrane α -helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* Tol complex. *J. Mol. Biol.* **246**:1-7.
- Lazzaroni, J. C. y R. C. Portalier. 1981. Genetic and biochemical characterization of periplasmic leaky mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **145**:1351-1358.
- Lazzaroni, J. C. y R. C. Portalier. 1992. The *excC* gene of *Escherichia coli* K-12 required for cell envelope integrity encodes the peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL). *Mol. Microbiol.* **6**:735-742.
- Lazzaroni, J. C., N. Fognini-Lefebvre y R. Portalier. 1986. Effects of *lkyB* mutations on the expression of *ompF*, *ompC*, and *lamB* porin structural genes in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **33**:235-239.
- Lazzaroni, J. C., N. Fognini-Lefebvre y R. Portalier. 1986. Effect of *lkyB* mutations on the expression of *ompF*, *ompC*, and *lamB* porin structural genes in *E. coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **33**:235-239.
- Lazzaroni, J.-C., N. Fognini-Lefebvre y R. Portalier. 1989. Cloning of the *excC* and *excD* genes involved in the release of periplasmic proteins by *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **218**:460-464.

- Leduc, M., K. Ishidate, N. Shakibai y L. I. Rothfield.** 1992. Interactions of *Escherichia coli* membrane lipoproteins with the murein sacculus. *J. Bacteriol.* **174**:7982-7988.
- Leive, L.** 1965 Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**:290-296.
- Levengood, S. K. y R. E. Webster.** 1989. Nucleotide sequences of the *tolA* and *tolB* genes and localization of their products, components of a multistep translocation system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:6600-6609.
- Levengood, S. K., E. M. Click y R. E. Webster.** 1993. Role of the carboxyl-terminal domain of TolA in protein import and integrity of the outer membrane. *J. Bacteriol.* **175**:222-228.
- Levengood, S. K., W. F. Beyer, Jr. y R. E. Webster.** 1991. TolA: A membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5939-5943.
- Lim, A., Jr., D. De Vos, M. Brauns, D. Mossialos, A. Gaballa, D. Qing y P. Cornelis.** 1997. Molecular and immunological characterization of OprL, the 18 kDa outer-membrane peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **143**:1709-1716.
- Locher, K. P., B. Rees, R. Koebnik, A. Mitschler, L. Moulinier, J. P. Rosenbusch, D. Moras.** 1998. Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**:771-778.
- Ludwig, B., A. Schmid, R. Marre y J. Hacker.** 1991. Cloning, genetic analysis, and nucleotide sequence of a determinant coding for a 19-Kilodalton peptidoglycan-associated protein (Ppl) of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **59**:2515-2521.
- Lugtenberg, B. y L. van Alphen.** 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **737**:51-115.
- Manoil, C. y B. Traxler.** 1995. Membrane protein assembly: genetic, evolutionary and medical perspectives. *Annu. Rev. Genet.* **29**:131-150.
- Manoil, C. y J. Beckwith.** 1985. *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8129-8133.
- Manoil, C., J. J. Mekalanos y J. Beckwith.** 1990. Alkaline phosphatase fusions: sensors of subcellular location. *J. Bacteriol.* **172**:515-518.
- Marck, C.** 1988. "DNA Strider": a "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res.* **16**:1829-1836.
- Marvin, H. J. P., M. B. A. Ter Beest y B. Witholt.** 1989. Release of outer membrane fragments from wild-type *Escherichia coli* and from several *E. coli* lipopolysaccharide mutants by EDTA and heat shock treatments. *J. Bacteriol.* **171**:5262-5267.
- Matsuyama, S., T. Tajima y H. Tokuda.** 1995. A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J.* **14**:3365-3372.
- Matsuyama, S., Yokota, N. y H. Tokuda.** 1997. A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM) involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **16**:6947-6955.
- Miller, V. L. y J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**:2575-2583.
- Mizuno, T.** 1981. A novel peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) found in the outer membrane of *Proteus mirabilis* and other Gram-negative bacteria. *J. Biochem.* **89**:1039-1049.
- Morona, R., M. Mavris, A. Fallarino y P. A. Manning.** 1994. Characterization of the *rfc* region of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **176**:733-747.

- Mühlradt, P. F., J. Menzel, J. R. Golecki y V. Speth. 1973. Outer membrane of *Salmonella*: site of export of newly synthesized lipopolysaccharide on the surface. *Eur. J. Biochem.* **35**:471-481.
- Muller, M. M., A. Vianney, J. C. Lazzaroni, R. E. Webster y R. C. Portalier. 1993. Membrane topology of the *Escherichia coli* TolR protein required for cell envelope integrity. *J. Bacteriol.* **175**:6059-6061.
- Nakamura, K. y M. Inoue. 1979. DNA sequence of the gene for the outer membrane lipoprotein of *E. coli*: an extremely AT-rich promoter. *Cell* **18**:1109-1117.
- Navarre, W. W. y O. Schneewind. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:174-229.
- Neesen, J., H. Buenemann y U. A. Heinlein. 1994. The *Drosophila hydei* gene Dhms101(1) encodes a testis-specific, repetitive, axoneme-associated protein with differential abundance in Y chromosomal deletion mutant flies. *Dev. Biol.* **162**:414-425.
- Nelson, M. B., M. A. Apicella, T. F. Murphy, H. Vankeulen, L. D. Spotila y D. Rekosh. 1988. Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. *Infect. Immun.* **56**:128-134.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak y G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**:1-6.
- Nikaido, H. 1992. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* **6**:435-442.
- Nikaido, H., K. Nikaido y S. Harayama. 1991. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **266**:770-779.
- Nikaido, H. 1993. Transport across the bacterial outer membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**:581-589.
- Nikaido, H. 1994. Diffusion of inhibitors across the cell wall, p. 547-558. In J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam.
- Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**:382-388.
- Nikaido, H. 1996a. Outer membrane, p. 29-47. In F. C. Neidhardt, R. Curtis, III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D. C.
- Nikaido, H. 1996b. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:5853-5859.
- Nikaido, H. 1999. Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J. Bacteriol.* **181**:4-8.
- Nikaido, H. y D. G. Thanassi. 1993. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1393-1399.
- Nikaido, H. y E. Y. Rosenberg. 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J. Bacteriol.* **153**:241-252.
- Nikaido, H. y M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32.
- Nikaido, H. y R. E. W. Hancock. 1986. Outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa*, p. 145-193. In J. R. Sokatch and L. N. Ornston (ed.), *The Bacteria*. Volume X: the biology of *Pseudomonas*. Academic Press, Orlando.
- Norrandner, K., T. Kempe y K. Messing. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**:101-106.

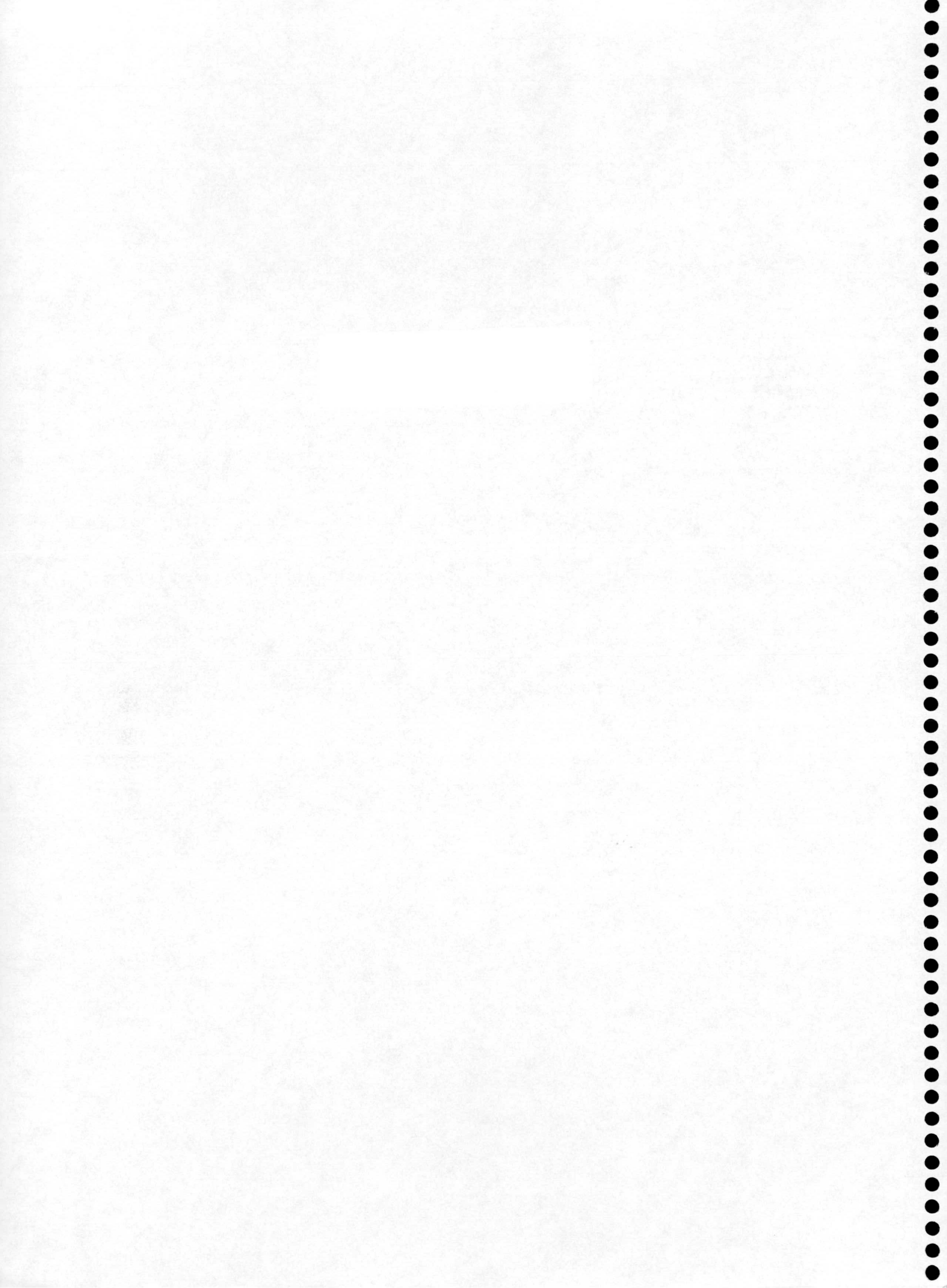
- O'Sullivan, D. J. y F. O'Gara. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**:662-676.
- Palleroni, N. J. 1986. Taxonomy of the pseudomonads, p. 3-25. In J. R. Sokatch and L. N. Ornston (ed.), *The Bacteria. Volume X: the biology of Pseudomonas*. Academic Press, Orlando.
- Parker, M. W., J. P. M. Pastman, F. Pattus, A. D. Tucker y D. Tsenoglou. 1992. Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **224**:639-657.
- Pearson, W. R. y D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2444-2448.
- Plesiat, P. y H. Nikaido. 1992. Outer membranes of gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. *Mol. Microbiol.* **6**:1323-1333.
- Ponting, C. P. y M. J. Pallen. 1999. A β -propeller domain within TolB. *Mol. Microbiol.* **31**:739-740.
- Pratt, L. A. y T. J. Silhavy. 1995. Porin regulon of *Escherichia coli*, p. 105-127. In J. A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.), *Two-component signal transduction*. ASM Press, Washington, D.C.
- Pratt, L. A., W. Hsing, K. E. Gibson y T. J. Silhavy. 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**:911-917.
- Priefer, U. B. 1989. Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39. *J. Bacteriol.* **171**:6161-6168.
- Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:50-108.
- Quinn, J. P. 1992. Intrinsic antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, p. 154-160. In E. Galli, S. Silver and B. Witholt (ed.), *Pseudomonas: molecular biology and biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Quinn, J. P., C. A. Dudek, C. A. di Vincenzo, D. A. Lucks y S. A. Lerner. 1986. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Infect. Dis.* **154**:289-294.
- Raetz, C. R. H. 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles, p. 1035-1063. In F. C. Neidhardt, R. Curtis, III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, D. C.
- Ramos J. L., E. Duque, P. Godoy y A. Segura. 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **180**:3323-3329.
- Ramos, J. L., E. Duque y M. I. Ramos-González. 1991. Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:260-266.
- Ramos, J. L., E. Duque, J. J. Rodríguez-Herva, P. Godoy, A. Haïdour, F. Reyes y A. Fernández-Barrero. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* **272**:3887-3890.
- Ramos, J. L., E. Duque, M. J. Huertas y A. Haïdour. 1995. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* **177**:3911-3916.
- Ramos-González, M. I. 1993. Obtención y utilización de anticuerpos monoclonales contra *Pseudomonas putida* portadora de ADN recombinante: clonación y secuenciación de un gen que determina un antígeno de superficie. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Granada, España.
- Ramos-González, M. I., F. Rufz Cabello, I. Brettar, F. Garrido y J. L. Ramos. 1992. Tracking genetically engineered bacteria: monoclonal antibodies against surface determinants of the soil bacterium *Pseudomonas putida* 2440. *J. Bacteriol.* **174**:2978-2985.
- Rawling, E. G., F. S. L. Brinkman y R. E. W. Hancock. 1998. Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. *J. Bacteriol.* **180**:3556-3562.

- Rawling, E. G., N. L. Martin y R. E. W. Hancock.** 1995. Epitope mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane porin protein OprF. *Infect. Immun.* **63**:38-42.
- Reeves, P.** 1994. Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide, p. 281-317. In J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam.
- Riechmann, L. y P. Holliger.** 1997. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell* **90**:351-360.
- Rigal, A., E. Bouveret, R. Lloubès, C. Lazdunski y H. Bénédicti.** 1997. The TolB protein interacts with the porins of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:7274-7279.
- Rivera, M. y E. J. McGroarty.** 1989. Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **171**:2244-2248.
- Rocchetta, H. L., L. L. Burrows, J. C. Pacan y J. S. Lam.** 1998. Three rhamnosyltransferases responsible for assembly of the A-band D-rhamnan polysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*: a fourth transferase, WbpL, is required for the initiation of both A-band and B-band lipopolysaccharide synthesis. *Mol. Microbiol.* **28**:1103-1119.
- Rodríguez-Herva, J. J., M. I. Ramos-González y J. L. Ramos.** 1996. The *Pseudomonas putida* peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein is involved in maintenance of the integrity of the cell envelope. *J. Bacteriol.* **178**:1699-1706.
- Rothfield, L. I. y S. S. Justice.** 1997. Bacterial cell division: the cycle of the ring. *Cell* **88**:581-584.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F. S., S. Nicklen y A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Sano, Y. y M. Kageyama.** 1993. A novel transposon-like structure carries the genes for pyocin AP41, a *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocin with a DNase domain homology to E2 group colicins. *Mol. Gen. Genet.* **237**:161-170.
- Schirmer, T., T. A. Keller, Y.-F. Wang y J. P. Rosenbusch.** 1995. Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**:512-514.
- Schnaitman, C. A. y J. D. Klena.** 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:655-682.
- Schulz, G. E.** 1993. Bacterial porins: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:701-707.
- Sen, K. y H. Nikaido.** 1991. Lipopolysaccharide structure required for in vitro trimerization of *Escherichia coli* OmpF porin. *J. Bacteriol.* **173**:926-928.
- Sen, K., D. J. Sikkema y T. F. Murphy.** 1996. Isolation and characterization of the *Haemophilus influenzae* *tolQ*, *tolR*, *tolA* and *tolB* genes. *Gene* **178**:75-81.
- Sikkema, D. J., M. B. Nelson, M. A. Apicella y T. F. Murphy.** 1992. Outer membrane protein P6 of *Haemophilus influenzae* binds to its own gene. *Mol. Microbiol.* **6**:547-554.
- Simons, M., A. J. van der Bij, I. Brand, L. A. de Weger, C. A. Wijffelman y B. J. J. Lugtenberg.** 1996. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:600-607.
- Smit, J. y H. Nikaido.** 1978. Outer membrane of gram-negative bacteria. XVII. Electron microscopic studies on sites of insertion of porins and growth of cell surface in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **135**:687-702.
- Sokol, P. A. y D. E. Woods.** 1986. Monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* ferripyochelin-binding protein. *Infect. Immun.* **53**:621-627.

- Sonntag, I., H. Schwarz, Y. Hirota y U. Henning. 1978. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **136**:280-285.
- Spinola, S. M., G. E. Griffiths, J. Bogdan y M. A. Menegus. 1992. Characterization of an 18,000-molecular-weight outer membrane protein of *Haemophilus ducreyi* that contains a conserved surface-exposed epitope. *Infect. Immun.* **60**:385-391.
- Spinola, S. M., T. J. Hiltke, K. Fortney y K. L. Shanks. 1996. The conserved 18,000-molecular-weight outer membrane protein of *Haemophilus ducreyi* has homology to PAL. *Infect. Immun.* **64**:1950-1955.
- Staskawicz, B., D. Dahlbeck, N. Keen y C. Napoli. 1987. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.* **169**:5789-5794.
- Stein, D. C. 1992. Plasmids with easily excisable *xyle* cassettes. *Gene* **117**:157-158.
- Stephens, R. S., S. Kalman, C. J. Lammel, J. Fan, R. Marathe, L. Aravind, W. P. Mitchell, L. Olinger, R. L. Tatusov, Q. Zhao, E. V. Koonin y R. W. Davis. 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* **282**:754-759.
- Stevenson, G., B. Neal, D. Liu, M. Hobbs, N. H. Packer, M. Batley, J. W. Redmond, L. Lindquist y P. Reeves. 1994. Structure of the O-antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. *J. Bacteriol.* **176**:4144-4156.
- Strom, M. S. y S. Lory. 1987. Mapping of export signals of *Pseudomonas aeruginosa* pilin with alkaline phosphatase fusions. *J. Bacteriol.* **169**:3181-3188.
- Struyvé, M., M. Moons y J. Tommassen. 1991. Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J. Mol. Biol.* **218**:141-148.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn y J. W. Dubendorff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**:60-89.
- Sugawara, E. y H. Nikaido. 1992. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**:2507-2511.
- Sugawara, E. y H. Nikaido. 1994. OmpA protein of *Escherichia coli* outer membrane occurs in open-channel and closed-channel forms. *J. Biol. Chem.* **269**:17981-17987.
- Sukupolvi, S. y C. D. O'Connor. 1990. TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between Gram-negative bacteria and their environment. *Microbiol. Rev.* **54**:331-341.
- Sukupolvi, S., C. D. O'Connor y M. F. Edwards. 1986. The TraT protein is able to normalize the phenotype of a plasmid-carried permeability mutation of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:2079-2085.
- Sukupolvi, S., M. Vaara, I. M. Helander, P. Viljanen y P. H. Mäkelä. 1984. New *Salmonella typhimurium* mutants with altered outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* **159**:704-712.
- Sun, T.-P. y R. E. Webster. 1986. *fii*, a bacterial locus required for filamentous phage infection and its relation to colicin-tolerant *tolA* and *tolB*. *J. Bacteriol.* **165**:107-115.
- Sun, T.-P. y R. E. Webster. 1987. Nucleotide sequence of a gene cluster involved in entry of E colicins and single-stranded DNA of infecting filamentous bacteriophages into *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:2667-2674.
- Suzuki, T., C. Ueguchi y T. Mizuno. 1996. H-NS regulates OmpF expression through *micF* antisense RNA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:3650-3653.
- Tajima, T., N. Yokota, S. Matsuyama y H. Tokuda. 1998. Genetic analyses of the in vivo function of LolA, a periplasmic chaperone involved in the outer membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. *FEBS Lett.* **439**:51-54.

- Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-80.
- Tibor, A., V. Weynants, P. Denoel, B. Lichtfouse, X. De Bolle, E. Saman, J. N. Limet y J. J. Letesson. 1994. Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to PAL lipoproteins. *Infect. Immun.* **62**:3633-3639.
- Todt, J. C., W. J. Rocque y E. J. McGroarty. 1992. Effects of pH on bacterial porin function. *Biochemistry* **31**:10471-10478.
- Tomb J.-F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H.-P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. Mckenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser y J. C. Venter. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-547.
- Trias, J. y H. Nikaido. 1990. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J. Biol. Chem.* **265**:15680-15684.
- Trias, J., E. Y. Rosenberg y H. Nikaido. 1988. Specificity of the glucose channel formed by protein D1 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **938**:493-496.
- Ullstrom C. A., R. Siehnel, W. Woodruff, S. Steinbach y R. E. W. Hancock. 1991. Conservation of the gene for outer membrane protein OprF in the family Pseudomonadaceae: sequence of the *Pseudomonas syringae oprF* gene. *J. Bacteriol.* **173**:768-775.
- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* **56**:395-411.
- Vande Broek, A. y J. Vanderleyden. 1995. The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:800-810.
- Vesper, S. J. 1987. Production of pili (fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1397-1405.
- Vianney, A., M. M. Muller, T. Clavel, J. C. Lazzaroni, R. C. Portalier y R. E. Webster. 1996. Characterization of the *tol-pal* region of *Escherichia coli* K-12: translational control of *tolR* expression by TolQ and identification of a new open reading frame downstream of *pal* encoding a periplasmic protein. *J. Bacteriol.* **178**:4031-4038.
- Vianney, A., T. M. Lewin, W. F. Beyer, Jr., J. C. Lazzaroni, R. C. Portalier y R. E. Webster. 1994. Membrane topology and mutational analysis of the TolQ protein of *Escherichia coli* required for the uptake of macromolecules and cell envelope integrity. *J. Bacteriol.* **176**:822-829.
- Vieira, J. y J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**:259-268.
- von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* **14**:4683-4690.
- Wandersman, C. y P. Delepelaire. 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4776-4780.
- Webster, R. E. 1991. The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:1005-1011.
- Weiss, M. S. y G. E. Schulz. 1992. Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227**:493-509.
- West, S. C. 1997. Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu. Rev. Genet.* **31**:213-244.

- Whitfield, C., P. A. Amor y R. Köplin.** 1997. Modulation of the surface architecture of Gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol. Microbiol.* **23**:629-638.
- Wiener, M., D. Freymann, P. Ghosh y R. M. Stroud.** 1997. Crystal structure of colicin Ia. *Nature* **385**:461-464.
- Wiggerich H. G., B. Klauke, R. Koeplin, U. B. Priefer y A. Puehler.** 1997. Unusual structure of the *tonB-exb* DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: *tonB*, *exbB*, and *exbD1* are essential for ferric iron uptake, but *exbD2* is not. *J. Bacteriol.* **179**:7103-7110.
- Wolfe, A. J. y H. C. Berg.** 1989. Migration of bacteria in semisolid agar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6973-6977.
- Wong, R. S. Y., H. Jost y R. E. W. Hancock.** 1993. Linker-insertion mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF. *Mol. Microbiol.* **10**:283-292.
- Woodruff, W. A. y R. E. W. Hancock.** 1989. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F: structural role and relationship to the *Escherichia coli* OmpA protein. *J. Bacteriol.* **171**:3304-3309.
- Woodruff, W. A., T. R. Parr, Jr., R. E. W. Hancock, L. F. Hanne, T. I. Nicas y B. H. Igrewski.** 1986. Expression in *Escherichia coli* and function of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F. *J. Bacteriol.* **167**:473-479.
- Wu, H. C.** 1996. Biosynthesis of lipoproteins, p. 1005-1014. In F. C. Neidhardt, R. Curtis, III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D. C.
- Wylie, J. L. y E. A. Worobec.** 1994. Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* glucose-selective OprB porin gene and distribution of OprB within the family *Pseudomonadaceae*. *Eur. J. Biochem.* **220**:505-512.
- Wylie, J. L., C. Bernegger-Egli, J. D. O'Neil y E. A. Worobec.** 1993. Biophysical characterization of OprB, a glucose-inducible porin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**:547-556.
- Yakushi, T., T. Tajima, S.-I. Matsuyama y H. Tokuda.** 1997. Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:2857-2862.
- Yamaguchi, K., F. Yu y M. Inouye.** 1988. A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* **53**:423-432.
- Yamano, Y., T. Nishikawa y Y. Komatsu.** 1993. Cloning and nucleotide sequence of anaerobically induced porin protein E1 (OprE) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* **8**:993-1004.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira y J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
- Yoneyama, H. y T. Nakae.** 1996. Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein. *Microbiology* **142**:2137-2144.





Biblioteca Universitaria de Granada



01053035