

~~T. Proo. 83/17~~

4/68

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA

| | |
|---------------------------------|-----------|
| BIBLIOTECA UNIVERSITARIA | |
| GRANADA | |
| Nº Documento | 613382196 |
| Nº Copia | 15496855 |

DEGRADACION Y TOLERANCIA DE TOLUENO
POR *Pseudomonas putida* DOT-T1E

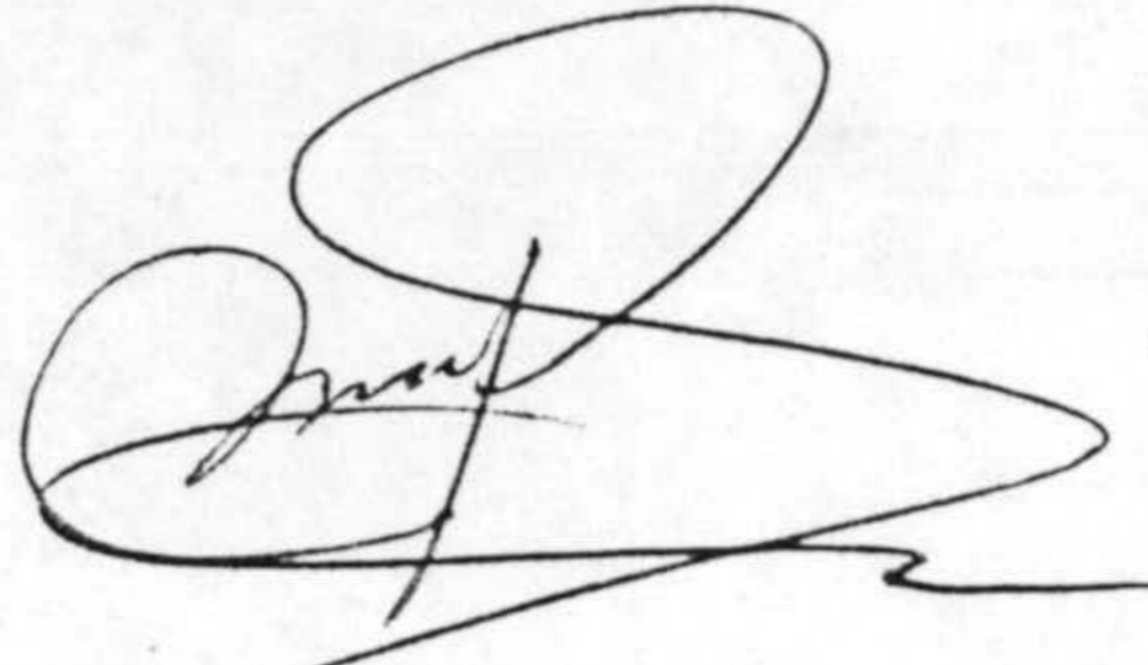
TESIS DOCTORAL

GILBERTO MOSQUEDA CANO
2000

TOLERANCIA Y DEGRADACION DE TOLUENO POR
Pseudomonas putida DOT-T1E

Memoria que presenta
Gilberto Mosqueda Cano
para aspirar al Título de Doctor

| |
|------------------------|
| UNIVERSIDAD DE GRANADA |
| Facultad de Ciencias |
| Fecha 29/02/00..... |
| ENTRADA NUM. 798..... |

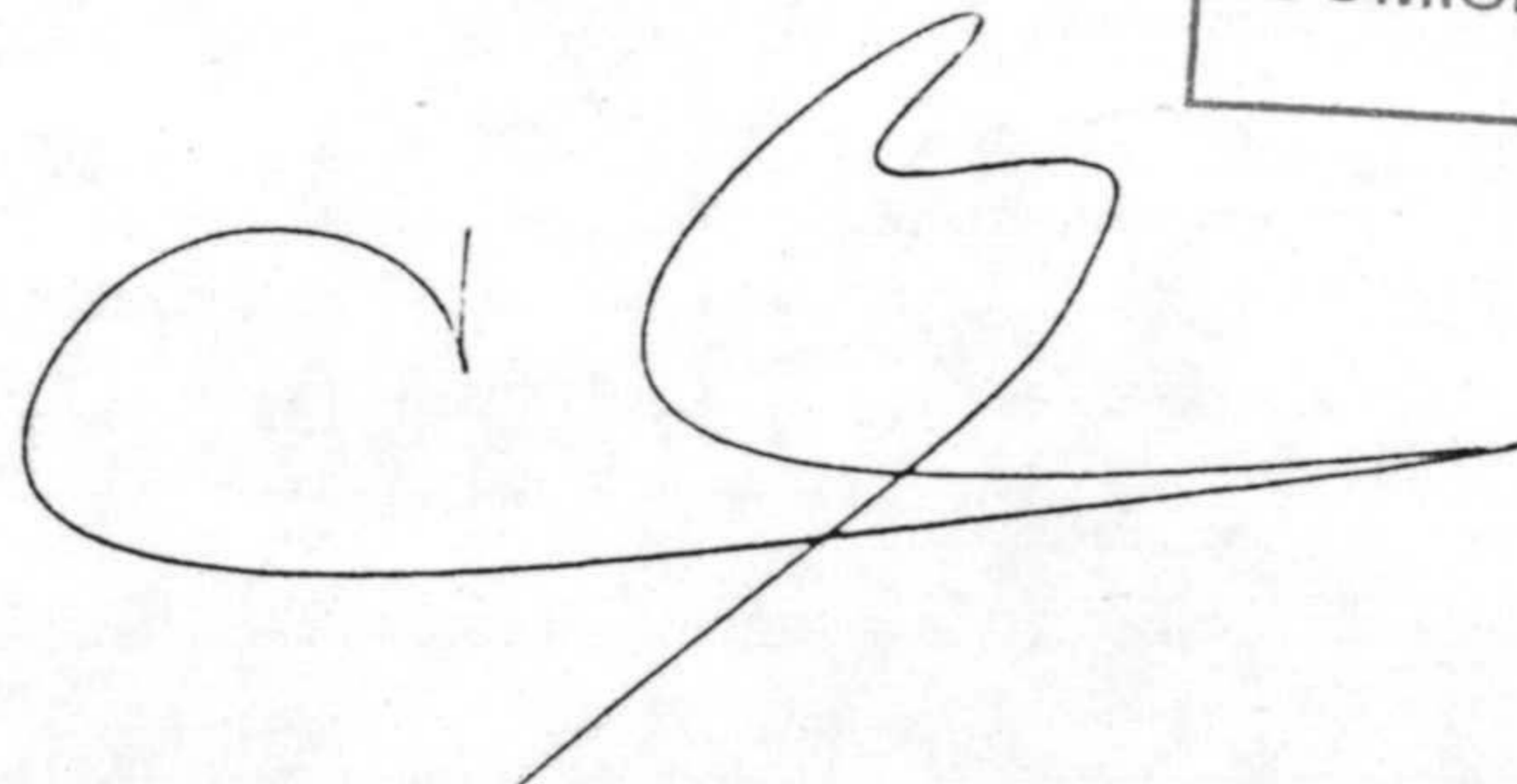


Fdo.: Gilberto Mosqueda Cano

Vº Bº

El Director

| |
|------------------------|
| UNIVERSIDAD DE GRANADA |
| 17 FEB. 2000 |
| COMISION DE DOCTORADO |



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

Universidad de Granada
2000

Esta Tesis 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

AGRADECIMIENTOS

Poco puedo retribuir a tantas personas e instituciones que contribuyeron a la realización de este trabajo.

EN ESPAÑA:

Al Dr. Juan Luis Ramos, director de nuestro grupo por su enorme confianza, paciencia, dedicación y apoyo siempre constantes.

A Estrella Duque, a quien agradezco sus atenciones, confianza y bienvenida a esta tierra, así como su colaboración en el proyecto y gran compañerismo.

A la Agencia Española de Cooperación Iberoamericana/ ICI.

A Silvia y Chechu por atenderme y contestar tantas consultas académicas.

A Adela, Miguel, Maxi, Susana y Abraham por su incondicional ayuda en todo momento y su gran amistad.

Amparo, Ana Hurtado, Ana Segura, Antonia, Antonio, Carmina, Frank, Gloria, Henry, Isabel, Lázaro, Ma. Angustias, Ma. Carmen, Ma. José, Ma. Mar, Manolo, Marian, Marichu, Mati, Patri, Raquel y Upe , gracias por compartir esos momentos agradables.

A Javi, Celerino, Estefanía, Alejandro y Elena.

A Javier Corpas, Dra. Ana Chueca, Dr. Julio López y todo el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas de esta Estación y Antonio Nuñez del CIDI, UAM.

EN MEXICO.

AI CINVESTAV-UNIDAD IRAPUATO

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

A la Dra. Alba Jofre

Al Dr. Octavio Paredes

Al Dr. Rafael Rivera

A Alicia Chagolla

A Verenice Ramírez

A Luisa López

A Lety Chong

A todos mil gracias por su apoyo.

INDICE

| | |
|----------------------------|---|
| Índice de figuras y tablas | v |
|----------------------------|---|

INTRODUCCION

| | |
|---|----|
| I.- Biología de <i>Pseudomonas</i> | 1 |
| II.- Hidrocarburos aromáticos | 3 |
| II. I. Aspectos generales de las rutas de degradación | 6 |
| II.II. Formación de derivados hidroxilados | 7 |
| II. III. Ruptura del anillo aromático y metabolismo intermediario hasta el ciclo de Krebs | 8 |
| II. IV. Rutas descritas para la degradación de tolueno | 12 |
| II. IV. I. Ruta Tol | 12 |
| II. IV. II. Ruta Tod | 15 |
| II. IV. III. Ruta de la tolueno 4-monooxigenasa | 18 |
| II. IV. IV. Ruta de la tolueno 3-monooxigenasa | 20 |
| II. IV. V. Ruta de la tolueno 2-monooxigenasa | 22 |
| III.- Tolueno: toxicidad y mecanismos de tolerancia | 25 |
| III. I. Alteración de la composición de fosfolípidos | 27 |
| III. II. Cambios en la composición de ácidos grasos | 27 |
| III. III. Isomerización <i>cis</i> → <i>trans</i> de ácidos grasos | 28 |
| III. IV. Regulación de la proporción de ácidos grasos saturados/insaturados | 30 |
| III. V. Cambio en las cabezas de fosfolípidos | 31 |
| III. VI. Alteraciones en otros componentes de membrana | 32 |
| III. VII. Bombas de eflujo y extrusión de disolventes | 33 |
| III. VIII. Tolerancia a disolventes en <i>E. coli</i> | 34 |
| III. IX. Identificación de bombas de eflujo en bacterias de género <i>Pseudomonas</i> | 36 |

| | |
|-----------|----|
| OBJETIVOS | 38 |
|-----------|----|

MATERIALES Y METODOS

| | |
|-----------------------------|----|
| I. Cepas y plásmidos | 39 |
| 2. Medios de Cultivo | 41 |
| 3. Aislamiento de ADN total | 42 |

| | |
|---|----|
| 4. Aislamiento de ADN plasmídico | 42 |
| 5. Preparación de células competentes | 43 |
| 6. Construcción de un banco genómico de <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E | 44 |
| 7. Transferencia de plásmidos por conjugación | 44 |
| 8. Electroforesis de ADN | 45 |
| 9. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa | 45 |
| 10. Secuenciación de ADN | 46 |
| 11. Reacciones de amplificación en cadena (PCR) | 47 |
| 12. Transferencia de ADN a membrana de hibridación | 47 |
| 13. Mutagénesis | |
| Por transposición | 48 |
| Por intercambio alélico | 48 |
| 14. Sobrevivencia de cultivos bacterianos a choques de tolueno | 49 |
| 15. Aislamiento y purificación de ARN | 49 |
| 16. RT-PCR | 50 |

RESULTADOS

| | |
|---|----|
| I. RUTA DE ASIMILACIÓN DE TOLUENO POR <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E | 52 |
| 1.1 Obtención de mutantes incapaces de crecer en tolueno | 52 |
| 1.2 Rescate y secuenciación de los genes <i>tod</i> de la genoteca de <i>P. putida</i> DOT-T1E | 54 |
| 1.3 Identificación del sitio de iniciación de la transcripción del gen <i>todX</i> | 56 |
| 1.4 Tolerancia a solventes en mutantes incapaces de metabolizar tolueno | 57 |
| II. IDENTIFICACION DE LOS GENES QUE CODIFICAN UNA BOMBA DE EFLUJO DE TOLUENO ADYACENTE A LOS GENES <i>tod</i> | 58 |
| 2. 1. Localización de genes homólogos a bombas de eflujo | 58 |
| 2. 2. Determinación de la estructura operónica de los genes <i>ttgDEF</i> | 61 |
| 2. 3 Construcción de un mutante nulo de <i>P. putida</i> DOT-T1 por reemplazo génico | 62 |
| 2. 4. Análisis fenotípico del mutante nulo en <i>ttgDEF</i> | 63 |
| 2. 5. Construcción de un doble mutante nulo <i>ttgABC</i> , <i>ttgDEF</i> y su análisis fenotípico | 64 |
| 2. 6. Localización de los genes <i>ttgDEF</i> en cepas que comparten la ruta <i>tod</i> | 65 |
| III. IMPLICACION DE <i>todS</i> y <i>todT</i> EN REGULACION | 66 |
| 3. 1. Extensión de <i>todS</i> | 66 |
| 3. 2. Posibilidad de un solo transcrito | 67 |

| | |
|--|----|
| 3. 3. Obtención de mutantes en los genes <i>todS</i> y <i>todT</i> y expresión de los promotores <i>todX</i> y <i>todS</i> | 68 |
|--|----|

DISCUSION

| | |
|---|-----|
| 1. 1. Identificación de la ruta de degradación de tolueno en <i>P. putida</i> DOT-T1E | 118 |
| 1. 2. Análisis de las secuencias de los productos génicos de la ruta <i>tod</i> | 119 |
| 1. 3. Regulación de la ruta <i>tod</i> | 120 |
| II. Genes de extrusión | 123 |
| Propuesta del modelo de regulación de los operones <i>tod</i> | 127 |

| | |
|--------------|-----|
| BIBLIOGRAFIA | 128 |
|--------------|-----|

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1.- Rupturas <i>orto</i> y <i>meta</i> del catecol | 9 |
| Figura 2.- Ruta de degradación de tolueno por el plásmido pWWW0 | 13 |
| Figura 3.- Organización de los genes de la ruta TOL | 15 |
| Figura 4.- Degradación de tolueno a través de la ruta TOD | 16 |
| Figura 5.- Ruta de degradación de tolueno por <i>P. mendocina</i> KR1 | 19 |
| Figura 6.- Ruta de degradación de tolueno por <i>P. pickettii</i> PK01 | 21 |
| Figura 7.- Organización de la ruta de tolueno 2-monooxigenasa | 24 |
| Figura 8.- Efecto de la isomerización <i>cis</i> → <i>trans</i> en los fosfolípidos de membrana | 28 |
| Figura 9.- Mapa parcial de restricción del plásmido pT1-G1 | 71 |
| Figura 10.- Mapa parcial de restricción del plásmido pT1-125 | 72 |
| Figura 11A.- Organización de los genes <i>tod</i> del cromosoma de <i>P. putida</i> DOT-T1E | 73 |
| Figura 11B.- Secuencia del operón <i>tod</i> | 74 |
| Figura 12.- Transcripción del operón <i>tod</i> | 92 |
| Figura 13.- Sobrevivencia a tolueno de mutantes de <i>P. putida</i> DOT-T1 en genes de la ruta | 93 |
| Figura 14.- Secuencia del operón <i>ttgDEF</i> | 94 |
| Figura 15.- Mapa de restricción y organización de los genes de los operones <i>todST</i> y <i>ttgDEF</i> | 104 |
| Figura 16.- RT-PCR de los genes <i>ttgDEF</i> | 105 |
| Figura 17.- Alineamiento de la secuencia de TtgD | 106 |
| Figura 18.- Transcripción de los genes <i>ttgDEF</i> | 107 |
| Figura 19A.- Interrupción de <i>ttgD</i> con el gen de resistencia a telurito | 108 |
| Figura 19B.- Hibridación de ADN cromosomal de mutantes en <i>ttgD</i> | 109 |
| Figura 20.- Sobrevivencia a choque de tolueno en mutantes <i>ttgD</i> | 110 |
| Figura 21.- Amplificación de región intergénica de los genes <i>todST</i> y <i>ttgDEF</i> en cepas de <i>Pseudomonas</i> . | 111 |
| Figura 22.- Transcripción del gen <i>todS</i> | 112 |
| Figura 23.- RT-PCR de la región intergénica <i>todH-todS-todT</i> | 113 |
| Figura 23.- Mapa de los genes reguladores <i>todS</i> y <i>todT</i> | 114 |
| Figura 24.- Reemplazo de los genes <i>todS</i> y <i>todT</i> | 115 |

| | |
|---|-----|
| Figura 26.- Efecto de las mutaciones en <i>todS</i> y <i>todT</i> sobre la expresion de <i>todX</i> | 116 |
| Figura 25.-Transcripción del operón <i>todST</i> en mutantes en estos genes | 117 |
| Figura 27.- Modelo de regulación propuesto para la regulación del operón <i>todX-H</i> y <i>todST</i> | 127 |
| Tabla 1.- Cepas utilizadas en el trabajo | 39 |
| Tabla 2.- Plásmidos utilizados | 40 |
| Tabla 3.- Componentes, función y homología del operón <i>tod</i> | 92 |

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

I.- Biología de *Pseudomonas*

Pseudomonas es el nombre que se utilizó para designar bacterias gram negativas, no esporuladas y polarmente flageladas. Era y es un grupo heterogéneo de microorganismos, en el que se incluían bacterias con una variada fisiología.

El género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez por Migula (1894) en un simple párrafo de dos líneas cuya traducción sería: "Células con órganos polares para su movilidad. La formación de esporas tiene lugar en algunas especies, aunque es un evento raro (por ejemplo *Pseudomonas violacea*)". Esta definición fué generalmente aceptada y un número de especies muchas de las cuales habían sido asignadas a otros géneros fueron rebautizadas en años posteriores como especies del género *Pseudomonas*.

A principios del siglo XX los microbiólogos y en particular la escuela de Deltt estableció que las cepas de *Pseudomonas* eran muy comunes en habitats naturales particularmente en suelo, agua, alimentos y plantas enfermas. La ubicuidad de estas bacterias y la capacidad para desarrollarse en medios de cultivo muy simples hicieron que desde principios de siglo se consideraran a las bacterias de este género como protagonistas en el proceso de mineralización de materia orgánica en la naturaleza, un papel que fue claramente demostrado por den Dooren de Jong (1926). Su trabajo introducía una metodología extensa que permitía una buena caracterización fenotípica de cepas pero que tenía serias limitaciones en el aspecto taxonómico.

Posteriormente y con objeto de definir en mayor detalle se consideraronn como importantes las siguientes propiedades fisiológicas: la reacción de oxidasa, requerimientos de factor de crecimiento, desnitrificación, hidrólisis de gelatina,

acumulación de poli- β -hidroxibutirato, arginina dihidrolasa y la capacidad de ruptura de anillos aromáticos

Las cepas de *Pseudomonas* son en general aerobias, aunque muchas cepas utilizan nitrato como aceptor de electrones bajo condiciones anaeróbicas (Stainer et al., 1966; Sands et al., 1967; Davis, 1967; Ballard et al., 1968; Auling et al., 1978). En la desnitrificación, el producto final puede ser bien N_2O o N_2 , y el proceso es reprimido por oxígeno. Recientemente se ha descrito una cepa de *Pseudomonas* que utiliza 2,4,6-trinitrotolueno como aceptor alternativo de electrones (Esteve-Núñez et al., 2000). Por otro lado, muchas especies son capaces de llevar a cabo una reducción asimilatoria de nitrato a amonio en condiciones aeróbicas (Hartingsvelt et al., 1971).

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos opera en todas las cepas que han sido examinadas hasta el momento (Brammar and Clarke, 1964; Mandelstam and Jacoby, 1965; Ornston, 1966; Hartline and Gunsalus, 1971).

En 1986 Palleroni propuso cinco grupos taxonómicos dentro del género "*Pseudomonas*", esta propuesta se basó en análisis de hibridación de ADN-ADN. Posteriormente la secuenciación de los ARNr 16S reflejaron la diversidad entre grupos y solo aquel denominado grupo ARN-I es el que hoy en día se considera como verdaderas *Pseudomonas*. El grupo incluye entre otras a las especies *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. syringae* y otras.

El uso de medios químicamente definidos con compuestos orgánicos simples ha revelado que una de las más notables propiedades de los miembros del género *Pseudomonas* es su connotada versatilidad nutricional (den Dooren de Jong, 1926; Palleroni, 1986; Stainer et al., 1966).

El espectro nutricional de cada especie es característica y en general, la variabilidad entre las cepas de algunas especies es menor. En contraste con muchos otros grupos bacterianos, muchas *Pseudomonas* no se pueden distinguir en

base a la utilización de azúcares, lo cual en muchos otros microorganismos es básico y común. De hecho, varias especies como *P. tetosteroni* y *P. palleronii* no usan estos compuestos.

Los compuestos orgánicos usados por muchas especies de *Pseudomonas* incluyen hidrocarburos lineales y aromáticos, carbohidratos, ácidos, alifáticos, aminas, amidas, aminoácidos, alcoholes y compuestos aromáticos. De estos diferentes grupos químicos, los compuestos aromáticos son particularmente interesantes dadas las implicaciones bioquímicas de las distintas rutas por las cuales *Pseudomonas* es capaz de metabolizarlos.

Otra curiosidad del género es que incluye cepas patógenas oportunistas de animales, por ej. *P. aeruginosa* y de plantas por ej. *P. syringae* y cepas que estimulan el crecimiento de plantas actuando como fungicidas, por ej. *P. fluorescens* (Lugtenters, 1999)

II.- Hidrocarburos aromáticos

El benceno y los compuestos derivados de él se caracterizan por la posesión de una gran energía de resonancia, lo cual se manifiesta en su estabilidad termodinámica y en las propiedades químicas que son radicalmente diferentes de las observadas para otros hidrocarburos insaturados u olefinas. En general, los compuestos químicos que presentan estas propiedades se conocen como aromáticos y éstos pueden contener uno o más anillos bencénicos y presentar o no distintas sustituciones.

Los estudios sobre la distribución ambiental de hidrocarburos aromáticos policíclicos se iniciaron en 1947 cuando Kern señaló la presencia de criseno en muestras de suelo (Kern, 1947) y en los siguientes 20 años fueron

detectados entre 10 y 15 poliarenos. El desarrollo de nuevos métodos analíticos como la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas y los empleados para extracción y aislamiento de hidrocarburos policíclicos aromáticos condujeron a la detección de cientos de estos compuestos (Blumer y Rudrum, 1970). La elucidación de estructuras individuales de hidrocarburos aromáticos en suelo ha sido lenta y relativamente pocos compuestos han sido identificados inequívocamente.

Sin embargo se puede decir que los hidrocarburos aromáticos son ubicuos en la naturaleza. Aunque es discutible su origen en el ambiente, es aceptado que la mayoría no son de origen biosintético sino derivados de una pirólisis natural de compuestos orgánicos (Gibson y Subramanian, 1984). Los tipos de hidrocarburos aromáticos formados dependen de la temperatura de la pirólisis. A altas temperaturas (2000°C) los productos principales en los no sustituidos; a temperaturas intermedias (400-800°C) se forman de moléculas sustituidas con grupos alquílicos. El petróleo que se forma a bajas temperaturas, contiene hidrocarburos aromáticos policíclicos con dos o tres sustituyentes alquilos (Blumer, 1976). Los aromáticos monocíclicos como benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos también han sido detectadas en varios tipos de suelos (Dagley, 1981). Estos compuestos mencionados se encuentran entre los 50 productos que se sintetizan industrialmente en mayor volumen, y cuya cifra ronda millones de toneladas por año. Estos compuestos son ampliamente usados como combustibles y disolventes de uso industrial. Son también la materia prima para la producción de compuestos farmacéuticos, agroquímicos, polímeros, explosivos y muchos otros. El uso masivo de los hidrocarburos aromáticos de síntesis industrial ha conducido inevitablemente a su liberación en el medio ambiente bien de manera accidental o de alguna otra cuyo problema ha tomado cada vez más interés en su control por algunos sectores de población o agencias institucionales dedicadas a ello.

La biodegradación de estos compuestos puede considerarse por un lado como parte de un proceso normal del ciclo del carbono, y por otro como la remoción de contaminantes del ambiente sintetizados *a priori*.

La capacidad de las bacterias para utilizar hidrocarburos aromáticos para su crecimiento fué primero demostrada en 1908 por Stormer quien aisló una cepa de *Bacillus hexacarbovorum* gracias a su capacidad de utilizar tolueno y xileno como fuente de carbono. En 1913 Söhngen describió la utilización de benceno por microorganismos, y un año más tarde Wagner aisló dos organismos, *Bacterium benzoli* a y b, los cuales ambos eran capaces de crecer en benceno, tolueno y xileno. La existencia universal de bacterias de suelo capaces de metabolizar compuestos aromáticos fué demostrada por Gray y Thornton (1928), ya que observaron que de 245 muestras de suelo analizadas, 146 contenían bacterias capaces de oxidar naftaleno, fenol o cresol. Esto fué el comienzo de un estudio más detallado acerca de degradación lo cual tuvo un gran auge tras la segunda guerra mundial.

El interés por la degradación de hidrocarburos aromáticos se ha acentuado en los últimos años como consecuencia de accidentes ambientales, catastróficos y otros por la carrera industrial en la producción de compuestos de distinta índole que finalmente son liberados al medio ambiente por distintas razones. Esto ha resultado un reto para muchos investigadores interesados en conocer y encontrar la manera de eliminar este tipo de compuestos por microorganismos bien caracterizados (Alexander, 1981), el aislamiento y utilización de otros nuevos (Roberts, 1987) y la capacidad de desarrollar nuevas vías metabólicas usando ingeniería genética (Timmis et al., 1988).

La mayoría de las reacciones llevadas a cabo por bacterias aeróbicas para la degradación de hidrocarburos aromáticos pertenecen a las mismas categorías que para los compuestos aromáticos en general. Solo las reacciones que

preparan el anillo de benceno para su apertura tienden a ser especializadas ya que en la formación y posterior apertura del catecol es necesaria la introducción de 2 átomos de oxígeno para formar el dihidrodiol correspondiente en el primer paso.

La hidroxilación preliminar por microorganismos aerobios produce el núcleo reactivo, y éste es posteriormente abierto por la acción de las dioxigenasas. En ambientes con limitación o ausencia de oxígeno la estabilización de la resonancia es salvada por organismos anaerobios mediante la reducción de los dobles enlaces conjugados del núcleo. Estas reacciones han sido estudiadas en consorcios anaeróbicos que utilizan fenoles, ácido benzoico y benzoatos sustituidos que transforman éstas en metano y dióxido de carbono (Young, 1984).

II.I. Aspectos generales de las rutas de degradación aeróbica de compuestos aromáticos

En general, para la desestabilización del anillo aromático los microorganismos han desarrollado una estrategia común que es la activación del anillo mediante la introducción de dos grupos hidroxilo (Dagley, 1986). Una característica común de los mecanismos de degradación de compuestos aromáticos por las bacterias es la canalización de sustratos hasta un número limitado de productos, los cuales son posteriormente catabolizados por las rutas centrales del metabolismo celular. Existe un gran número de enzimas que catalizan las reacciones iniciales de las rutas catabólicas en los distintos microorganismos. El perfil de sustratos de estas enzimas es amplio, y los tipos de reacciones que llevan a cabo están encaminados a la activación del anillo aromático.

Las rutas descritas en bacterias para la asimilación aeróbica de sustratos aromáticos se puede considerar dividida en tres partes (Dagley, 1986, Harayama y Timmis, 1992): la formación de derivados hidroxilados, la ruptura de éstos por

dioxigenasas y la conversión del producto de ruptura en compuestos que pueden entrar directamente al metabolismo central de la célula.

II.II Formación de derivados hidroxilados

Uno de los primeros pasos en la degradación de compuestos aromáticos, implica la introducción de uno o dos grupos hidroxilos en el anillo aromático (Harayama y Timmis, 1989). Un mismo compuesto puede sufrir distintos tipos de ataque que conduzcan a la forma activada con los dos grupos hidroxilo. La introducción de uno o dos grupos hidroxilo, mono- o dihidroxilación, es llevada a cabo por enzimas denominadas oxigenasas que catalizan la incorporación del oxígeno a sustratos orgánicos como grupos hidroxilo. Las oxigenasas que catalizan la incorporación de un solo átomo de oxígeno en su sustrato se denominan monooxigenasas. El segundo átomo de oxígeno es reducido a H₂O. Las oxigenasas que catalizan la incorporación de los dos átomos de oxígeno se denominan dioxigenasas. Estas incorporan dos grupos hidroxilo en el anillo aromático a expensas de oxígeno y NAD(P)H (Harayama, et al., 1992).

En las reacciones aeróbicas descritas para la formación de derivados dihidroxilados a partir de tolueno, existen monooxigenasas capaces de hidroxilar inicialmente las posiciones *orto*, *meta* o *para* del anillo aromático (Shields et al., 1989, Olsen et al., 1994 y Whited y Gibson, 1991a). Mientras que el *o*- y *m*-cresol formados son de nuevo hidroxilados para producir 3-metilcatecol, la oxidación del *p*-cresol sigue un mecanismo distinto, primero se oxida secuencialmente hasta *p*-hidroxibenzoato y éste es hidroxilado a 3,4-dihidroxibenzoato. Alternativamente, la cadena alquílica lateral del tolueno puede ser atacada por una monooxigenasa que la oxida hasta un grupo alcohol; el alcohol bencílico formado es sustrato de deshidrogenasas que lo oxidan

secuencialmente hasta ácido benzoico. Posteriormente, éste es descarboxilado y oxigenado para producir catecol (Worsey y Williams, 1975). Cuando el anillo es sustrato de una dioxigenasa se forma primero un *cis*-diol que es posteriormente oxidado hasta 3-metilcatecol (Gibson et al., 1970).

II.III. Ruptura del anillo aromático y metabolismo intermediario hasta el ciclo de Krebs

Tras la formación de los derivados dihidroxilados, actúan distintas dioxigenasas encargadas de la ruptura del anillo aromático (Harayama y Reikik, 1989). Se han descrito dos tipos de fisión. En la Figura 1 se muestran los dos tipos de ruptura del catecol cuando es sustrato de ruptura *orto* o *meta*. Cuando la ruptura ocurre entre un átomo de carbono con un grupo hidroxilo y el adyacente sin hidroxilo (extradiólica), se produce un semialdehído y a este tipo de ruptura se conoce como fisión *meta* (Dagley et al., 1965). La dioxigenasa para la que primero se determinó la estructura primaria, fue la denominada catecol 2,3-dioxigenasa codificada por el gen *xylE* del plásmido catabólico TOL (Nakai et al., 1983). Esta enzima, está formada por cuatro subunidades idénticas de 32 kDa que contienen un átomo de Fe^{2+} como grupo prostético por cada subunidad, el cual es esencial para la catálisis enzimática. El producto derivado de la acción de esta dioxigenasa, es el semialdehído del ácido 2-hidroximucónico (o el derivado sustituido) que es de color amarillo. Debido a la producción de color, el gen estructural para esta enzima se ha utilizado como gen "reportero" en biología molecular (Hanh et al., 1991). El perfil de sustratos de esta enzima es muy amplio y se ha descrito que oxida: catecol, 3-metil-, 3-etil-, 4-metilcatecol y 3,4-dimetilcatecol. El 3-clorocatecol inhibe irreversiblemente la actividad de esta enzima (Bartels et al., 1984).

Cuando la ruptura del anillo dihidroxilado se lleva a cabo entre los dos grupos hidroxilos (intradiólica), se produce el ácido *cis, cis*-mucónico y a este tipo de reacción se conoce como fisión orto (Ornston, 1966). Las enzimas típicas que llevan a cabo rupturas orto son la catecol 1,2-dioxigenasa y la protocatecuato 3,4-dioxigenasa. Estas enzimas se diferencian de las de ruptura *meta* en que contienen Fe^{3+} como grupo prostético. En contraste a las dioxigenasas de fisión *meta*, estas enzimas están generalmente compuestas por una o dos subunidades diferentes (Ludwig et al., 1984).

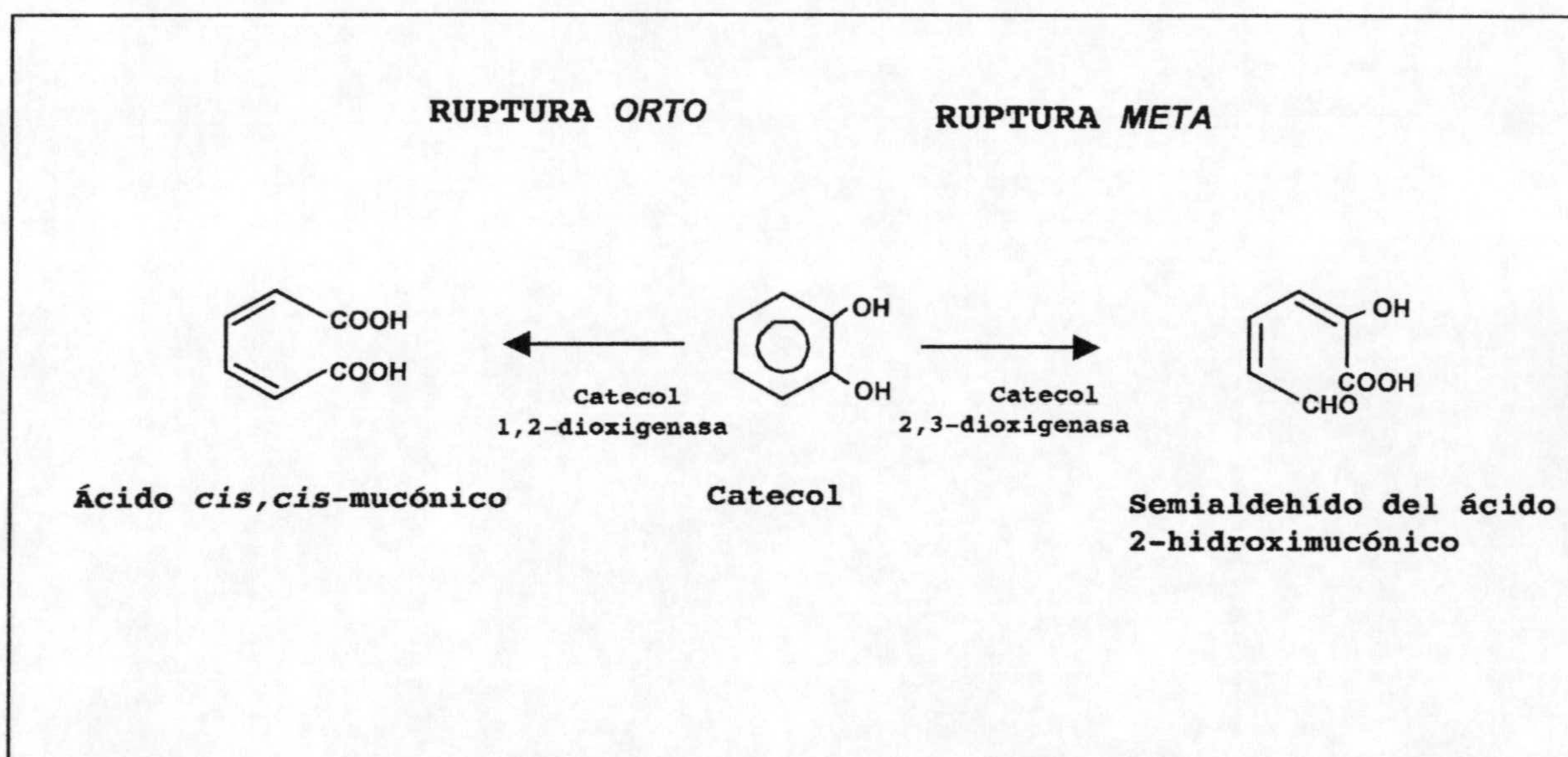


Figura 1. Rupturas orto y meta del catecol

Aunque en la mayoría de las rutas de degradación de hidrocarburos aromáticos se produce la introducción de dos grupos hidroxilo y posteriormente el ataque por dioxigenasas. Una excepción a esta regla ocurre en una cepa de *Pseudomonas* sp., que crece a expensas de nitrobenceno. Éste, es transformado en 2-aminofenol el cual es atacado por la enzima 2-aminofenol 1,6-dioxigenasa, que produce el semialdehído del ácido 2-aminomucónico (Lendenmann y Spain, 1996).

El que ocurra una fisión *orto* o *meta* está directamente relacionado con dos factores fundamentales: en primer lugar, depende de las sustituciones del anillo. A pesar de que las enzimas iniciales de estas rutas con frecuencia muestran una especificidad de sustratos relajada, y son capaces de transformar sustratos con diferentes sustituyentes, las rutas *meta* se utilizan generalmente en el metabolismo de aromáticos con sustituyentes alquílicos; mientras que las rutas *orto* utilizan normalmente como sustratos anillos no sustituidos o con sustituciones del tipo de átomos de halógenos. Esto es debido a que como hemos referido anteriormente, las enzimas de la ruta *meta* pierden su actividad catalítica en presencia de sustratos clorados. Sin embargo, recientemente se han descrito dos cepas de *Pseudomonas putida* que crecen a expensas de clorobenceno a través de una ruta *meta* (Mars et al., 1997, Riegert et al., 1998).

Por su parte, enzimas que catalizan rupturas *orto*, como la catecol 1,2-dioxigenasa, tienen muy baja afinidad por alquilaromáticos, e incluso si estos compuestos se rompen por esta vía, por lo general se acumulan posteriormente compuestos no metabolizables del tipo de las alquil-lactonas (Harayama et al., 1987, Reineke et al., 1982, Rojo et al., 1987).

Por otro lado, el que un compuesto se degrade por una u otra ruta depende de la regulación a la que éstas se encuentran sometidas que es a su vez consecuencia de que la ruta se induzca por el sustrato de la misma o un intermediario de la ruta, frecuentemente un derivado del producto del intermediario dihidroxilado del sustrato inicial (Feist y Hegeman, 1969; McFall, 1998).

Muchos organismos del suelo tienen una o más rutas para la degradación de un sustrato aunque para cada uno de éstos se induce una ruta específica. Así el benzoato es descarboxilado y oxidado hasta catecol, el cual se ha descrito que es degradado en *Pseudomonas putida* a través de la ruta *orto* (Johnson y Stanier, 1971); aunque el catecol no es inductor

ni de orto ni de meta, el producto de su ruptura, el ácido *cis,cis*-mucónico acumulado como consecuencia de la acción del nivel basal de la catecol 1,2-dioxigenasa, induce la ruta orto (Ornston, 1966, Murray y Williams, 1974). Si el sustrato es 3-metilbenzoato, cresoles o fenol, éstos actúan como inductores de la ruta meta, (Feist y Hegeman, 1969, Sala-Trepat et al., 1972; Ramos et al., 1986; Shingler et al., 1995).

En los últimos años se ha descrito una cepa de *Pseudomonas* sp. que es capaz de sintetizar diferentes enzimas para la ruptura del anillo aromático siendo capaz de actuar simultáneamente sobre diferentes catecoles sustituidos, resultantes de la degradación de mezclas de compuestos aromáticos, tales como benceno, tolueno, etilbenceno, anillos bencénicos con grupos halógenos o naftaleno (Johnson y Olsen, 1997).

Los productos de la fisión orto de anillos aromáticos, el ácido *cis,cis*-mucónico o sus derivados, son transformados hasta un intermediario común, el β -cetoadipato, y éste hasta succinato y acetil-CoA, que se degradan por las rutas centrales del metabolismo celular.

Los compuestos derivados del semialdehído del ácido 2-hidroximucónico, productos de la fisión meta de anillos aromáticos, se pueden procesar a través de dos vías alternativas pero que se sintetizan simultáneamente en la célula. Una implica la actuación de una deshidrogenasa que produce 4-oxalocrotonato el cual es posteriormente tautomerizado y descarboxilado hasta el 2-oxo-pent-4-enolato (Nishizuka et al., 1962). La segunda se describió posteriormente e implica una actividad hidrolasa del semialdehído del ácido 2-hidroximucónico que produce directamente el 2-oxo-pent-4-enolato (Dagley et al., 1965, Bayly y Dagley, 1969). Este compuesto es finalmente degradado hasta intermediarios del ciclo de Krebs. Mientras que el catecol y el 4-metilcatecol son sustratos de la deshidrogenasa, el 3-metilcatecol es atacado por la hidrolasa

(Sala-Trepat *et al.*, 1972; Harayama *et al.*, 1984). Dado que ambas vías se inducen simultáneamente, el que se utilice una u otra es función de la K_m de la deshidrogenasa y de la hidrolasa por el catecol y los metilcatecol (Harayama *et al.*, 1984) .

II. IV Rutas descritas para biodegradación aerobia de tolueno por parte de cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*

II. IV. I Ruta TOL

La mejor ruta caracterizada a nivel bioquímico y molecular es la ruta codificada en el plásmido catabólico pWW0 de *Pseudomonas putida* mt-2 (Worsey y Williams, 1975).

La primera enzima de la ruta es la denominada tolueno/xileno monooxigenasa que oxida tolueno, *m*- y *p*-xileno hasta alcohol metilbencílico. Esta enzima consta de dos subunidades codificadas por los genes *xylA* y *xylM*, cuyos productos de 35 y 40 kDa respectivamente, son necesarios para la actividad enzimática (Harayama *et al.* , 1989). El gen *xylB* codifica la enzima alcohol bencílico deshidrogenasa, que cataliza la oxidación de alcohol bencílico a benzaldehído con la reducción concomitante de NAD^+ a NADH (Worsey y Williams, 1975). La oxidación de benzaldehído a benzoato la lleva a cabo la enzima benzaldehído deshidrogenasa, que está codificada por el gen *xylC* (Figura 2) Esta serie de reacciones constituyen la denominada ruta "upper".

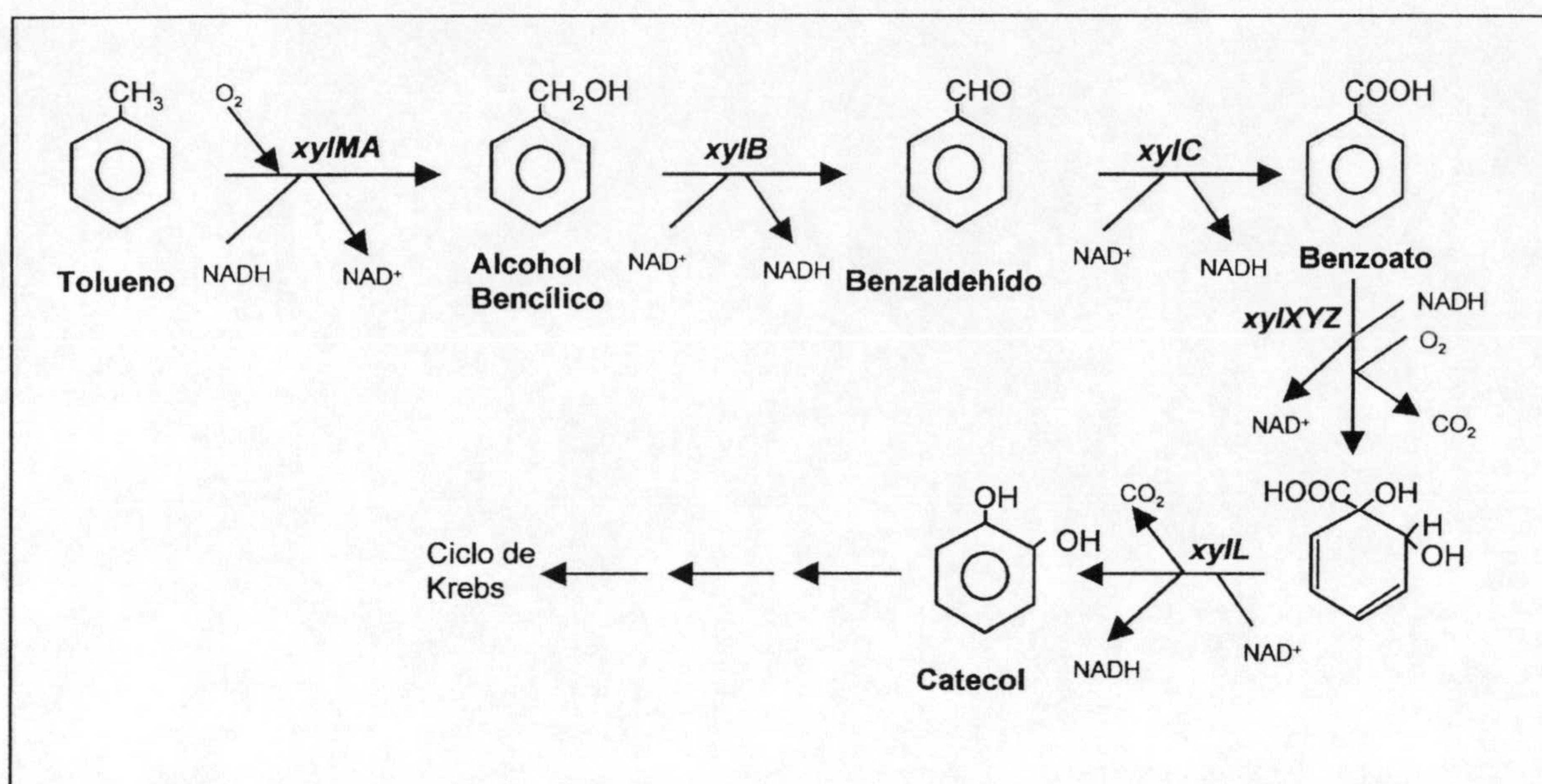


Figura 2. Ruta de degradación de tolueno por el plásmido pWW0.
xylMA: tolueno monooxigenasa; *xylB*: alcohol bencílico deshidrogenasa; *xylC*: benzaldehído deshidrogenasa; *xylXYZ*: toluato 1,2 dioxigenasa; *xylL*: 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato deshidrogenasa.

Una vez formados los ácidos carboxílicos aromáticos correspondientes, actúan las enzimas codificadas en la ruta *meta* de TOL. Así, el ácido benzoico o los derivados correspondientes de la oxidación de toluenos y xilenos por enzimas de la ruta "upper" son transformados en los sustratos activados dihidroxilados que son sustrato de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa, codificada por el gen *xylE*, que tras su acción los convierte en intermediarios del ciclo de Krebs.

Los genes catabólicos del plásmido TOL pWW0 se encuentran organizados en dos unidades transcripcionales denominadas "upper" y "meta". El operón "upper" *xylUWCMABN*, codifica las enzimas implicadas en la conversión de tolueno a benzoato (Harayama *et al.*, 1986). El producto de los genes *xylU*, *xylW* y *xylN* parecen que no es necesario para el crecimiento en tolueno (Harayama *et al.*, 1989, Williams *et al.*, 1991). La información para la transformación de benzoato hasta

intermediarios del ciclo de Krebs está codificada en el operón *meta*. Éste, tiene un tamaño de 11 kb y lleva la información de 13 genes *xylXYZLTEGFJQKIH* siendo uno de los operones de mayor tamaño entre los descritos en procariotas (Harayama et al. , 1990), y codifica la información genética necesaria para la degradación de los benzoatos y metilbenzoatos hasta acetaldehído y piruvato (Harayama et al., 1984) (Figura 2). En 3' con respecto al operón *meta*, existen dos genes reguladores *xylS* y *xylR* que están implicados en el control transcripcional de los genes del operón "upper" y "meta" (Inoue et al., 1981, 1983 y 1986, Ramos et al., 1987). Estos genes reguladores se transcriben desde promotores independientes y divergentes.

El modelo general de regulación aceptado hoy en día, está compuesto por dos circuitos (Ramos et al., 1997b): uno, que funciona cuando las células se cultivan con metilbenzoatos (circuito *meta*) y otro más complejo que funciona cuando las células utilizan tolueno o xilenos como fuente de carbono (sistema en cascada). La Figura 3 resume el sistema a.- En células cultivadas en ausencia de efectores, glucosa o glicerol, el gen *xylS* se expresa a bajo nivel desde el promotor P_{s2} que es dependiente de σ^{70} y se produce la proteína XylS en forma inactiva.

En presencia de efectores, por ej. metil benzoatos, en el medio éstos interaccionan con la proteína XylS activándola; en estas condiciones ésta estimula la transcripción de la ruta *meta* desde el promotor P_m . b.-En células cultivadas en presencia de xilenos/tolueno, el regulador que controla la transcripción es XylR. La proteína XylR controla su propia síntesis. Ésta, en presencia de tolueno/xilenos se activa y estimula la transcripción del operón "upper" desde el promotor P_u . La proteína XylR activada por tolueno/xilenos también estimula la expresión del gen *xylS* desde el promotor P_{s1} dependiente de σ^{54} , ello da lugar a la hiperproducción de XylS que, incluso en ausencia de efectores estimula la transcripción de la ruta *meta*, así se consigue una cascada que

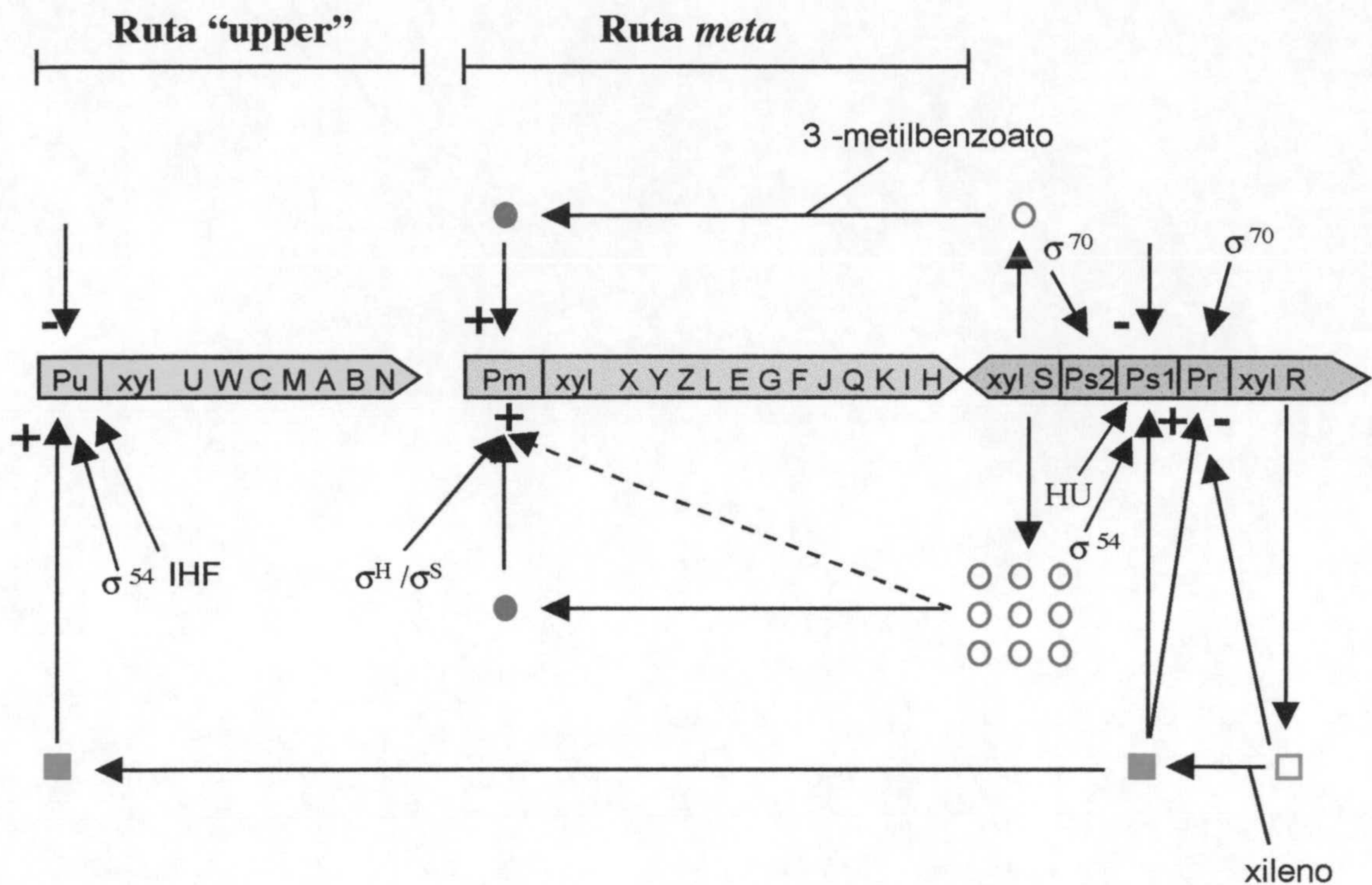


Figura 3. Organización de los genes de la ruta TOL y modelo general de regulación. + y - indican respectivamente activación y represión. El regulador XylS se representa por círculos y el regulador XylR por cuadros. Los símbolos abiertos y cerrados indican las formas inactivas y activas del regulador respectivamente.

En presencia de efectores, por ej. metil benzoatos, en el medio éstos interaccionan con la proteína XylS activándola; en estas condiciones ésta estimula la transcripción de la ruta meta desde el promotor Pm. b.-En células cultivadas en presencia de xilenos/tolueno, el regulador que controla la transcripción es XylR. La proteína XylR controla su propia síntesis. Ésta, en presencia de tolueno/xilenos se activa y estimula la transcripción del operón "upper" desde el promotor Pu. La proteína XylR activada por tolueno/xilenos también estimula la expresión del gen xylS desde el promotor Ps1 dependiente de σ^{54} , ello da lugar a la hiperproducción de XylS que, incluso en ausencia de efectores estimula la transcripción de la ruta meta, así se consigue una cascada que

en el anillo aromático. Esta reacción es llevada a cabo por una enzima multicomponente denominada tolueno dioxigenasa. Los genes que codifican esta enzima heteromultimérica son los denominados *todC1C2BA*, los cuales han sido caracterizados bioquímicamente. Esta proteína consta de tres elementos funcionales del sistema enzimático que son: una flavoproteína con actividad reductasa, codificada por el gen *todA*, una ferredoxina codificada por el gen *todB* y otro componente que es una proteína con hierro y azufre que posee, una subunidad grande (*todC1*) y otra pequeña (*todC2*) (Gibson et al., 1990). Tras la formación del *cis*-tolueno dihidrodíol, la enzima *cis*-dihidrodíol deshidrogenasa (codificada por el gen *todD*) reduce NAD^+ a NADH y oxida el *cis*-tolueno dihidrodíol a 3-metilcatecol. La enzima 3-metilcatecol 2,3-dioxigenasa, codificada por el gen *todE*, transforma al 3-metilcatecol en 2-hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienoato (HOHD). Los genes *todFGIH* codifican para las enzimas necesarias del paso del HOHD hasta piruvato y acetil-CoA.

Todos los genes para el catabolismo de tolueno en esta cepa, están en un único operón de 10,3 kb en el orden *todXFC1C2BADEGIH*. Estos genes han sido clonados y secuenciados (Lau et al., 1994 y 1997, Menn et al., 1991, Wang et al., 1995, Zylstra y Gibson, 1989) y se ha determinado la función que codifican. Un esquema con los pasos iniciales de la ruta se presenta en la Figura 4.

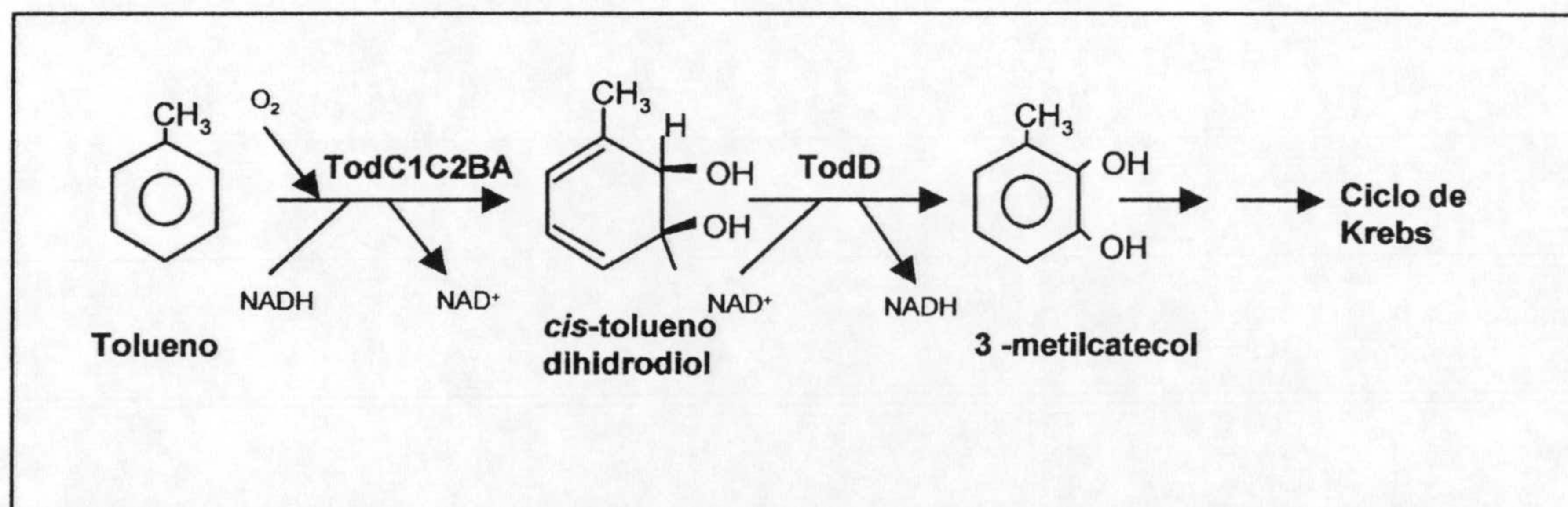


Figura 4. Ruta de degradación de tolueno a través de la ruta TOD.

El gen *todR*, que se transcribe divergentemente con respecto a *todX*, está truncado debido a la presencia de un elemento de inserción. Presenta homología, a nivel regulador, con el dominio de unión a ADN de la familia de reguladores transcripcionales de LysR, pero no es necesario para el metabolismo de tolueno en esta cepa (Lau et al., 1997). El gen *todX* codifica una proteína de membrana que presenta una elevada similitud con la proteína FadL de *E. coli*; ésta es una proteína de membrana externa, implicada en la unión y en el transporte de ácidos grasos de cadena larga (Wang et al., 1995). Aunque, se ha especulado que el producto de *todX* podría facilitar la entrada de tolueno, se sabe que no es necesario para el crecimiento de la cepa en este compuesto.

En 3' respecto al gen *todH*, se ha encontrado un sistema de dos componentes, TodST, cuyos productos génicos activan la expresión de la ruta de degradación de tolueno en *P. putida* F1 (Lau et al., 1997). El gen *todS* codifica una proteína híbrida histidín-quinasa que tiene dos componentes importantes: uno que presenta un dominio en cremallera de leucina en la región amino terminal, y otro que presenta un motivo doble histidín-quinasa. La presencia de este motivo duplicado histidín-quinasa en la proteína, implica el funcionamiento de ésta como un sensor que responde tanto a la presencia de tolueno como a estrés oxidativo, aunque existen otras posibilidades que aún no se han estudiado. Por otro lado, la forma fosforilada de TodT al parecer activa la expresión de los genes estructurales del operón *tod* (Lau et al., 1997).

Aunque todavía no se ha determinado el mecanismo de acción de este sistema, lo que sí está claro es que el sistema formado por los genes *todST* interviene en la regulación de la expresión del operón *tod* y es un sistema similar al descrito en eucariotas (Swanson et al., 1994).

II. IV. III. Ruta de la tolueno-4-monooxigenasa

La cepa *Pseudomonas mendocina* KR1 presenta otra ruta para la degradación de tolueno (Whited y Gibson, 1991a). En esta ruta el tolueno es atacado inicialmente por un sistema enzimático denominado tolueno-4-monooxigenasa, que cataliza la introducción de un átomo de oxígeno en el anillo aromático en posición *para* en una reacción dependiente de NADPH, produciendo *p*-cresol. El siguiente enzima en la cepa KR1, es el denominado *p*-cresol metilhidrolasa que cataliza la conversión de tanto *p*-cresol en alcohol *p*-hidroxibencílico como de éste en *p*-hidroxibenzaldehído. La enzima denominada *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa oxida el *p*-hidroxibenzaldehído a *p*-hidroxibenzoato; éste posteriormente es hidroxilado hasta protocatecuato por la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa, que es una flavoproteína con actividad monooxigenasa. El 3,4-dihidroxibenzoato (protocatecuato) es sustrato de la enzima protocatecuato 3,4-dioxigenasa que produce una ruptura orto en el anillo (Whited y Gibson, 1991b). Esta ruta al igual que la ruta *tod* está codificada en el cromosoma de la bacteria (Wright y Olsen, 1994).

Los genes que codifican la tolueno-4-monooxigenasa se han clonado y secuenciado y son seis péptidos codificados por las enzimas *tmoABDCEF*, los que forman los tres componentes necesarios para la actividad oxigenasa (Yen *et al.*, 1991 y 1992). El producto del gen *tmoF* codifica una ferredoxina con actividad oxido-reductasa, que está relacionada con la actividad tolueno 4-monooxigenasa aunque, parece que no es esencial para la actividad del enzima (Yen *et al.*, 1992)

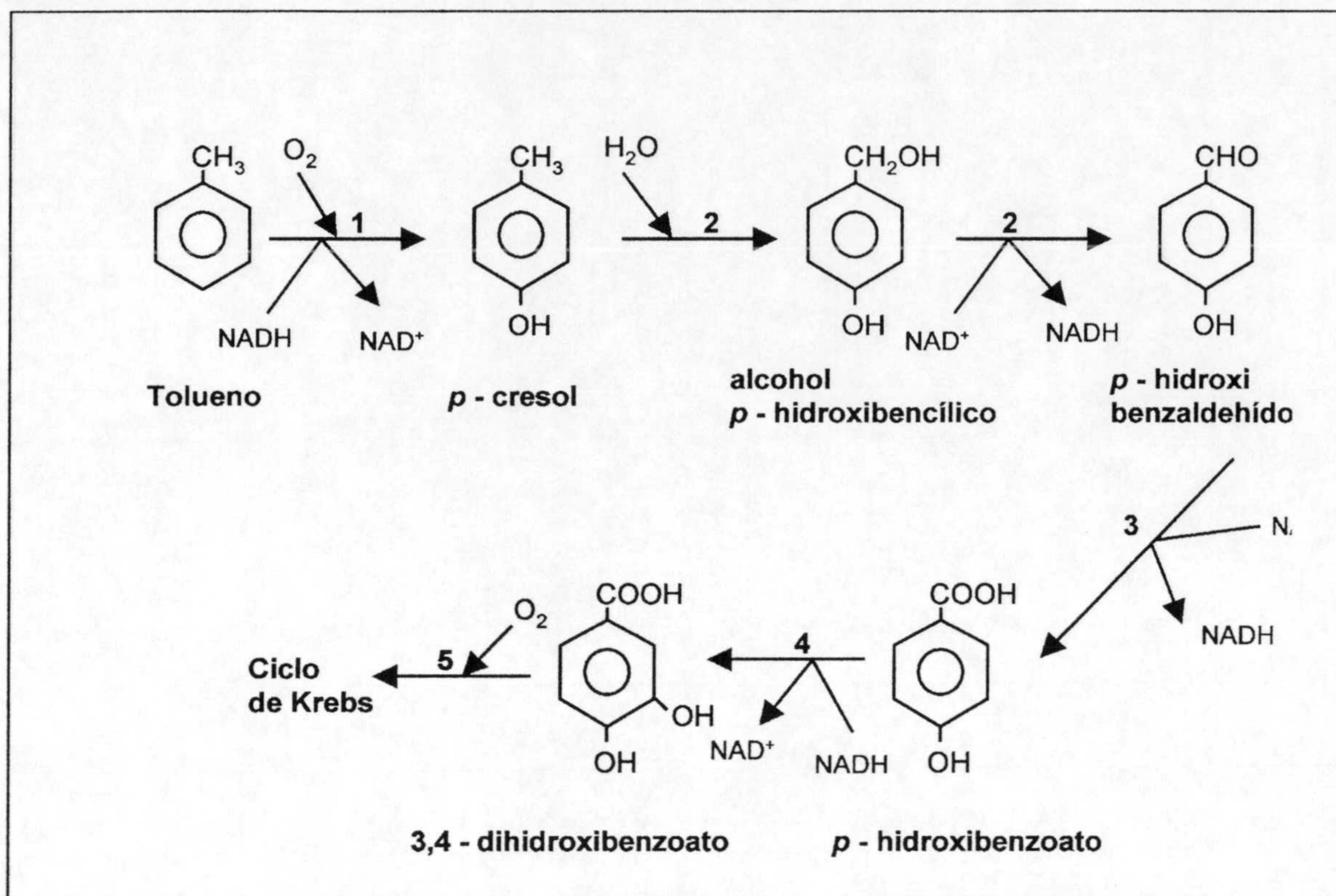


Figura 5. Ruta de degradación de tolueno por *Pseudomonas mendocina* KR1. Los números que aparecen en el esquema corresponden a las enzimas, 1: tolueno monooxigenasa; 2, *p*-cresol metilhidrolasa; 3, *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa; 4, *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa; 5, protocatecuato 3,4-dioxigenasa.

Los genes que codifican las enzimas que catalizan las reacciones enzimáticas de la degradación de tolueno hasta protocatecuato, están ligados genéticamente ya que se pueden movilizar simultáneamente (Whited, 1991). Estos genes parece que están organizados en tres unidades transcripcionales que se regulan de forma independiente: una, con los genes que codifican la tolueno 4-monooxigenasa (*tmoABCDEF*), otra con los que codifica para las enzimas *p*-cresol metilhidrolasa y *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa (*pcuABC*) y otra parte con los que codifica para la enzima *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa

(*pobA*). Parece ser que los genes *pcuABC* están organizados formando un operón donde el gen *pcuC*, que codifica para la *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa, se transcribe primero y su transcripción es seguida de la de los genes que codifican la enzima *p*-cresol metilhidroxilasa; esto asegura que no se acumulen derivados del benzaldehído, que son tóxicos para la célula o incluso, que pueda actuar como quimioatrayentes de otras células bacterianas. Este operón, está regulado por el gen *pcuR* que es un activador de la transcripción de éstos genes y se localiza en 3' respecto al gen *pcuC*. El gen que codifica para la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa (*pobA*) está ligado genéticamente, pero regulado independientemente, de los genes que codifican para la tolueno 4-monooxigenasa, *p*-cresol metilhidrolasa y *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa (Wright y Olsen, 1994).

II. IV. IV. Ruta de la tolueno-3-monooxigenasa

La cepa *Pseudomonas pickettii* PK01 se aisló de microcosmos contaminados con benceno, tolueno y *p*-xileno (Gibson et al., 1988). Esta cepa utilizaba fenol como fuente de carbono y energía. La oxidación del fenol hasta catecol por parte de *P. picketti* PK01 se ha estudiado y se sabe que está catalizada por la enzima fenol hidroxilasa (Kukor y Olsen, 1990). Posteriormente en esta cepa, se describió la existencia de genes que degradaban tolueno y benceno (Kaphammer et al., 1990, Olsen et al., 1994). El sistema enzimático encargado de la hidroxilación del tolueno y del benceno se denomina tolueno 3-monooxigenasa (Olsen et al., 1994). Éste sistema lleva a cabo la hidroxilación de tolueno y benceno hasta *m*-cresol y fenol, respectivamente. Esta actividad enzimática está codificada por los genes *tbuA1* y es un sistema multicomponente similar al descrito anteriormente para la cepa KR1. Tras la formación del *m*-cresol y por acción de la fenol hidroxilasa, codificada por el gen *tbuD*, se produce la segunda

hidroxilación del anillo dando lugar a la formación de 3-metilcatecol que es atacado por la catecol 2,3-dioxigenasa codificada por el gen *tbuE* (Olsen et al., 1994). La enzima tolueno 3-monooxigenasa presenta una gran variedad de sustratos entre los que se encuentra benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-, *m*- y *p*-xileno y estireno y los inductores de esta actividad son el benceno, tolueno, etilbenceno y *m*-cresol.

Con respecto a la organización genética, ésta incluye tres unidades transcripcionales, una que codifica el sistema de la enzima tolueno 3-monooxigenasa y que lleva la información de seis genes denominados *tbuA1UBVA2C* (Byrne et al., 1995), otra que porta la información del gen *tbuD* y que codifica la fenol hidroxilasa (Kukor y Olsen, 1990), y por último, la que porta los genes necesarios para la ruptura del 3-metilcatecol y catecol hasta el correspondiente semialdehído del ácido 2-hidroximucónico; el cual es canalizado hasta intermediarios del ciclo de Krebs, a través de los productos de los genes *tbuJHIKGF* que forman un operón independiente (Olsen et al., 1994, Kukor y Olsen, 1991).

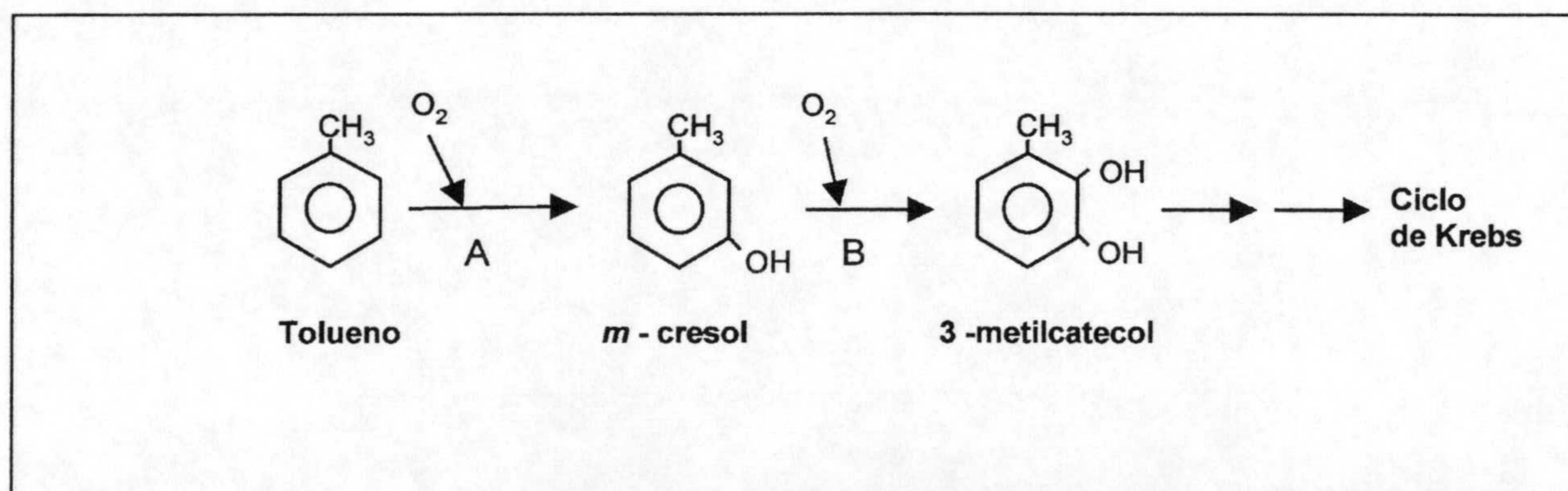


Figura 6. Ruta de degradación de tolueno por la cepa *P. pickettii* PK01. Las enzimas que catalizan las reacciones iniciales son, A: tolueno 3-monooxigenasa, B: fenol hidroxilasa.

Sobre su regulación, se sugiere que la expresión del operón de la tolueno 3-monooxigenasa (*tbuAlUBVA2C*) es activada por el producto del gen *tbuT* en presencia de tolueno. TbuT se ha identificado como miembro de los activadores transcripcionales de la familia de NtrC, aunque es significativamente diferente con respecto al dominio asociado con la especificidad de efectores. Existe una región en 5' respecto al gen *tbuAl* que se ha identificado como el sitio de unión del producto del gen *tbuT* que tras la unión, activa la transcripción del operón (Byrne y Olsen, 1996; Leahy et al., 1997). Por otro lado, se conoce que TbuR y TbuS son también reguladores que interaccionan con efectores tales como fenol y *m*-cresol, pasando a forma activa y promoviendo la transcripción de *tbuD* y *tbuJHIKGFE*, respectivamente. TbuS reprime la transcripción de este último operón en ausencia de efectores (Olsen et al., 1994). Los detalles moleculares de este sistema aun permanecen para ser explorados.

II. IV. V. Ruta de la tolueno 2-monooxigenasa

La cepa *Pseudomonas cepacia* G4 degrada tolueno a través de un sistema enzimático denominado tolueno 2-monooxigenasa (Shields et al., 1989). Éste cataliza en presencia de oxígeno y de NADH, la hidroxilación secuencial del anillo aromático del tolueno en posición *orto* y *meta* para producir 3-metilcatecol. El sistema enzimático ha sido purificado y se ha encontrado que está formado por tres componentes de los que se conoce su estructura y propiedades catalíticas (Newman y Wackett, 1995 y 1997). Aunque no se conoce ni la organización genética ni la regulación, se sabe que la ruta de degradación está codificada en un plásmido denominado TOM (Shields et al., 1995), donde se localizan los genes que codifican las enzimas que catalizan la hidroxilación del tolueno.

Se ha descrito en los últimos años la existencia en una cepa denominada *Pseudomonas sp.* JS150, que degrada tolueno a través de un sistema enzimático denominado tolueno/benceno 2-monooxigenasa; éste cataliza la hidroxilación secuencial de tolueno hasta 3-metilcatecol en posición orto y meta, como la cepa G4 descrita anteriormente. El sistema enzimático parece similar al anterior, ya que presentan el mismo perfil de sustratos y la localización de los genes es plasmídica (Johnson y Olsen, 1995).

La organización genética de la tolueno/benceno 2-monooxigenasa para la cepa JS150, se conoce que está codificada por los genes *tbmABCDEF* que forman un operón (Figura 7). Con respecto a la regulación de éste, se ha descrito la existencia de un regulador denominado TbmR que interacciona positivamente con el promotor PtbmA que se localiza en 5' respecto al gen *tbuA*. Este regulador en presencia de tolueno activa la transcripción desde el promotor PtbmA (Leahy et al., 1997) (Figura 7). Este regulador presenta similitudes con TbuT, descrito anteriormente para la tolueno 3-monooxigenasa. En conclusión, se sabe que la expresión de la tolueno 3- y 2-monooxigenasas, aunque presentan reacciones distintas, está controlada por reguladores similares y con el mismo perfil de sustratos (Leahy et al., 1997).

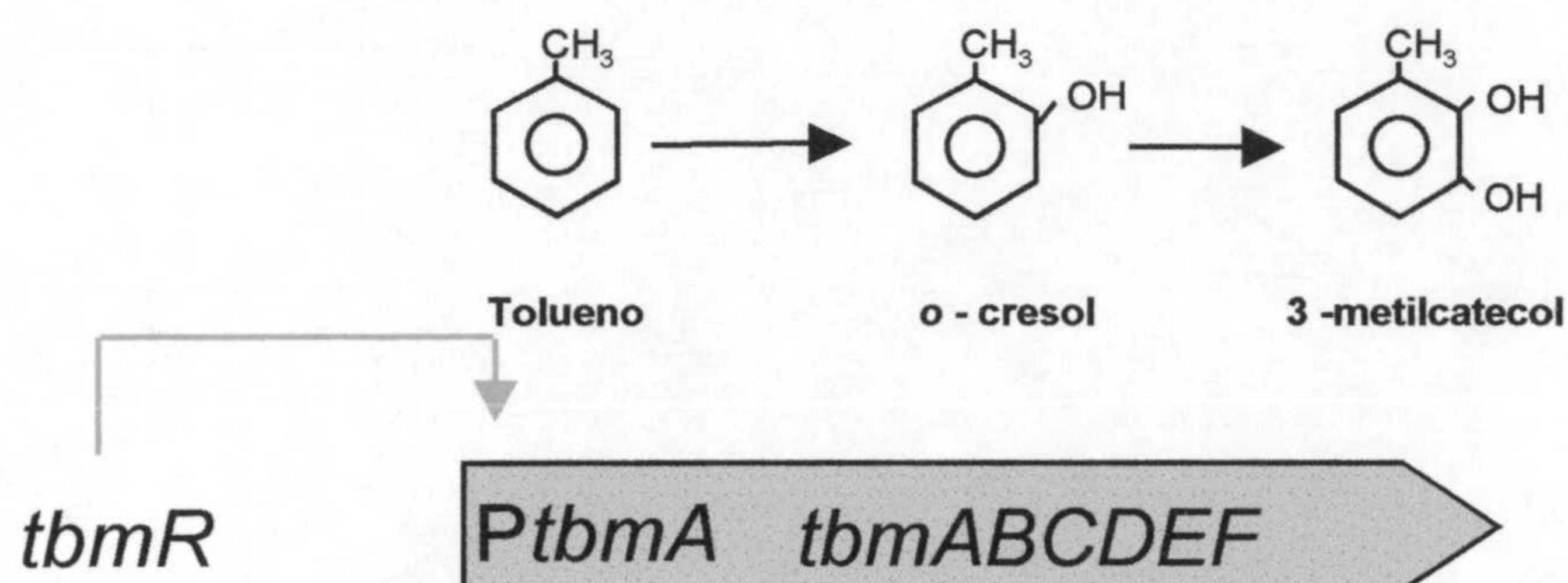


Figura 7. Organización y modelo de regulación de la ruta catalizada por la enzima tolueno 2-monooxigenasa en la cepa *Pseudomonas sp.* JS150.

Se ha descrito que *Pseudomonas sp.* JS150 sintetiza las enzimas necesarias para llevar a cabo rupturas *orto*, *orto-modificada* y *meta* en respuesta al crecimiento en una gran variedad de compuestos aromáticos (Haigler et al., 1992). La cepa presenta al menos tres enzimas tolueno/benceno monooxigenasas para el ataque inicial del tolueno además de la enzima tolueno dioxigenasa (Johnson y Olsen, 1997). Se ha identificado una región que codifica una tolueno dioxigenasa como la de la cepa F1 (Haigler et al., 1992), otra para la enzima tolueno/benceno 2-monooxigenasa (Tb2m) y en esta misma región se ha identificado una actividad tolueno 4-monooxigenasa (Tb4m) que está regulada por el producto del gen *tbmR*; y otra región que sólo presenta genes para la enzima tolueno 4-monooxigenasa que cataliza la monooxigenación del *p*-cresol hasta 4-metilcatecol. La organización y su regulación en estos sistemas permanece aun por determinar.

III.- TOLUENO: TOXICIDAD Y MECANISMOS DE TOLERANCIA

Muchos productos tales como herbicidas o insecticidas están siendo liberados en el medio ambiente para controlar malas hierbas y plagas; otros productos tales como los disolventes orgánicos o combustibles aparecen sobre la biosfera como resultado de accidentes y de la evaporación de estos compuestos de sus tanques de almacenamiento.

Hoy en día se dispone de un amplio conocimiento acerca del posible efecto tóxico y carcinogénico de muchos productos químicos. Aunque la liberación de estos productos perjudiciales para la salud del hombre y animales está restringida por la legislación, un número de contaminantes han aparecido ya sobre la biosfera y necesitan ser eliminados. El uso de tratamientos biológicos para la eliminación de productos tóxicos parece ser prometedora (Ramos *et al.*, 1994). Sin embargo, la toxicidad de algunos productos puede limitar la aplicación de microorganismos en la remoción de éstos. Las principales funciones de la membrana celular de los microorganismos es la de formar una barrera de permeabilidad, regulando el pasaje de solutos entre la célula y el ambiente externo (Nikaido, 1999). Las propiedades de la barrera de la membrana citoplásmica son de importancia especial para la transducción de energía de la célula (Sikkema *et al.*, 1995). Los disolventes orgánicos dañan la membrana celular, por ejemplo; pérdida de iones, metabolitos, lípidos y proteínas, conducen a la disipación del gradiente de pH y la inhibición de las funciones de las proteínas de membrana. Esto es seguido por lisis y muerte celular (de Smet *et al.*, 1978; Sikkema *et al.*, 1995).

El valor del logaritmo del coeficiente de partición de un disolvente en una mezcla de octanol/agua ($\log P_{ow}$) se usa comúnmente como medida de lipofilicidad de un disolvente (Rekker y de Kort, 1979). Los disolventes aromáticos con un $\log P_{ow}$ inferior a 4.0 por ejemplo benceno ($\log P_{ow}$ 2.0), estireno ($\log P_{ow}$ 3.6), xileno ($\log P_{ow}$ 3.2) y tolueno ($\log P_{ow}$ 2.5), se

acumulan en la membrana citoplasmática de la bacteria, causando la desorganización de la misma y la pérdida de las funciones vitales de ésta (Sikkema et al., 1992; 1994). A pesar de ello, se han aislado varias especies de *Pseudomonas* que son capaces de crecer en un medio de cultivo en presencia de altas concentraciones de disolventes tóxicos tales como, tolueno, estireno y *p*-xileno (Inoue y Horikoshi, 1989; Cruden et al., 1992; Weber et al., 1994; Ramos et al., 1995). Recientemente, se ha mostrado que *P. putida* Idaho y *P. putida* DOT-T1 no solo son resistentes al tolueno en un sistema bifásico, sino que pueden usar el tolueno en altas concentraciones como fuente de carbono y energía (Cruden et al., 1992; Ramos et al., 1995).

Respecto a la tolerancia de hidrocarburos aromáticos, se ha sugerido un número de elementos que podrían estar involucrados en la respuesta a estos agentes tóxicos: (i) metabolismo de estos hidrocarburos aromáticos, los cuales podrían ser transformados en compuestos no tóxicos; (ii) rigidificación de la membrana celular mediante la alteración de la composición de fosfolípidos; y (iii) eflujo del compuesto tóxico en un proceso dependiente de energía.

Aunque el metabolismo de los agentes químicos puede ayudar a reducir su toxicidad, las siguientes observaciones sugerían que podrían ser de menor importancia, un número de microorganismos tolerantes a diferentes solventes orgánicos no puede metabolizar el compuesto tóxico, así *Escherichia coli* que es tolerante a un 1% (v/v) de hexano no utiliza este compuesto como fuente de carbono (Aono et al., 1991); por otro lado, algunas cepas de *Pseudomonas* tolerantes a concentraciones supersaturantes de tolueno no usan este compuesto como fuente de carbono (Inoue y Horikoshi, 1989). Dado esto, la rigidificación de la membrana lipídica en respuesta a compuestos tóxicos y eflujo de estos químicos son elementos claves y, aunque su papel en la tolerancia a disolventes no ha sido del todo vislumbrada, a continuación revisaremos las características más críticas que

sugieren que juegan un papel importante en la tolerancia a solventes.

III. I. Alteración en la composición de fosfolípidos posterior a la exposición celular a disolventes orgánicos.

El nivel inicial de peligro causado por muchos disolventes cuando las células bacterianas son expuestas a estos tóxicos es la interacción con la bicapa lipídica (Sikkema *et al.*, 1995). Como consecuencia, la fluidez de la membrana se afecta y la bacteria tiene que responder inmediatamente para disminuir los efectos de los daños y así sobrevivir. Esto se puede conseguir mediante un reajuste en la fluidez de la membrana. Los mecanismos de compensación asemejan algunos de los observados en la respuesta a cambios físicos y químicos impuestos por el ambiente (Russell y Fukunaga, 1990).

III. II. Cambios en la composición de ácidos grasos.

Hay dos mecanismos principales para alterar la composición de ácidos grasos, y así la fluidez de la membrana en las bicapas lipídicas bacterianas: la isomerización *cis/trans* de ácidos grasos como una respuesta a corto plazo; y el de la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados como una respuesta a largo plazo. Además, la proporción de ácidos grasos de cadena corta y cadena larga puede ser también alterada para regular la fluidez de la membrana. La figura 8 muestra que el comportamiento estérico de ácidos grasos *trans* y ácidos grasos saturados es muy similar, ambos poseen una conformación larga permitiendo un empaquetamiento con mayor densidad de la membrana. En contraste, la configuración *cis* de la cadena acíclica tiene un ángulo rígido de 30°, el cual causa un impedimento estérico e impide el empaquetamiento altamente ordenado de los ácidos grasos saturados o sus isómeros *trans*. Los ácidos grasos *cis* tienen una menor temperatura de transición

que los correspondientes isómeros *trans* (Keweloh y Heipieper, 1996).

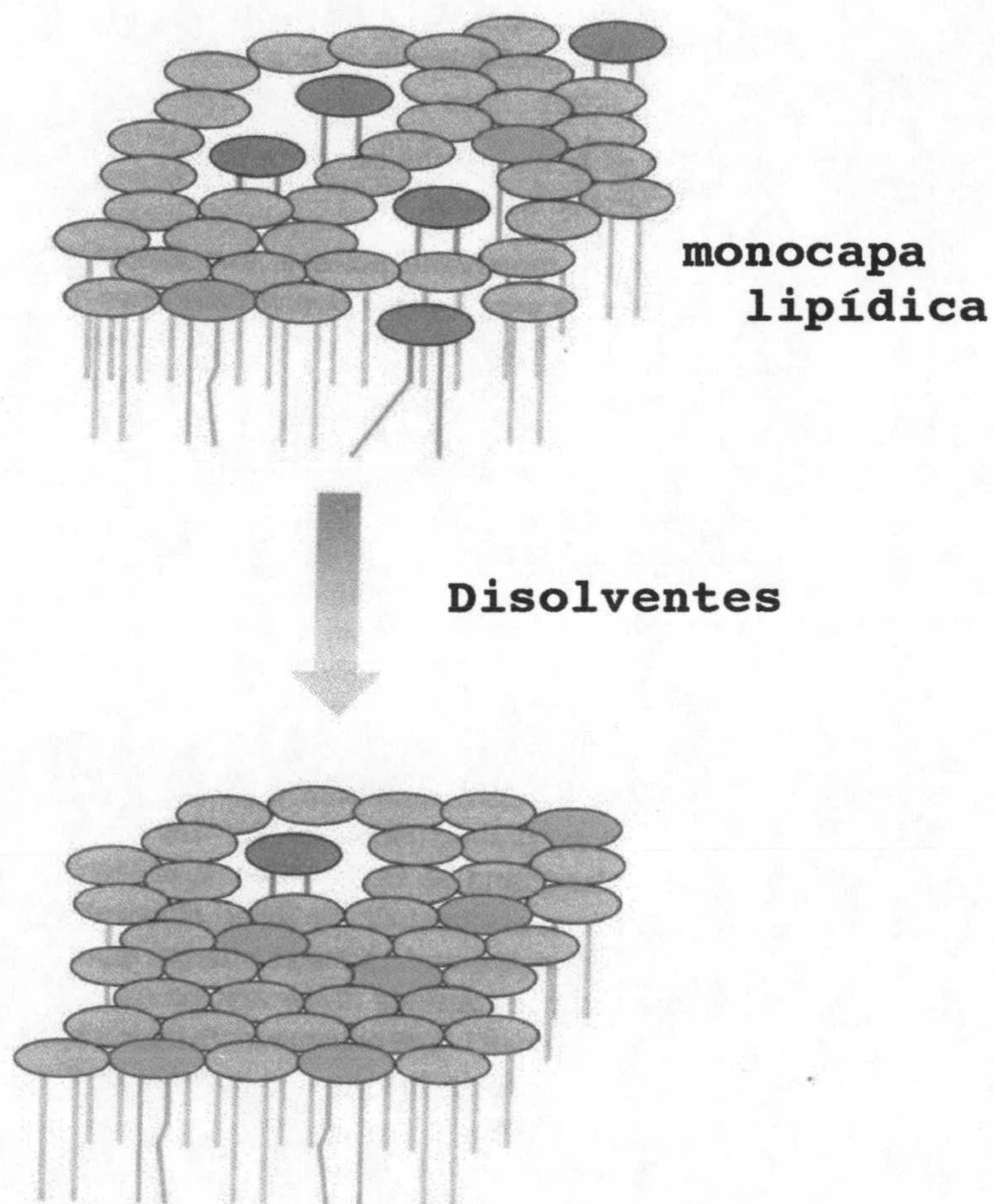


Fig. 8. Efecto de la isomerización *cis*→*trans* en los fosfolípidos de la membrana. La exposición a los solventes dispara la conversión de los ácidos grasos *cis*-insaturados (azules) a *trans*-insaturados (rojos). Los saturados se muestran en amarillo.

III. III. Isomerización *cis* →*trans* de ácidos grasos

Hasta recientemente la configuración de la cadena alquílica *cis* de ácidos grasos esterificados localizados en la membrana se

consideraba como el único isómero presente en ácidos grasos. Sin embargo, se ha descrito en un buen número de microorganismos la presencia de isómeros *trans* en los lípidos celulares, por ejemplo *Pseudomonas*, *Vibrio sp.* y bacterias metilotróficas (revisado por Keweloh y Heipieper, 1996).

En varias cepas de *Pseudomonas putida* se ha descrito que la proporción *cis/trans* de los ácidos grasos se disminuye cuando las células se exponen a disolventes orgánicos tales como fenol, 4-clorofenol, tolueno, xilenos o alcoholes de diferente longitud de cadena (Heipieper *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1995; 1997; Pinkart y White, 1997). Se ha observado que la isomerización *cis*→*trans* de ácidos grasos es una modificación enzimática post-sintética en varias cepas de *Pseudomonas putida* (Diefenbach y Keweloh, 1994). Todas las cepas contienen principalmente ácido oleico (C16:1,9) y ácido *cis*, vacénico (C18:1,11) las cuales pueden ser isomerizados a la forma *trans* sin cambio en la posición del doble enlace de la cadena acílica (Loffeld y Keweloh, 1996). Los disolventes orgánicos incrementan la fluidez de la membrana y un incremento en el contenido de ácidos grasos en *trans* podría contrarrestar la alteración en la fluidez de la membrana. Los genes de las isomerasas *cis*→*trans* de *P. putida* P8, llamada CtiP8 (Holtwick *et al.*, 1997), y *P. putida* DOT-T1, llamada CtiT1 (Junker y Ramos, 1999), han sido clonados y secuenciados; estas proteínas exhiben cerca de un 95% de identidad. La enzima CtiT1 se sintetiza constitutivamente (Junker y Ramos 1999) pero las bases moleculares por la cual la Cti isomerasa parece activa en respuesta a tolueno y otros disolventes orgánicos son todavía desconocidas. Para profundizar en el impacto de la conversión *cis*→*trans* sobre la resistencia a disolventes en *P. putida* DOT-T1, Junker y Ramos, (1999) generaron y caracterizaron una mutante interrumpida en el gen *cti*. La cepa mutante mostraba una fase de latencia mayor en comparación con la cepa parental cuando se transfería a medio mínimo con tolueno suplementado en fase gaseosa como única fuente de carbono y energía. Estos autores también observaron

que la proporción de sobrevivencia de la cepa mutante fue menor que en la cepa silvestre cuando las células se sometieron a un choque de tolueno. Junker y Ramos (1999) concluyeron que la isomerización *cis*→*trans* de ácidos grasos juega un papel en la sobrevivencia de la cepa a tolueno.

El gen de la isomerasa *cis*→*trans* en la cepa de *P. putida* 2440 que es muy sensible a disolventes orgánicos también se secuenció observándose que la secuencia del gen y la región promotora de esta cepa eran casi idénticas a las del gen *ctiT1*. Consecuentemente se concluyó que el carácter de resistencia a disolventes orgánicos de la cepa DOT-T1 no es sólo causada por la *cis*→*trans* isomerasa sino también por otros mecanismos. Estos autores sugieren que la conversión *cis*→*trans* podría ser la de actuar como primera respuesta en una situación de emergencia tal como la que ocurre cuando las células se someten a la presencia de tóxicos, y así disparar los mecanismos que les permitan superar el daño inicial sobre la membrana. De esta manera, las células ganan tiempo para un ajuste metabólico y poner en marcha la respuesta a largo plazo.

III. IV. Regulación de la proporción de ácidos grasos saturados/insaturados.

El incremento en fosfolípidos con ácidos grasos saturados, una respuesta bien conocida a cambios de temperatura (Cronan, 1968; Suutar y Laakso, 1994; Loffeld y Keweloh, 1996), también se ha observado por ejemplo, en *E.coli* en respuesta a la presencia de alcoholes de cadena larga y compuestos aromáticos (Ingram, 1977). Se conoce que los incrementos de temperatura, en los medios de cultivo de *Vibrio* sp, *E. coli* y *P. putida* P8 resultaron en un aumento de la fluidez en la bicapa lipídica, y en respuesta al choque térmico las células respondieron sintetizando ácidos grasos saturados. Asimismo, una disminución en la temperatura de incubación de estas bacterias promovía la síntesis de ácidos grasos insaturados (Cronan, 1968; Hamamoto et

al., 1994; Loffeld y Keweloh, 1996). Esta estrategia que permite regular la fluidez de la membrana depende de la síntesis de novo de ácidos grasos, un proceso que requiere tiempo y no es suficientemente rápido para considerarse una respuesta de corto plazo. En la cepa *P. putida* Idaho se observó que tras 15 minutos de exposición a disolventes tenía lugar un aumento en el contenido de ácidos grasos (Pinkart y White, 1997), Estos resultados sugieren que la alteración de la razón ácidos grasos saturados/insaturados es un mecanismo de adaptación a largo plazo.

III. V. Cambio en los grupos de cabeza de fosfolípidos y la velocidad de su síntesis.

El cambio en los grupos de cabeza de fosfolípidos es un fenómeno menos estudiado y se dispone de pocos datos. La composición de estos quizás también influye en la fluidez de la membrana (Weber y de Bont, 1996).

En presencia de tolueno, los cambios en la composición de los fosfolípidos se estudiaron en un quimiostato en la cepa *P. putida* S-12. Los grupos de cabeza de fosfolípidos con fosfatidiletanolamina (PE) disminuía mientras que aquéllos con difosfatidilglicerol (DPG) así como el fosfatidilglicerol (PG) incrementaban. El DPG tiene una mayor temperatura de transición que la PE (10° C mayor), lo cual disminuye la fluidez de la membrana, produciendo un efecto estabilizante (Weber Y de Bont, 1996). Resultados similares fueron obtenidos con la cepa *P. putida* DOT-T1 (Ramos et al., 1997).

En la cepa *P. putida* Idaho (Pinkart y White, 1997), la cantidad total de ácidos grasos de la membrana incrementó cuando las células se expusieron a *o*-xileno. Un análisis detallado de la biosíntesis de los grupos cabeza de los fosfolípidos reveló que en presencia de *o*-xileno en la cepa Idaho el nivel de PE aumentaba y el nivel de PG. PE tiene un punto de fusión mayor

que el de PG y así, su incremento en el primero tiende a estabilizar la membrana celular. Así, diferentes cepas de *Pseudomonas* sp. parecen haber desarrollado diferentes estrategias para el cambio en la composición de las cabezas de fosfolípidos y así incrementar la rigidez de la membrana y de este modo, superar los efectos los daños causados por los disolventes orgánicos.

III. VI. Alteraciones en otros componentes de membrana en respuesta a disolventes orgánicos.

Se han observado cambios en las proteínas de membrana externa y lipopolisacáridos (LPS) después de la exposición de las células a disolventes (Pinkart *et al.*, 1996; Weber y de Bont, 1996). Las moléculas de LPS constan de una cadena de polisacárido y varios ácidos grasos saturados y conceden a la membrana baja permeabilidad a los compuestos hidrofóbicos. La estructura de LPS de la cepa *P. putida* Idaho se alteró en respuesta a la exposición a xileno (Pinkart *et al.*, 1996). Sin embargo, no existen evidencias concluyentes que apoyen o no que el LPS de la membrana externa juega un papel en la resistencia a disolventes.

Se observó que cuando las bacterias del género *Pseudomonas* se cultivaron en presencia de cationes divalentes (por ejemplo magnesio y calcio) aumentaba la supervivencia de éstas cuando las células se sometían a un choque con disolventes orgánicos (Inoue *et al.*, 1991; Ramos *et al.*, 1995; Weber y de Bont, 1996). Es probable que los cationes divalentes unidos electrostáticamente a las moléculas polianiónicas LPS redujeran la repulsión de las cargas lo cual permitiría un empaquetamiento más denso de las moléculas de LPS y la membrana y sería más hidrofóbica limitando el acceso de disolventes a la membrana.

Recientemente Junker *et al.*, (2000) han obtenido un mutante en el gen *wbpL* que codifica el primer enzima en la síntesis del antígeno O del LPS. El mutante era tan resistente a tolueno como

la cepa silvestre, lo cual parece excluir a las LPS como elementos de defensa contra tolueno.

III. VII. Bombas de eflujo y extrusión de disolventes.

A través de la evolución, las bacterias han sido expuestas a diferentes compuestos tóxicos tales como toxinas naturales, productos metabólicos endógenos, antibióticos, etc. Para protegerse a sí mismos, los microorganismos han desarrollado recursos que detoxifican y extruyen esas sustancias. Este fenómeno frecuentemente conduce a la aparición de una resistencia múltiple a drogas. Uno de los sistemas de resistencia múltiple a drogas (**MultiDrugs Resistance**) es el de eflujo unidireccional que cataliza la extrusión activa de un gran número de compuestos no relacionados estructural y funcionalmente del citoplasma de la bacteria (o membrana interna) al medio externo.

Algunos de los sustratos de estas bombas MDR son xenobióticos, los cuales no están estrictamente relacionados con los sustratos naturales específicos que estas células bombean al medio externo y que parecen haber adquirido durante la evolución. Los datos disponibles para ello indican que las características químicas de los compuestos (carga, hidrofobicidad o anfipaticidad), más bien que sus estructuras, podrían ser el factor determinante en las especificidades de estos sistemas de eflujo de múltiples drogas (Paulsen *et al.*, 1996; Bolhuis *et al.*, 1997). Se ha propuesto que las bombas MDR son la mayor causa de la resistencia múltiple a antibióticos en bacterias (Levy, 1992), aunque la función usual y la evolución de estas bombas MDR es todavía un enigma.

Hay cuatro familias de transportadores MDR identificados en las bacterias: (i) la superfamilia de "facilitadores mayores" (MFS); (ii) las bombas de pequeño tamaño que confieren resistencia a múltiples drogas; (iii) la de cassette de unión a ATP y (iv) la familia de bombas RND. Las bombas de eflujo para

disolventes orgánicos identificadas en las bacteria gram-negativas pertenecen a esta última familia. Los sistemas de eflujo para drogas múltiples se han revisado anteriormente (Pulsen et al., 1996; Bolhuis et al., 1997; Lewis et al., 1997).

Las bombas RND de bacterias gram-negativas son transportadores complejos que exportan sustancias tóxicas a través de las dos membranas de la envoltura celular en un paso único acoplado a energía. El proceso requiere un sistema de exportación incorporado en la membrana citoplásmica que actúa como una bomba de extrusión dependiente de energía, una proteína de fusión a membrana (MFP) y una proteína de membrana externa (OMF).

La bomba dependiente de energía contiene frecuentemente α -hélices transmembranales y dos grandes dominios proyectados en el periplasma. Las MFPs forman la "unión" entre el transportador localizado en la membrana y el OMF. Las MFPs están ancladas a la membrana citoplásmica y posiblemente interactúan con el transportador de la membrana a través de una parte menos hidrofóbica. La región C-terminal de las MFPs está bien conservada en estas proteínas y se predice que son ricas en hojas plegadas β , lo cual sugiere que pueden insertar en la membrana externa e interactuar con la OMF. Las OMFs son uniformes en tamaño de (398 - 495 residuos) y constan de 16 cadenas β (Paulsen et al., 1997).

III. VIII. Tolerancia a disolventes en *E. coli*: ¿Existen una o más bombas involucradas en este proceso?.

Clones de *E. coli* JA300 que adquirieron resistencia a cloramfenicol y ampicilina adquirieron concomitantemente tolerancia a disolventes orgánicos tales como ciclohexano, *n*-pentano o *p*-xileno. Los resultados de Aono y colaboradores (1995) indicaban que algunos determinantes de la resistencia a múltiples antibióticos estaban implicados en tolerancia a disolventes orgánicos. Este fue el primer artículo en que se

estableció una conexión entre tolerancia a disolventes orgánicos y resistencia a antibióticos (Aono et al., 1995).

El sistema más importante en *E. coli* considerando el eflujo de disolventes orgánicos es probablemente el sistema AcrAB-TolC, en el cual la proteína TolC es probablemente la OMP (Aono et al., 1998; Fralick, 1996), siendo AcrA la MFP y AcrB, una translocasa de la familia RND de transportadores (Ma et al., 1993). Se ha observado que el nivel transcripción de los genes *acrAB* era alto en varias mutantes tolerantes a disolventes orgánicos. Algunas de las mutaciones fueron mapeadas en el gen *marR* (Asako et al., 1997). Este gen forma parte del operon *marRAB*, el cual es autorregulado negativamente por la proteína MarR que se une a la región promotora del *marRAB* *in vitro* (Aleksun y Levy, 1997). La proteína MarA es un regulador positivo que induce una serie de genes (*mar* y *soxRS*) y que provee en células de *E. coli* con resistencia a un gran número de antibióticos y reactivos productores de superóxido. Se ha demostrado que la sustitución de una serina por una arginina a la posición 73 en la región codificante de *marRS* era responsable del fenotipo de resistencia de disolventes orgánicos (Nakajima et al., 1995a; Asako et al., 1997). Es probable que el mutante en la proteína MarR fuese incapaz de reprimir el operon *mar*. De este modo, la proteína MarA se sintetizaba y provocaba la respuesta de resistencia a múltiples antibióticos y disolventes orgánicos.

Los productos de los genes *soxS* y *robA* pueden reemplazar a MarA en las respuestas anteriores. La clonación de *soxS* y *robA* en plásmidos de alto número de copias incrementó la tolerancia a disolventes orgánicos en *E. coli* (Nakajima et al., 1995). La sobreexpresión del gen silvestre *marR* disminuía los niveles de tolerancia de cepas *E. coli*. Las características de crecimiento indicaban que funciones opuestas de productos de los genes *marA*, *soxS* y *robA* y el del gen *marR* en la susceptibilidad de *E. coli* a disolventes orgánicos. La delección de los genes *acrAB* confería mayor susceptibilidad a antibióticos y disolventes orgánicos en

las cepa silvestre o las cepas Mar. Por lo tanto, el fenotipo Mar está relacionado con la sobreexpresión del locus *acrAB* y el sistema *AcrAB* parece ser la principal bomba responsable de la resistencia del mutante a disolventes orgánicos y antibióticos (Okusu *et al.*, 1996; White *et al.*, 1997).

III. IX. Identificación de bombas de eflujo de disolventes en cepas de *Pseudomonas*

Experimentos llevados a cabo con la cepa tolerante a tolueno *P. putida* S12 y DOT-T1 indicaron que la cantidad de [¹⁴C]-tolueno y [¹⁴C-1,2,4]-triclorobenceno que se acumulaba en las membranas de las células cultivadas en presencia de tolueno (adaptadas) era de 2 a 5 veces menor que en las bacterias que no habían sido adaptadas. Cuando se adicionaba el inhibidor de la cadena respiratoria cianuro potásico o *m*-clorofenihidrazona carbonil cianuro (CCCP) las células acumulaban significativamente mayores cantidades de los hidrocarburos aromáticos en las membranas. Estos resultados apoyaban la hipótesis de que, en cepas de *Pseudomonas* sp. operaba un sistema de exclusión dependiente de energía que puede reducir el nivel de solventes en la membrana (Isken y de Bont, 1996; Ramos *et al.*, 1997; 1998).

La evidencia final para la implicación de un sistema de eflujo para disolventes orgánicos en ambas cepas de *P. putida* fue la identificación y caracterización molecular de dos bombas distintas de eflujo implicadas en la tolerancia a disolventes (Kieboom *et al.*, 1998a; Ramos *et al.*, 1998). En ambos casos, la generación de mutantes sensibles a tolueno por medio de un transposón sirvió como base para la clonación de los sistemas de eflujo. Las secuencias de aminoácidos deducidas para las proteínas codificadas por los genes *srp* de *P. putida* S12 y *ttg* de *P. putida* DOT-T1 tenían una alta similitud con el sistema de eflujo de antibióticos MexAB-OprM de *P. aeruginosa*. Los genes *srpA* y *ttgA* codifican proteínas periplásmicas que actúan como

nexo de unión entre el transportador de la membrana interna (codificado por *srpB* y *ttgB*) y la proteína de membrana externa codificada por *srpC* y *ttgC*. En *P. putida* GM73, una bomba similar a la Srp se ha descrito recientemente (Kim et al., 1998). Los genes *srpABC* de *P. putida* S12 se pueden transferir a cepas de *P. putida* sensibles a tolueno y estas adquieren resistencia al disolvente. El fenotipo de esta resistencia es independiente del nivel de expresión de los genes *srpABC* (Kieboom et al., 1988b). Una evidencia directa implicando los genes *ttg* en la extrusión de disolventes orgánicos fue obtenida por el hecho de que la cepa sensible a tolueno *P. putida* DOT-T1E-18 (mutante *ttgB*) era incapaz de extruir triclorobenceno de la membrana celular, cuando era precultivada en ausencia de disolventes orgánicos. Sin embargo, el sistema de exclusión funcionaba eficientemente en el mutante *P. putida* DOT-T1E-18 cuando las células eran precultivadas en LB con tolueno en fase gaseosa, sugiriendo la existencia de una bomba o más bombas inducibles y que estarían implicadas en la tolerancia a tolueno (Ramos et al., 1998).

Los tres sistemas de eflujo multidroga descritos en *P. aeruginosa* (MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN) son capaces de proveer algún nivel de tolerancia a solventes orgánicos tales como *n*-hexano y *p*-xileno; el sistema MexAB-OprM parece ser el más importante (Li et al., 1998), ello se dedujo del hecho que cepas de *P. aeruginosa* que expresaban altos niveles de la bomba MexAB-OprM, eran tolerantes a *n*-hexano y *p*-xileno, mientras que las cepas en las cuales estos genes se habían delecionado o inactivado eran sensibles a estos hidrocarburos aromáticos. Los datos sugerían que los sistemas de eflujo múltiple de drogas de *P. aeruginosa* pueden translocar disolventes orgánicos así como antibióticos.

Se entiende entonces que el eflujo de disolventes orgánicos mediado por un sistema de transporte perteneciente a la familia RND es uno de los principales mecanismos que confiere resistencia a disolventes orgánicos en varias cepas de *E. coli* y cepas del género *Pseudomonas*.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos que se plantearon en este trabajo han sido:

- a) Determinación de la ruta de degradación de tolueno de *Pseudomonas putida* DOT-T1E.
- b) Búsqueda de factores implicados en la tolerancia a tolueno.

Estos objetivos se abordarán mediante la generación de mutantes los cuales sean incapaces de crecer en tolueno como fuente de carbono en el caso de la determinación de los genes de la ruta. Y en un medio con otra fuente de carbono en presencia del disolvente en fase gaseosa para investigar genes implicados en la resistencia a tolueno.

**MATERIALES
Y METODOS**

MATERIALES Y METODOS

CEPAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en las tablas 1 y 2.

TABLA 1. Cepas utilizadas en este estudio.

| Cepa | Genotipo o Fenotipo | Referencia |
|------------------------------|--|-----------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| DH5 α F' | <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> (<i>r_km_k</i> ⁺) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> (Nal ^R) <i>thi-1</i> <i>relA1</i> | Hanahan, 1983 |
| CC118 λ pir | Δ (<i>araleu</i>) <i>araD</i> <i>lacX74</i> <i>galE</i> <i>galK</i> <i>phoA20</i> <i>thi-1</i> <i>rpsE</i> (Sp ^R) <i>rpoB</i> (Rif ^R) <i>argE</i> <i>recA1</i> | Herrero et al., 1990. |
| <i>Pseudomonas</i> | | |
| <i>P. putida</i> DOT-T1E | Ap ^R , Cm ^R , Tol ⁺ , Tol ^R , Rif ^R | Ramos et al., 1995 |
| <i>P. putida</i> DOT-T1-18 | <i>ttgB::km</i> | Ramos et al., 1998 |
| <i>P. putida</i> DOT-T1-G7 | <i>todH::km</i> | este estudio |
| <i>P. putida</i> DOT-T1-C5A5 | <i>todC1::kilTelAB</i> | este estudio |
| <i>P. putida</i> DOT-T1-m6 | <i>ttgD::kilTelAB</i> | este estudio |
| <i>P. putida</i> DOT-T1-82 | <i>ttgB::km</i> , <i>ttgD::kilTelAB</i> | este estudio |
| <i>P. putida</i> DOT-T1-11K | <i>ttgS::km</i> | este estudio |
| <i>P. putida</i> F1 | Tol ⁺ | Gibson et al., 1968 |
| <i>P. putida</i> MTB6 | Ap ^R , Rif ^R , Tol ⁺ | Huertas, 1999 |
| <i>P. putida</i> SMO116 | Ap ^R , Cm ^R , Tol ⁺ | Mollen et al., 1996 |
| <i>P. putida</i> 2440 | Rif ^R | Franklin, 1981 |
| <i>P. aeruginosa</i> PAO1162 | Km ^R | Colección EEZ |
| <i>P. mendocina</i> KR1 | Cm ^R , Tol ⁺ | Whited y Gibson, 1991 |

TABLA 2. Plásmidos utilizados en este estudio.

| Plásmido | Características relevantes | Referencia |
|-------------------|---|-----------------------------|
| pUC18/19 | Ap ^R , oriColE1, rop ⁻ , α -complementación | Yanisch-Perron et al., 1985 |
| pRK600 | Cm ^R , mob ⁺ , tra ⁺ , rep ColE1 | Herrero et al., 1990 |
| pGS9 | Cm ^R , km ^R , mob ⁺ , tra ⁺ , Tn5, repP15 | Selvaraj e Yyer, 1983 |
| pKNG101 | Sm ^R , oriR6K, oriTRK2, sacB | Kaniga et al., 1991 |
| pGEM-T | Ap ^R | Promega, Co. |
| pBluescript (SK+) | Ap ^R | Stratagene, Co. |
| pUT-Tel | Ap ^R , Tel ^R | Sánchez-Romero, 1997 |
| pHP45 Ω Km | Ap ^R Km ^R | Fellay et al., 1987 |
| pBBR1MCS-5 | Gm ^R , oriTRK2, α -complementación | Kovach et al., 1995 |
| pBBR21 | Gm ^R , delección 1 promotor <i>todS</i> | este trabajo |
| pBBR22 | Gm ^R , delección 2 promotor <i>todS</i> | este trabajo |
| pBBR23 | Gm ^R , delección 3 promotor <i>todS</i> | este trabajo |
| pBBR24 | Gm ^R , delección 4 promotor <i>todS</i> | este trabajo |
| pBBR25 | Gm ^R , delección 5 promotor <i>todS</i> | este trabajo |
| pGM1 | Ap ^R , Km ^R , <i>todH::Tn5</i> | este trabajo |
| pT1-125 | Ap ^R , <i>todC1-ttgF</i> | este trabajo |
| pT1-155 | Ap ^R , <i>todST</i> | este trabajo |
| pT1-B6 | Ap ^R , <i>ttgS-ttgF</i> | este trabajo |
| pT1-B66 | pT1-B6:: <i>kilTelAB</i> | este trabajo |
| pT1-4R | Ap ^R , <i>cmt-todXF</i> | este trabajo |
| pT1-11S | Ap ^R , <i>ttgS</i> | este trabajo |
| pT1-11SK | pT1-11S:: <i>Km</i> | este trabajo |

MEDIOS DE CULTIVO

El medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989) fue utilizado como un medio común para cultivos de *E. coli* y *Pseudomonas*. 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 10 mM de benzoato sódico, succinato (10 mM) ó 3,4-dihidroxibenzoato (10 mM) como única fuente de carbono. En los casos en los que el tolueno se utilizaba como fuente de carbono, este se suministraba en fase gaseosa (varilla de vidrio) en matraces de 100 ml.

Para la preparación de los medios sólidos se añadió bacto-agar (Difco) a una concentración final de 1,5% (p/v).

Los medios se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos a 120°C de temperatura y 5 atmósferas de presión.

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

Los antibióticos se prepararon en H₂O destilada (H₂O_d) concentrados 1000 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;

estreptomycin, 10; kanamicina, 30; neomicina, 30; piperacilina, 100; rifampicina, 30; tetraciclina, 30; y vancomicina, 30; 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal), 2% en dimetilformamida (p/v) e Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), 100 mM, ambos obtenidos de la casa Boehringer.

AISLAMIENTO DE ADN TOTAL

Se utilizó el método descrito por Ausubel *et al.* (1991) partiendo de 1.5-3 ml de cultivos bacterianos. Tras recoger las células por centrifugación y lavarlas con TE (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA, 1 mM), estas fueron resuspendidas en 567 μ l de la misma solución añadiendo luego 30 μ l de SDS 10 % y 3 μ l de proteinasa K (20 mg/ml), mezcladas e incubadas 1 h a 37°C. Luego fueron adicionados 100 μ l de NaCl 5M agitando vigorosamente y 80 μ l de CTAB/NaCl (bromuro de hexadeciltrimetil-amonio 10% (p/v) en cloruro de sodio 0,7 M). La mezcla se incubó 10 min a 65°C. Posteriormente se hicieron extracciones con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) hasta que no se formaba interfase y a la fase acuosa se añadieron 0,6 vol de isopropanol con lo cual se precipitaba el ADN. Posteriormente se hicieron lavados con etanol 70% (v/v) y luego de secarlo el ADN fue resuspendido en agua miliQ esteril y se cuantificó.

AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

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). Cuando cantidades mayores y de mayor calidad eran necesarias, los plásmidos se purificaron mediante gradientes de cloruro de cesio. Esta preparación partió de 100 ml de cultivos y se siguió el protocolo descrito por Sambrook et al. (1989).

PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES

Para la transferencia de plásmidos a células de *E. coli*, se prepararon células competentes de las cepas DH5 α F' y CC118 λ pir por el método descrito por Inoue et al. (1990).

En algunos casos se prepararon células competentes para electroporación de la siguiente manera: Un matraz de 500 ml con 100 ml de LB sin antibiótico se inoculó con 1 ml de un preinóculo de la bacteria de interés en fase estacionaria. Este nuevo cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm y hasta que la turbidez a 660 nm fue de 0.45 y entonces el cultivo se enfrió en hielo rápidamente y se mantuvo a esa temperatura hasta el final del proceso. El cultivo se centrifugó en una centrífuga Sorvall RC5C en botellas de 250 ml (rotor GSA) a 4500 rpm durante 6 min. El sedimento de células se lavó con 100 ml de agua milliQ estéril y se mantuvo en hielo, de nuevo se centrifugó. El proceso se repitió una vez más. Un tercer lavado se hizo con glicerol 12% (v/v) y luego de separar las células por centrifugación, éstas se resuspendieron en 1 ml de la misma solución y distribuídas en alícuotas de 50 μ l en tubos de 1.5 ml enfriados previamente en hielo y posteriormente transferidos a nitrógeno líquido.

Para la transformación se siguió el método de choque térmico descrito por Hanahan (1983) para el primer tipo de células competentes y electroporación con una diferencia de potencial de 1800 voltios, para el segundo caso.

CONSTRUCCION DE UN BANCO GENOMICO DE *Pseudomonas putida* DOT-T1

ADN de esta bacteria aislado por el método descrito anteriormente, fue parcialmente digerido con la enzima *Sau3AI* y los fragmentos fueron separados por medio de un gradiente de sacarosa (10-40% p/v) durante 20 h a 24000 rpm en un rotor Sorvall 28 Ti. Se recogieron alícuotas de 0,5 ml y se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% y tras ser teñidos en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml) y visualizados sobre una lámpara de luz ultravioleta. Las fracciones que contenían fragmentos mayores de 8 Kb se seleccionaron y dialisaron a través de una membrana Millipore (VSWP 02500). El ADN se concentró para posteriormente ligarse al vector pUC19 digerido con *BamHI* y desfosforilado con fosfatasa alcalina de ternera.

Luego de transformar en la cepa *E. coli* DH5αF' se obtuvieron más de 3000 colonias blancas seleccionadas en placas de LB sólido con ampicilina, X-Gal e IPTG en las concentraciones indicadas en la sección de Medios de Cultivo y Soluciones.

Para verificar la presencia de plásmidos y su tamaño, se realizaron 10-20 minipreparaciones de ADN por el método antes descrito y una fracción de cada una de éstas fue digerido con *EcoRI* o alguna otra enzima.

TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS POR CONJUGACION

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.

OTRAS TECNICAS BASICAS CON ADN

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 la enzima *HindIII* y escaleras de 1 kb y 100 pb (Boehringer GmbH).

Purificación de fragmentos de ADN de 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.

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 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ y la ADN polimerasa del fago T7. La secuenciación automática la realizó el servicio de secuenciación del Instituto de

Parasitología y Biomedicina López Neyra del CSIC en Granada, en el CIDI de la Universidad Autónoma de Madrid y en nuestro grupo 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 los mismos servicios.

REACCIONES DE AMPLIFICACION EN CADENA (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/ μ l para el ADN cromosómico o 10 pg/ μ l para el ADN plasmídico), cebadores (0,5 μ M cada uno), tampón de reacción (KCl, 50 mM; MgCl₂, 1,5 mM; Tris-HCl, 10 mM pH 9,0), dNTPs (100 μ M cada uno) y ADN polimerasa *Taq* (Pharmacia Biotech, ref. 27-0799-02) (0,025 U/ μ l). Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 min, se realizaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 30 seg a 94°C; 30 seg a 60°C y 1 min a 72°C, finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 min. La temperatura de hibridación se varió en función los cebadores utilizados y en algunos casos dependiendo de la longitud del producto amplificado, el tiempo en la extensión era de hasta 2,5 min. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria se combinaron distintas condiciones como cambiar la concentración de MgCl₂ (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.

Transferencia de ADN a membrana e hibridación

El ADN previamente digerido y separado en gel de agarosa, se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim, ref. 1417240) siguiendo el protocolo de transferencia 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.

MUTAGENESIS

Mutagénesis por transposición

Los transposones utilizados en el proceso de mutagénesis se introdujeron en *P. putida* por conjugación "tripartita" como se indicó anteriormente usando la cepa *E. coli* CC118 λ pir portando el plásmido con el gen interrumpido 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 no siendo el resultado de un verdadero hecho de transposición.

MUTANTES OBTENIDAS POR INTERCAMBIO ALÉLICO

Para la construcción de mutantes de *P. putida* por recombinación homóloga se utilizó el plásmido pKNG101, en el cual se clonó el gen a mutar interrumpido por un gen marcador (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 estreptomycin, surgidos como consecuencia de la integración del vector en el cromosoma del huésped por recombinación homóloga a través de las secuencias que flanquean al marcador. Se comprobó que estas cepas (denominadas merodiploides o cointegrados) poseían el fenotipo que les confería el marcador introducido (tel^R o km^R). De esta forma, se descartaron posibles mutantes espontáneos resistentes a estreptomycin. Los merodiploides que aparecieron fueron de dos tipos: aquéllos en los que el hecho de recombinación se había producido antes del marcador y aquéllos en los que se había producido después del mismo. Las cepas merodiploides no deberían crecer en medio LB suplementado con estreptomycin (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 alcanzar dicho fin. Esta cuestión fue crítica a la hora de 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 del número de células totales) y en LB con sacarosa (en las condiciones optimizadas). Finalmente, la pérdida de las secuencias del vector y del gen silvestre se confirmó mediante PCR e hibridaciones de ADN.

SOBREVIVENCIA DE CULTIVOS BACTERIANOS A CHOQUES DE TOLUENO

Para estos experimentos se emplearon cultivos líquidos de LB incubados toda la noche en presencia o ausencia del disolvente en fase gaseosa (varilla), luego un medio fresco fue inoculado con estas células para alcanzar una turbidez final de 0.05 y se incubó a 30°C hasta una A_{660} de 0.7. Entonces se adicionó tolueno para alcanzar en el medio (0.3%) (vol/vol), y la sobrevivencia de las células se midió a tiempos cortos de 10, 30 ó 50 min tomando alícuotas de 0,1 ml de las cuales se hacían diluciones seriadas. De éstas, una gota (30 μ l) era inoculada sobre una placa de LB la que se incubaba por 16-24 h a 30° C para cuantificar las unidades formadoras de colonias resistentes al choque.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ARN

Para experimentos de "extensión de iniciador" y RT-PCR, se purificó ARN de la cepas *Pseudomonas putida* DOT-T1 y de algunas mutantes derivadas de ésta

Las cepas se cultivaron toda la noche en medio mínimo con succinato (15 mM). Por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min se eliminó el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en medio mínimo fresco (30 ml) hasta una turbidez a 660 nm de 0.4 e incubados en matraces de 100 ml a 30°C y 200 rpm hasta que la turbidez fuera de 0.8. En ese momento cada inductor era suministrado en varilla en el caso de los más volátiles y en fase líquida o solución los otros. La incubación se llevó a cabo durante 90 min. Posteriormente alícuotas de 6 ml se recogían en tubos y rápidamente se sumergían en nitrógeno líquido y se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min a 4° C en centrífuga de mesa (Beckman modelo GPR). Las células se guardaron a -80°C o se procesaron en el momento.

Para este proceso se siguió el método descrito por Marqués *et al.* (1993). Las muestras fueron tratadas con DNAsa I libre de RNAsa e inhibidor de RNAsa para asegurar la eliminación completa del ADN y la integridad del RNA.

Finalmente las muestras de ARN fueron verificadas en gel de agarosa-TAE 0.8% (p/v) y en el espectrofotómetro en cubetas de cuarzo con 0,3 ml de la muestra (dilución 1:300).

Para la realización de experimentos de "extensión de cebador" se emplearon 30 μg de cada muestra y se ajustó el volumen a 7,5 μl a los cuales se adicionaron 2,2 μl de tampón MG y 2 μl del oligo marcado con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Para el marcado del oligo se utilizaron 10 pmoles de éste, 30 μCi del isótopo con 5 U de T4 polinucleótido quinasa en un volumen de 10 μl e incubado 1 h a 37° C. Posteriormente a la mezcla de reacción se adicionaron 20 μl de agua y 30 μl de una mezcla fenol/cloroformo y centrifugó 5 min a 12000 rpm. La separación del oligo marcado se hizo a través de una columna con Sephadex G-25 (Sigma) preparada en el momento por medio de centrifugación (2000 rpm durante 2 min) en un tubo eppendorf. De la fracción eluída se verificó con una alícuota de 0.5 μl la actividad del mismo en un contador de centelleo (Packard mod 1 500 Tri-Carb). Alrededor de 100000 cpm del oligonucleótido marcado fueron utilizadas para hibridar las muestras de ARN. La extensión se llevó a cabo utilizando transcriptasa reversa de virus de mieloblastosis de ave (AMVRT). Los ADNc sintetizados se precipitaron con acetato sódico y etanol. Posteriormente se centrifugaron y lavaron con etanol 70% (v/v) una vez, se secaron y resuspendieron en TE y tampón de carga.

La separación de estos DNAc se llevó a cabo en geles de poliacrilamida-urea utilizando 1500 V y manteniendo el gel a 50°C. Estos geles eran posteriormente secados al vacío y expuestos a una película para Rayos-X.

RT-PCR

Con las muestras de ARN libres de ADN se llevaron a cabo reacciones de amplificación utilizando el kit One Tube RT-PCR system (Boehringer) utilizando los oligonucleótidos adecuados para cada caso. Se incluyeron controles positivos y negativos

en cada experimento. Las condiciones generales fueron: 50°, 30 min; 94°, 2 min y luego 30 ciclos de: 94°, 30 seg; 60°, 30 seg y 68° 1 min y 4° C por un tiempo indefinido. Los productos de RT-PCR se separaron en geles de agarosa-TAE y se observaron sobre una lámpara de luz ultravioleta tras ser teñidos en una solución de bromuro de etidio.

RESULTADOS

RESULTADOS

I.- RUTA DE ASIMILACIÓN DE TOLUENO POR *Pseudomonas putida* DOT-T1E

1.1. Obtención de mutantes incapaces de crecer en presencia de tolueno.

P. putida DOT-T1E es capaz de crecer en distintos compuestos resultante del metabolismo del tolueno en las distintas rutas descritas en la introducción, entre ellos *p*-hidroxibenzoato, protocatecuato y benzoato. Para elucidar qué ruta de degradación de tolueno que operaba en nuestra cepa, se planteó mutagenizar la misma utilizando el plásmido pGS9 que porta el transposón Tn5. Se conjugaron células de *P. putida* DOT-T1E con *E. coli* HB101 (pGS9) y las transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo con 3, 4-dihidroxibenzoato como fuente de carbono, rifampicina y kanamicina. Posteriormente se hicieron réplicas en una placa en medio mínimo más tolueno (varilla) y se verificó su incapacidad de crecimiento de esas colonias en dicho medio. De las aproximadamente 2000 que fueron ensayadas se encontró una serie de 15 que no crecieron en tales condiciones por lo que se consideraron candidatos aptos para su posterior caracterización.

Para determinar los posibles compuestos acumulados en la ruta de degradación de tolueno en los distintos mutantes obtenidos, las cepas se cultivaron en medio mínimo M9 con glucosa como fuente de carbono y tolueno en fase gaseosa a 30°C y agitación a 200 rpm. Alícuotas de 1 µl de los sobrenadantes de cultivos de 1 ml de cada uno de los candidatos y completamente libre de células, se inyectaron en HPLC y se analizaron los cromatogramas resultantes observándose que en sólo uno de los casos aparecía un

posible intermediario de la ruta del tolueno en el sobrenadante. Esa muestra correspondía a la mutante 5 y por esa razón se seleccionó este clon para su caracterización

Para caracterizar este mutante se procedió a aislar ADN cromosómico y después de una digestión, clonar el fragmento que llevase el gen interrumpido por el Tn5. Las digestiones fueron hechas parcialmente con la enzima *Sau3AI* y luego de separarlos en un gradiente de sacarosa 10-40% como se describe en Materiales y Métodos, se seleccionaron aquéllos fragmentos de un tamaño comprendido entre 6 y 12 kb y se ligaron a pUC18 digerido con *BamHI*. Posteriormente se transformó la cepa DH5 α F' y se seleccionaron aquéllas colonias portadoras del Tn5 en LB con Ap y Km. Al hacer minipreparaciones de ADN de éstas, se seleccionó la mayor en tamaño para continuar con la caracterización y se denominó pT1-G1. Posteriormente se hizo un mapa parcial de restricción para ubicar algunos sitios comunes que nos permitieran subclonar algún fragmento. En este mapa se pudieron ubicar los sitios *HindIII* y *EcoRI* (Figura 9). El patrón de restricción del ADN del clon indicaron la presencia de tres sitios *HindIII* dos de los cuales se ubican a aproximadamente 1,2 Kb de cada extremo del Tn5. En la figura R1 se muestra un mapa del mapa parcial del fragmento interrumpido por Tn5. Para secuenciar la zona de interés, se hizo una deleción con *HindIII* entre el sitio del vector y el más lejano a éste y tras una autoligación del fragmento restante se procedió a transformar células competentes de *E. coli*. De algunas colonias obtenidas se hicieron minipreparaciones de ADN y luego de una restricción con *EcoRI* se comprobó el tamaño y patrón esperados (pT1-m5 Δ *HindIII*). Una alícuota de este ADN fué enviada a secuenciación utilizando para ello un oligonucleótido homólogo al extremo del Tn5, este se conoce como oligo F1. Paralelamente el fragmento *HindIII* del extremo opuesto en el pT1-G1 fué subclonado en el sitio

*Hind*III de pUC18 y una minipreparación de ADN (pT1-FH) fue llevada a cabo y enviada a secuenciación utilizando también el oligonucleótido F1. Los resultados de ésta nos indicaron que la secuencia adjunta al Tn5 del subclón Δ *Hind*III correspondía a una secuencia homóloga a la región 5' de los genes *xylK* del plásmido TOL de la cepa *P. putida* 2440 y *todH* de la cepa *P. putida* F1 que codifican para la enzima 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa. De similar manera, la secuencia en el subclón pT1-FH mostraba homología a la región 3' de los mismos genes.

Para localizar y analizar los genes contiguos se diseñaron otros oligonucleótidos, éstos fueron los oligos HOVA5' y HOVA3' y se procedió a la secuenciación del ADN adyacente. Los resultados de la secuenciación nos indicaron que la secuencia correspondiente al primer oligo y el molde pT1- Δ *Hind*III correspondía una alta homología con los genes *xylQ* y *todI* en las cepas de *P. putida* 2440 y *P. putida* F1 respectivamente. La del segundo oligo y el molde pT1-FH mostraba una homología de 98% respecto al gen *todS* de *P. putida* F1 en los primeros 100 aminoácidos en el extremo amino terminal. Estos resultados indicaban pero no confirmaban que en la cepa DOT-T1 podría operar la ruta Tod.

1.2 Rescate y secuenciación de los genes *tod* de una genoteca de *P. putida* DOT-T1E.

Para la identificación, localización y caracterización de los genes contiguos se llevó a cabo una búsqueda en una genoteca construida en el plásmido pUC18 como se describió en Materiales y Métodos. El fragmento *Eco*RI-*Hind*III de aproximadamente 1.1 kb (Figura 9) se utilizó como sonda en condiciones estrictas de hibridación contra las 3000 colonias de la genoteca de DOT-T1E. Tras lavar y revelar

las membranas, se encontraron 2 candidatos con una clara señal los que luego de hacer minipreparaciones de ADN de cada uno de ellos y digerir con *EcoRI* se seleccionó el candidato de mayor tamaño y fue denominado pT1-125. Para caracterizarlo se hicieron digestiones con varias enzimas y se obtuvo un mapa parcial. Utilizando el ADN de este plásmido como molde y los oligonucleótidos universal y reverso se obtuvo la secuencia de los extremos del fragmento. La secuenciación completa del fragmento se obtuvo utilizando varios oligonucleótidos o delecionando algunos fragmentos tras haber digerido con alguna enzima con cortes únicos en el sitio múltiple de clonación y el inserto (*EcoRI* y *XbaI*). En resumen, se secuenciaron 16 kb del mencionado plásmido y el análisis de la secuencia con el programa DNA STRIDER se localizaron a lo largo del fragmento 10 marcos abiertos de lectura. Estos se muestran en la Figura 10 donde se presenta también el mapa parcial y la dirección de la secuenciación. La comparación de la secuencia con el banco de datos indicó que había una gran homología con los genes de la ruta TOD de *P. putida* F1. Sin embargo el plásmido no contenía la totalidad de los genes cuando se comparaba con la estructura del operón *tod* de *P. putida* F1. Por ello se realizó una nueva búsqueda en la genoteca utilizando como sonda el extremo cercano al sitio *HindIII* de aproximadamente 1 Kb el cual fue generado por amplificación entre el oligo universal y uno de los diseñados para la secuencia.

Como en casos anteriores, de los candidatos obtenidos tras revelar las membranas hibridadas, se seleccionó uno con un inserto de aproximadamente 9 Kb el cual se denominó pT1-4R. Tras secuenciar el extremo con los oligonucleótidos universal, reverso e internamente con otros diseñados, se localizaron los genes que faltaban de la ruta TOD los cuales correspondían a los denominados *todXFC1*. Al analizar la secuencia de estos genes se encontró que en los 13

marcos abiertos de lectura se iniciaron con el codón **ATG**, excepto los correspondientes a los genes *todD* y *todT* que usaron un codón **GTG**. La secuencia completa de los genes de la ruta se muestra en la Figura 10 y fue depositada en el GenBank bajo el número de acceso es Y18245. Un esquema de la localización y organización de éstos y los del plásmido pT1-125 se muestra en la Figura 11 así como la secuencia completa del operón (R3B).

Cabe mencionar que de los 13 marcos abiertos de lectura, uno codifica para la proteína no necesaria para el metabolismo de tolueno (*todX*), 7 para las enzimas de la ruta (*todFC1C2BADEGIH*) y dos para los genes reguladores (*todST*). Las proteínas TodS y TodT son altamente similares a miembros de la superfamilia de los sistemas de transducción de señales de dos componentes encontrados tanto en eucariotas como procariontes (Appleby et al., 1996; Lau et al., 1997; Parkinson y Kofoid, 1992; Reizer y Saier, Jr. 1997). Los componentes del operón TOD, las proteínas codificadas, su función y una comparación de cada una de ellas en el banco de datos es presentada en la Tabla 3.

1. 3 Identificación del punto de iniciación de la transcripción del gen *todX*

Estudios enzimáticos indicaban que *P. putida* DOT-T1 expresaba 3-metilcatecol 2,3-dioxigenasa solo en cultivos en presencia de tolueno (V. Santos y J.L.Ramos, comunicación personal). Este resultado sugería que la ruta catabólica era inducible. Para analizar más en detalle la expresión de los genes *tod*, se aisló ARN libre de ADN de *P. putida* DOT-T1E de cultivos incubados en succinato como fuente de carbono en presencia o ausencia de tolueno que se utilizaba como inductor. Cantidades equivalentes de ARN total fueron hibridadas con oligonucleótidos complementarios al ARNm de *todX* y se marcaron con [³²P]γ-ATP

los que posteriormente fueron extendidos con transcriptasa reversa como se indicó en Materiales y Métodos. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 12. Puede observarse que la inducción del operón *todXFC1C2BADEGIH* tiene lugar solo en presencia de tolueno y otros inductores lo cual respalda los resultados de los ensayos enzimáticos. Además de tolueno otros inductores como estireno, etilbenceno, *m*-xileno y benceno fueron ensayados como inductores y suministrados en fase vapor. Los resultados se muestran también en la figura R4 donde se observa la inducción en distinto grado de cada uno de ellos. El nivel de ADNc obtenido en el análisis por extensión de cebador puede ser usado para estimar la fuerza relativa de la inducción del promotor de *todX* (P_{todX}). El grado de inducción de cada uno de ellos se considera alto aunque en el caso del tolueno se aprecia un mayor nivel. No fué sorprendente encontrar el mismo sitio de iniciación de la transcripción con cada uno de esos compuestos el cual fué localizado en la base T distante 60 pares de bases del codón de iniciación (ATG) del gen. El análisis de las secuencias hacia arriba del sitio de iniciación de transcripción en la región -10 y -35 mostraron una divergencia con las secuencias consenso para diferentes factores sigma.

1. 4 Tolerancia a solventes en mutantes incapaces de metabolizar tolueno

Ensayos previos en nuestro grupo mostraron que el cultivar *P. putida* DOT-T1 en presencia de tolueno tenía un efecto favorable para la tolerancia al hidrocarburo aromático (Ramos et al., 1997a). Esto es, cuando esta bacteria se había cultivado en LB y tolueno en fase gaseosa (varilla) y se adicionaba 0,3 % (v/v) de tolueno en fase líquida, una alta proporción de las células (70-100%)

sobrevivían al choque de disolvente mientras que una proporción considerablemente menor (0,001%) sobrevivía si las bacterias se habían cultivado en ausencia de tolueno. Para determinar si el metabolismo del tolueno juega un papel en esta respuesta, se probó la tolerancia a tolueno en mutantes de la ruta TOD. Estas eran la mutante 5 en el gen *todH* obtenida con el transposón Tn5 y otra obtenida en el gen *todC1* por inserción del gen de resistencia a telurito por la Dra. Maribel Ramos-González (mutante DOT-T1-C5AR2).

Las cepas silvestre y mutantes fueron incubadas en LB hasta alcanzar una turbidez de 1 a 660 nm, entonces se adicionó 0,3% (v/v) del disolvente y se determinó la viabilidad celular. Cuando las cepas habían sido incubadas en ausencia de tolueno la sobrevivencia disminuía 5 ordenes de magnitud; en cambio en los cultivos preexpuestos a tolueno, este nivel era comparable en las mutantes con la cepa silvestre (Figura 13). Los resultados sugieren que la tolerancia incrementada de los cultivos preexpuestos a tolueno era dada por la inducción de mecanismos de tolerancia en lugar del metabolismo de tolueno.

2.- IDENTIFICACION DE LOS GENES QUE CODIFICAN UNA BOMBA DE EFLUJO DE TOLUENO ADYACENTE A LOS GENES *tod*

2. 1. Localización de genes homólogos a bombas de eflujo ubicados en 3' con respecto al operón *tod*.

Como puede observarse en el esquema de organización de los genes de la ruta *tod*, los dos operones que la conforman están dispuestos en dos unidades transcripcionales adyacentes que se transcriben en la misma dirección. El análisis de la secuencia adyacente al gen *todT*, indicaba que a 400 pb del extremo 3' de este gen se abría en dirección transcripcional opuesta a *todT* un marco

de lectura de aproximadamente 1,4 kb junto a éste aparecía otro marco de lectura del que solo se pudieron obtener 300 pb. Al comparar estas secuencias con las del banco de datos se encontró que el marco de lectura de 1,4 kb codificaba un polipéptido de 480 aminoácidos que exhibía una gran homología con los genes *oprM*, *ttgC* y *srpC* de algunas cepas de *Pseudomonas*. Para disponer de la secuencia completa de estos genes, el fragmento del extremo junto al gen *todT* de 2 kb en el plásmido pT1-125 se amplificó por PCR y se marcó durante la amplificación con digoxigenina para usar como sonda contra la genoteca de *P. putida* DOT-T1E que se había construido previamente. Se hibridó en condiciones estrictas y tras lavar y revelar, se encontraron 6 candidatos de los que se hicieron minipreparaciones de ADN. Tras digerir con *Pst*I para determinar el perfil de cortes y el tamaño, se seleccionó para caracterización el candidato de mayor tamaño, que se denominó pT1-B6. Este plásmido contenía un inserto del genoma de DOT-T1 de aprox. 10,5 kb. Se estableció el mapa de restricción de este plásmido y se generaron delecciones y realizaron subclonaciones de distintos fragmentos. El plásmido pT1-B6 y sus derivados con delecciones o sus subclonaciones se secuenciaron con los oligonucleótidos universal y reverso y posteriormente con otros diseñados en distintos puntos. La secuencia completa se depositó en el banco de datos con número de acceso AFY19106 y se muestra en la figura 14. El análisis de las secuencias obtenidas se desglosa para su análisis. La organización y marcos abiertos de lectura contenidos en el fragmento se muestran en la Figura 15. El tamaño de estos marcos es de 1147, 3143 y 1439 pb cuya dirección transcripcional es opuesta al del operón *tod* y fueron denominados *ttgDEF*. El análisis de la secuencia de nucleótidos nos llevó a considerar que los genes formaban un operón. Esta posibilidad está basada en que el ATG del tercer marco de lectura solapa con el codón de terminación

del segundo, y solo 14 pb separaban el segundo marco de lectura del primero. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un ensayo de RT-PCR. Para ello se aisló ARN de un cultivo de *P. putida* DOT-T1E incubado en medio mínimo con succinato o succinato y tolueno suministrado en fase gaseosa y se llevaron a cabo las reacciones de RT-PCR con los siguientes oligonucleótidos:

Del marco 1: 5'-GCGTATCAACATGCAGTACAC-3' y del marco 2: 5'-CGGTCAATGAAGAAGCGAGACATG-3'; del marco 2: 5'-CGGCGCAAGTGCAGGCAGGCAGTCAGCACTCCATT-3' y del marco 3: 5'-CAGATAATTGTCCACGCCCTCGTCG-3'. Solo se obtuvieron productos de amplificación en células cultivadas con tolueno, los productos de amplificación obtenidos eran de 730 y 1455 pb y eran congruentes con los datos de secuencia. En los controles negativos (reacciones sin RT-AMV) no se detectó señal de amplificación. Estos resultados se muestran en la Figura 16 con lo cual se confirmó la estructura del operón y que la expresión es dependiente del efector.

Los tres marcos de lectura al ser traducidos en las secuencias polipeptídicas correspondientes producían péptidos de 382, 1048 y 480 aminoácidos. Estas secuencias se compararon con las depositadas en el banco de datos y se encontró que el primero, segundo y tercer péptidos exhibían homología a la proteína de fusión periplásmica, al elemento de las bombas de flujo RND y a la porina del mismo sistema. La mayor homología se encontró con el sistema SrpABC de *P. putida* S-12 (75% de identidad, 88% de similaridad) (Kieboom et al., 1998) y con la bomba TtgABC de *P. putida* DOT-T1 (59% de identidad, 77% de similaridad) (Ramos et al., 1998). Menor homología fue encontrada con los genes de la bomba de eflujo de *Pseudomonas aeruginosa* mexEFoprN (44% de identidad) (Köhler et al., 1997) y a los genes acrAB (45%) y AcrEF (43%) de *E. coli* (Aono et al., 1998; Fralick, 1996). La homología entre estas bombas de eflujo fue posteriormente confirmada al hacer un alineamiento múltiple

por ordenador. El de la proteína periplásmica de fusión, TtgD y SrpA, TtgA, MexA, AcrE, AcrA y MexC se muestra en la Figura 17.

En la región 5' con respecto al primer marco de lectura, *ttgD* se obtuvieron alrededor de 3500 bases, el análisis de la secuencia reveló que no codificaba para ninguna proteína completa sino que se encuentran varias regiones truncadas con homología a parte de alguna proteína de membrana o incluso a una parte de una integrasa, a esta región se le denominó **rnc** (región no codificante).

2.2. Determinación de la estructura operónica de los genes *ttgDEF*, influencia de disolventes sobre la transcripción de estos genes e identificación del inicio de transcripción.

Para determinar el patrón de expresión de los genes *ttgDEF* bajo respuesta a disolventes, se aisló ARN de cultivos de *P. putida* DOT-T1 en fase exponencial e incubados en presencia o ausencia de compuestos como tolueno, estireno, *m*-xileno y *p*-hidroxibenzoato. Se realizaron reacciones de extensión con igual cantidad de ARN en cada caso. El oligonucleótido utilizado fue: 5'-CTCTACGAACATGCGTTTCTGCAG-3' que era complementario al ARNm generado a partir del gen *ttgD*. Tras separar los ADNc sintetizados y expuestos a una película fotográfica se observó una banda en las muestras de los cultivos que fueron incubadas en presencia de tolueno y estireno ubicándose en ambos casos el mismo sitio de iniciación el cual fue localizado a 50 pb del codón de inicio del gen, **GTG**. Estos resultados se presentan en la Figura 18.

2. 3 Construcción de un mutante nulo de *P. putida* DOT-T1 por remplazo génico.

Para determinar si las proteínas TtgDEF jugaban un papel en la tolerancia a disolventes, se planeó inactivar el operón por mutagénesis dirigida utilizando el plásmido suicida mobilizable pKNG6-11. El plásmido pT1-B6 fue digerido con *Xho*I liberando un fragmento de 2,5 kb que comprende el inicio del *ttgD* y parte de la región donde no se encontraron marcos de lectura definidos (*rnc*). Este fragmento fue remplazado por un cassette de 3,0 kb que codifica resistencia a telurito (Sánchez et al., 1998). El plásmido resultante se denominó pT1-B611. Posteriormente, un fragmento de 7 kb obtenido por la digestión con *Bam*HI el cual porta el gen de resistencia a telurito flanqueado por un lado por los genes '*ttgDE*' (ambos incompletos) y por el otro por 2 kb correspondientes a los de la región '*rnc*', fue clonado en el sitio *Bam*HI del plásmido pKNG101 para producir el plásmido pKNG6-11 (Figura 19 A). Este se usó para recombinación de la cepa *P. putida* DOT-T1 (mutación *rnc::telAB::'ttgDttgE'*). El plásmido tiene el gen de resistencia a estreptomicina (Sm^R) el cual tiene la ventaja de usarlo como marcador de selección en el evento de cointegración además del gen *sacB* de *Bacillus subtilis* como un marcador contraseleccionable para facilitar la identificación del intercambio alélico (Kaniga et al., 1991). Después de una cruce triparental, aparecían transconjugantes de *P. putida* DOT-T1 que eran resistentes a estreptomicina con una frecuencia de 10^{-5} por célula. Un clon sensible a sacarosa fue aislado para posterior caracterización. Luego de un crecimiento a 30° C del merodiploide en LB, las células fueron inoculadas en placas de LB con sacarosa 5%. Y aquéllas que eran capaces de crecer en este medio fueron replicadas en una placa con estreptomicina donde eran seleccionadas aquéllas incapaces

de crecer en este antibiótico. Para confirmar el remplazo génico, ADN cromosomal fue obtenido de los candidatos, digerido con *EcoRI* e hibridado con la sonda marcada y generada por PCR del gen *ttgD*. La mutante seleccionada fue llamada *P. putida* DOT-T1-1. Los resultados de esta hibridación se muestran en la Figura 19 B.

2. 4 Análisis fenotípico del mutante nulo en *ttgDEF*

Para asignar el papel a los productos de *ttgDEF* en la tolerancia a disolventes, la cepa silvestre DOT-T1E y la mutante DOT-T1E-1 fueron incubadas durante una noche en medio LB con o sin tolueno en fase gaseosa. Posteriormente los cultivos fueron diluïdos e incubados hasta que alcanzaran la fase exponencial. Cuando la turbidez a 660 nm era cercana a 1, se añadió tolueno a los mismos (0,3 % [v/v]) y se determinaron los índices de sobrevivencia. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20. Tras la adición de tolueno, una fracción similar (aproximadamente 10^{-4}) de la cepa silvestre y el mutante sobrevivían al choque. En cultivos preinducidos con tolueno en fase gaseosa, casi el 100% de las células de la cepa silvestre sobrevivían al choque mientras solo el 1% de la mutante podían hacerlo.

Ya que un número de bombas de flujo están involucradas en el eflujo de antibióticos, tratamos de ver el comportamiento de la cepa silvestre y la mutante DOT-T1-1 en placas de LB con tolueno en fase gaseosa para inducir la bomba *TtgDEF*. Las placas se suplementaron con diferentes antibióticos suministrados en discos (cefotoxima, 30 ug; ciprofloxacina, 15 ug; gentamicina, 10 ug; kanamicina, 30 ug; ácido nalidíxico, 30 ug; neomicina, 30 ug; piperacilina, 100 ug y tetraciclina, 30 ug) y se incubaron a 30° C. Se midieron los halos de inhibición tras de 12 h de incubación. Al analizar cada uno de estos halos se

observó que la cepa mutante era tan sensible como la silvestre a los antibióticos sugiriendo que la función de la bomba no está involucrada en el flujo de estos antibióticos.

2. 5 Construcción de un doble mutante nulo *ttgABC*, *ttgDEF* y su análisis fenotípico.

Para elucidar el papel de las diferentes bombas encontradas en *P. putida* DOT-T1, se planeó explorar el fenotipo de una mutante carente tanto de los genes constitutivos *ttgABC* como de los *ttgDEF*. Para este propósito se aprovechó la mutante generada por inserción de Tn5 en los genes *ttgABC* (Ramos *et al.*, 1998). Este mutante es más sensible que el silvestre a choques de tolueno tanto en condiciones inducidas como no inducidas (Figura 20). Así, la mutación *rnc::telAB::'ttgDttgE* del plásmido pKNG6-11 se transfirió al cromosoma del mutante en *ttgABC* de manera similar a la descrita anteriormente. Un clon, denominado *P. putida* DOT-T1-82 fué obtenido y se realizaron los ensayos de sobrevivencia. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura R13. Se encontró que bajo condiciones no inducidas, las células del mutante DOT-T1E-82 eran inviables cuando se expusieron al choque de tolueno (0,3%). Cuando las células de este mutante habían sido preexpuestas a tolueno se sometieron al choque de tolueno, sólo una fracción (0,01 a 0,1 %) sobrevivieron. Esta fracción era de dos órdenes de magnitud inferior a la supervivencia de la silvestre.

2. 6 Localización de los genes *ttgDEF* en cepas de *Pseudomonas* que comparten la ruta *tod*

En un estudio previo en nuestro grupo en el que se habían caracterizado cepas de *Pseudomonas* que crecían en tolueno por la ruta de tolueno dioxigenasa codificada por los genes *tod* (Huertas *et al.*, 1999) se encontró que algunas de estas cepas (por ej. *P. putida* SMO116) eran sensibles a tolueno mientras que otras eran moderadamente tolerantes (*P. putida* F1) o capaces de crecer en altas concentraciones de tolueno (*P. putida* MTB6). En base a la secuencia al final del operón *todST* y el final del *ttgDEF* (ver figura 15), se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (A, al final de *todT* 5'-CTGGTTCGAGTAACTGAGCGGCTCAAGATAGCCT-3' y B, al final de *ttgE* 5'-CGGCGCAAGTGCAGGCAGTCAGCACTCCATT-3') en reacciones de PCR para determinar si la organización entre estos operones estaba presente en las diferentes cepas. Se incluyeron en el ensayo además de las cepas antes mencionadas las cepas de *P. putida* DOT-T1, *P. putida* 2440, *P. mendocina* KR1, *P. aeruginosa* y *E. coli* ET8000. Los resultados obtenidos fueron la amplificación de una banda de 2 kb únicamente en las cepas que portan la ruta *tod*, no se observó banda alguna en las otras, lo que sugería una organización conservada entre estos dos operones. En la Figura 21 se muestran estos resultados. El no haber amplificado la banda en el caso de las cepas que no tienen la ruta *Tod* tampoco significa que no se pudiera encontrar los genes *ttgDEF* en estas cepas y por esta razón se diseñaron oligonucleótidos en los genes *ttgD*, *ttgE* y *ttgF* en los que se esperarían productos de amplificación de 0.8, 1.2 y 1.4 kb. Sin embargo no hubo bandas amplificadas en las cepas en cuestión, a diferencia de las cepas portadoras de los genes *tod* que se utilizaron como control positivo. Estos resultados sugieren que los genes *tod* y *ttgDEF* han

coevolucionado para permitir utilizar un compuesto tóxico tal como el tolueno.

III. IMPLICACION DE *todS* y *todT* EN LA REGULACION DEL OPERON *tod* DE LA RUTA DE DEGRADACION DE TOLUENO.

Como se ha mencionado anteriormente, los genes de la ruta *tod* se han agrupado en dos operones: el *todXFC1C2BADEFGIH* y el *todST*. El primero codifica las enzimas catabólicas implicadas en la oxidación de los hidrocarburos aromáticos y el segundo es un sistema de transducción de señales que está implicado con la inducción del primer operón. De esta manera, la expresión a partir del promotor de *todX* es mediada por el producto de *todT* cuando las células se encuentran en presencia de tolueno (Lau et al., 1997).

3. 1. Extensión en *todS*

Un experimento de extensión fue llevado a cabo con muestras de ARN obtenidas de la cepa de *P. putida* DOT-T1 la que fue incubada en medio mínimo con succinato, tolueno, *m*-xileno o *p*-hidroxibenzoato. Las muestras de ARN fueron hibridadas con el oligo pSA (5'-GTGCATGTTGTTTCACACGTC-3') que es complementario al gen *todS* y que fue marcado con [³²P]- γ -ATP y cuya reacción se realizó como se indicó en Materiales y Métodos. Los resultados de esta extensión se muestran en la Figura 22 en la cual se puede observar que en las muestras obtenidas de los cultivos en succinato o *p*-hidroxibenzoato la expresión parece ser constitutiva y en las cuales se pueden observar al menos dos bandas que podrían corresponder a dos posibles promotores. Los sitios de iniciación de la transcripción de *todS* se localizaron en las bases A a 25 y A a 31 en la secuencia que se muestra en la misma figura. Hacia el extremo 5' del sitio de iniciación de transcripción, se encontraron las regiones -

10/ -35 similares a las reconocidas por el σ^{70} de la ARN polimerasa. El promotor más cercano al codón de iniciación de *todS* fue llamado P_{todS1} y el más lejano P_{todS2} . Así también en las mismas muestras usadas para la expresión de *todS*, se analizó la expresión del promotor en *todX* y en el cual como se esperaba, no se observó banda alguna.

Cabe señalar que en los transcritos de *todS* de células cultivadas en tolueno se encontraron además de las dos bandas ya mencionadas, otras de mayor tamaño localizadas en las posiciones 169 y 185 respecto al codón de iniciación (ver secuencia de promotor en la figura 27). Además, al observar la intensidad de las bandas de los transcritos originados de P_{todS1} y P_{todS2} , se estimó que era 10 veces mayor que las de las muestras obtenidas de cultivos en succinato o *p*-hidroxibenzoato.

3.2 Posibilidad de un solo transcrito

Con las observaciones anteriores surge la pregunta acerca de la naturaleza de las bandas localizadas hacia el extremo 5' de P_{todS1} y P_{todS2} . ¿ Son estas productos de algún otro promotor de *todST* o son resultado de una degradación del mensajero que precede al de *ST* ? Para determinar si el transcrito en el que se incluye *todH* y *todS* existían en células incubadas en tolueno, se llevó a cabo un ensayo de RT-PCR con oligonucleótidos basados en las secuencias de *todH* y *todS* y *todS* y *todT*. Los oligonucleótidos utilizados fueron, en *todH* (5'-CTCAAGACGGTGGATATTCTTG-3') y *todS* (5'-GTGCATGTTCTTCACAGCTC-3'); en *todS* (5'-TCTCGCTGATGCCTCAACGTGTCG-3') y *todT* (5'-CTGCTCAGTGCTTCCAGTACTG-3'). Las condiciones en que fue llevado a cabo el ensayo se describieron en Materiales y Métodos. El resultado se presenta en la Figura 23 en donde se puede ver la amplificación de bandas de 460 pb en el caso de la región de *todH* y *todS* (calle 2) y 890 pb en el caso de *todS* y *todT* (calle 4).

Para discernir entre un producto de degradación y el sitio de iniciación de transcripción se determinó la expresión del promotor de *todST* en muestras de cultivos de la cepa mutante *P. putida* DOT-T1 *todH::Tn5* el cual es incapaz de crecer en tolueno como única fuente de carbono dada la inserción polar de Tn5 en el gen *todH*. La expresión de *todX* y *todS* se determinó en presencia y en ausencia de tolueno, utilizando succinato como fuente de carbono en ambos casos. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 22 (expresión de *todS*) y figura 25. Se puede observar que en presencia de tolueno, la expresión de P_{todX} se llevaba a cabo de manera similar a la determinada para la cepa silvestre. En el caso de la expresión de *todS* las bandas mayores observadas en la cepa silvestre no estaban presentes en este caso, Figura 22. Esta serie de resultados apuntaban al hecho de que las bandas arriba de P_{todS1} y P_{todS2} podrían ser el resultado de la degradación de un ARNm de mayor tamaño y porque la alta expresión de *todX* en estas células, las bandas representaban productos de degradación en lugar de nuevos promotores. El hecho que la expresión de P_{todS1} y P_{todS2} en la cepa de *todH::Tn5* fuera similar a la observada en células incubadas en succinato indica que es posible que la lectura de la ARN polimerasa fácilmente localiza los promotores P_{todS} e incrementa su lectura.

3. 3. Obtención de mutantes en los genes *todS* y *todT* y expresión de los promotores de *todX* y *todS*.

Para investigar con más detalle el papel de los genes *todS* y *todT*, un fragmento *XhoI-HindIII* de 4.3 kb originado de pT1-125 que contiene la mayoría de los genes de la ruta *tod*, fue subclonado en el plásmido pUC18. A este nuevo plásmido se le denominó pT1-155.

Un recurso útil para analizar la función de algún gen es la interrupción del mismo y determinar el comportamiento

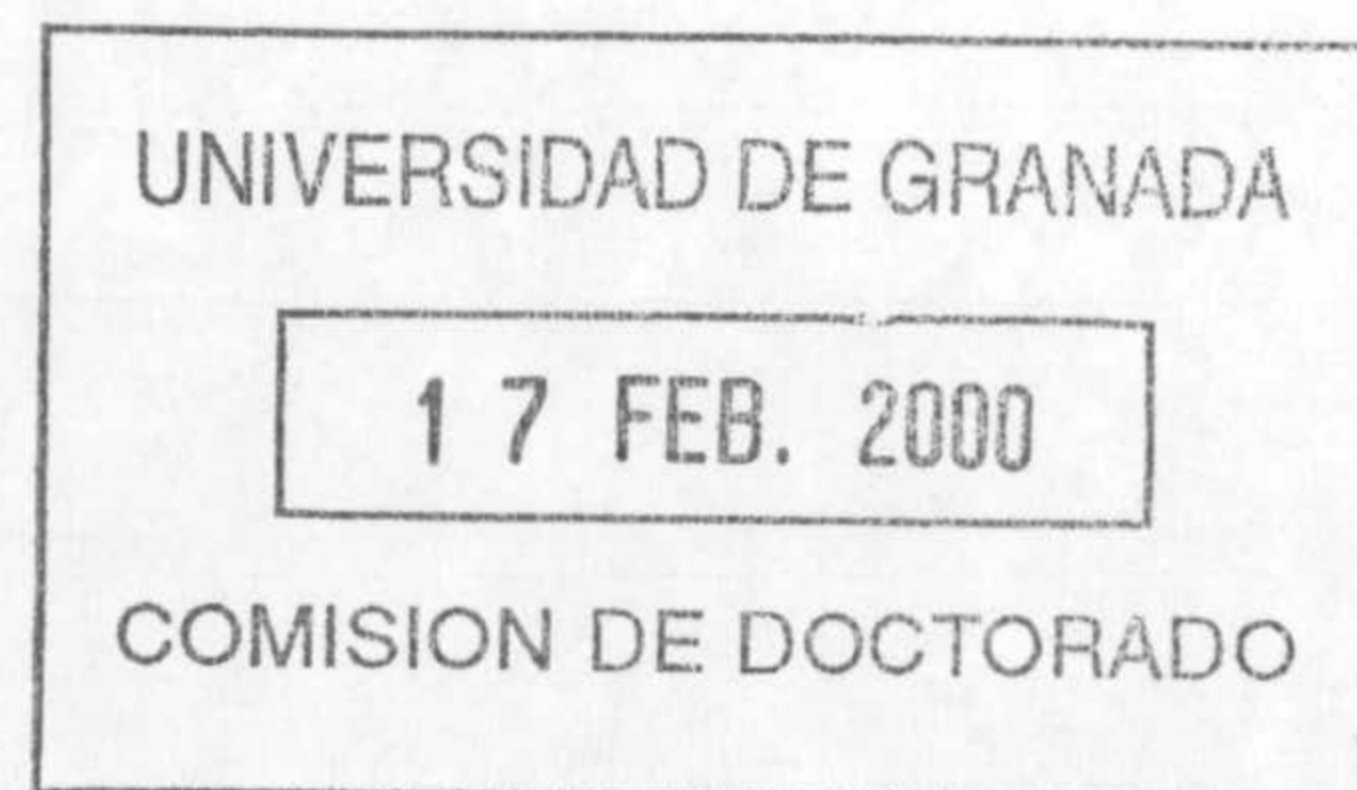
de la cepa bajo determinadas condiciones. La secuencia de este fragmento indica que un sitio único *HpaI* localizado a 736 pb del codón de inicio del gen *todS*. En este fue insertado un fragmento de 2.2 kb el cual contiene el gen de resistencia a kanamicina y que proviene del plásmido pHP45 Ω km luego de haberlo digerido con las enzimas *HindIII* y *ScaI* y rellenar los extremos protuberantes. El mismo diseño se hizo en el sitio *EcoRV* donde se encuentra el gen *todT*. De esta manera se obtuvieron los plásmidos pT1- Δ S1 y pT1- Δ T2 donde los genes *todS* y *todT* respectivamente han sido interrumpidos por el gen de resistencia a kanamicina. El esquema de estas construcciones se muestra en la Figura 24.

Para transferir las mutaciones de los genes en estos plásmidos a la cepa silvestre, se creó un nuevo sitio *BamHI* reemplazando al *HindIII* del pUC18, con ayuda de un "linker". De esta manera, una digestión con la enzima *BamHI* liberaba un fragmento de 6.5 kb el cual fue clonado en el plásmido pKNG101 con el que posteriormente se hizo la recombinación en la cepa silvestre. De esta forma se obtuvieron los mutantes *P. putida* DOT-T1-S1Km y *P. putida* DOT-T1-T2Km los que carecen de las proteínas TodS y TodT respectivamente y que eran incapaces de crecer en tolueno como única fuente de carbono. Un análisis por hibridación de estas mutantes para confirmar la inserción del gen de resistencia a kanamicina se muestra en la figura 25.

Para ver la inducción en estos mutantes se hicieron extensiones con ARN de cultivos de cada uno incubados con succinato como fuente de carbono y en presencia o ausencia de tolueno. Los resultados de la expresión de *todX* en los mutantes no mostraban inducción en presencia de tolueno a diferencia de la observada en la cepa silvestre. Esto denota el papel regulatorio de los productos TodS y TodT en la expresión del operón *todXFC1C2BADEGIH* (Figura 26). La expresión de *todS* fue también determinada en las cepas

mutantes y se muestran en la Figura 27. Puede observarse que el perfil de expresión del promotor P_{tods2} en el mutante en *tods* era similar al observado en la cepa silvestre, sin embargo la expresión de P_{tods1} era equivalente al de P_{tods2} y unas 6 veces más baja que la expresión del mismo promotor en la cepa silvestre. Esto indica que el gen del producto en alguna forma regula su propia transcripción o que alternativamente, *TodT* en ausencia de *TodS* reprime la expresión del promotor P_{tods1} sin afectar la expresión del P_{tods2} .

En el perfil de expresión de P_{tods1} y P_{tods2} en el mutante en *todT* era también similar al observado en la cepa silvestre (figura 27). Esto excluye el papel de *TodT* como un represor de P_{tods1} . Si este hubiese sido el caso se hubiera encontrado un incremento en la expresión de P_{tods1} en cualquier circunstancia. Es difícil ver cómo un represor puede limitar la expresión de P_{tods1} que dista 6 pb del promotor P_{tods2} . Sin embargo es probable que señales apropiadas sean encontradas hacia arriba de P_{tods1} de tal manera que la inducción de este sea factible mientras la expresión de P_{tods2} sea bloqueada.



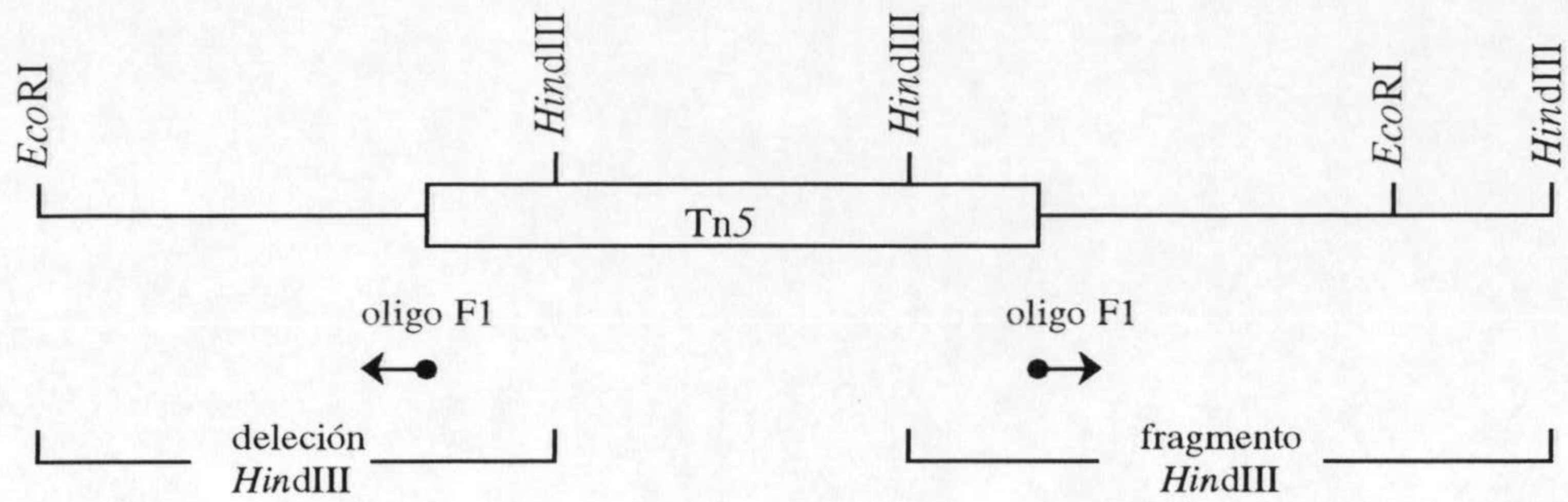


Figura 9. Mapa parcial de restricción del plásmido pT1-G1 portando el Tn5 con interrupción del cromosoma de *P. putida* DOT-T1E. Los sitios *EcoRI* y *HindIII* de los extremos corresponden a los del vector. Los fragmentos de la parte inferior que se muestran como delección *HindIII* y fragmento *HindIII* fueron subclonados en pUC18 y cada uno secuenciado con el oligo F1 donde se indica.

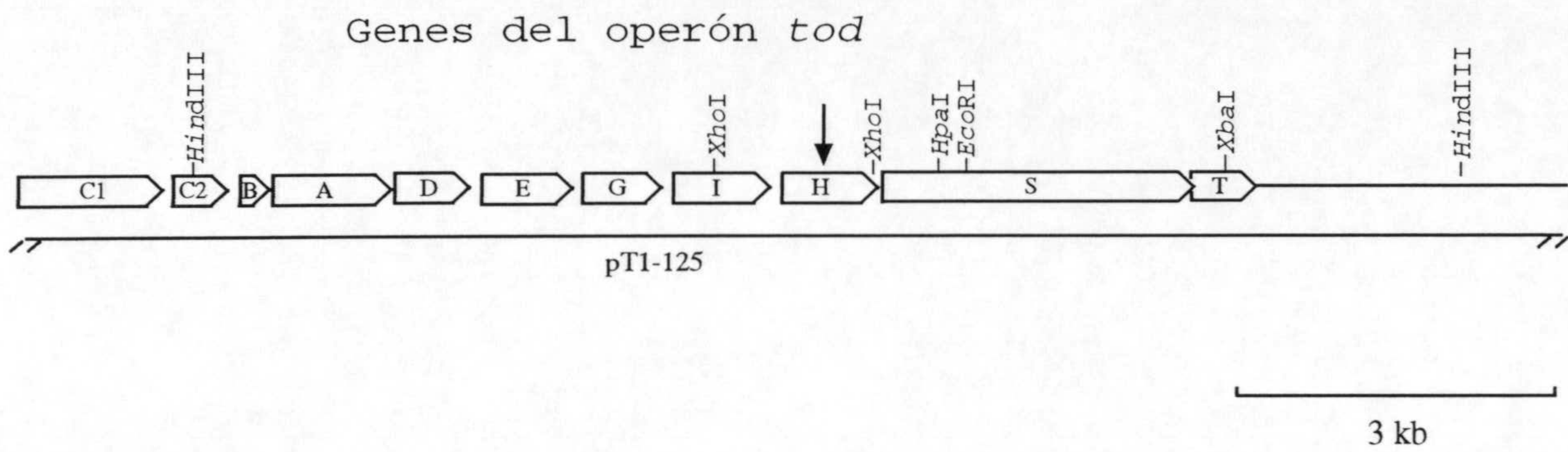


Figura 10. Mapa parcial de restricción del plásmido pT1-125 y localización de los genes del operón *tod*. La flecha indica el punto de inserción del Tn5 en el mutante *P. putida* DOT-T1-m5.

A

Operón *tod*

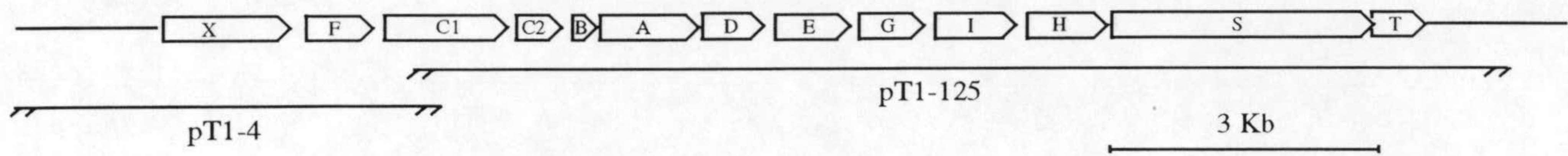


Figura 11 **A**. Organización de los genes *tod* del cromosoma de *P. putida* DOT-T1E. Los plásmidos en que están contenidos los genes del operón se indican abajo de cada línea.

Figura 11 B. Secuencia del operón *tod*.

1
GCGTGGCTCCCGTGACAGAACGCTCCTCGATCAACGCATTGAGCGCCACCAGCATGTTCA
61
GGTCTGAGGTTTTTCATCGACATCAGGTTATCAACCTGCTCGTGGACCTGAGGGAAACTGC
121
CGTGGCGGGCGACGGGGCTTGCGCGTAAGCCCCGCTATACGACCAGCCTGTTTCGAAAGCC
181
GCAAAGTGCTTAGGTTTGGGTGCATATCCATCAGAAGCGGCATAAACCATCGTTTATCAC
241
AGTTAAACTTTGGTTTTCTAAGTTGCGATAGCCATATAAACCCATAAGCCAAAAACAAT
301
ATTTCCCAGGGCGTGATTGTAATACTGTGCGTGGTCTAAGGCGGTGTTTGCCTACTTCAC
361/121
TTTATAAAAAAATAAGATGTGGAAGGATTGTAATTATGAAGATTGCCAGCGTGCTCGCA
391/131
todX M K I A S V L A
421/141
451/151
CTGCCTTTGAGTGGATATGCTTTCAGTGTGCATGCTACACAGGTTTTTCGACCTGGAAGGT
L P L S G Y A F S V H A T Q V F D L E G
481/161
511/171
TATGGAGCGATCTCTCGTGCCATGGGTGGCACCAGTTCATCGTATTATACCGGTAATGCT
Y G A I S R A M G G T S S S Y Y T G N A
541/181
571/191
GCGCTGATTAGTAATCCCGCTACATTGAGTTTTGCTCCGGACGGAAATCAGTTTGAGCTC
A L I S N P A T L S F A P D G N Q F E L
601/201
631/211
GGGCTGGACGTGGTACTACCGATATCAAGGTTTACGACAGCCACGGAGCAGAGGCAAAA
G L D V V T T D I K V H D S H G A E A K
661/221
691/231
AGCAGCACGAGATCCAATAATCGAGGCCCTATGTGGGTCCACAATTGAGCTATGTTGCT
S S T R S N N R G P Y V G P Q L S Y V A
721/241
751/251
CAGTTGGATGACTGGCGTTTTCGGTGCTGGATTGTTTGTTCAGTAGCGGGTTGGGTACAGAG
Q L D D W R F G A G L F V S S G L G T E
781/261
811/271
TATGGAAGTAAAAGTTTTCTATCACAGACAGAAAACGGAATCCAGACCAGCTTTGATAAT
Y G S K S F L S Q T E N G I Q T S F D N
841/281
871/291
TCCAGCCGTCTGATCGTATTGCGCGCTCCTATTGGCTTTAGTTATCAAGCCACATCAAAG
S S R L I V L R A P I G F S Y Q A T S K
901/301
931/311

CTCACCTTCGGCGCTAGTGTGCGATCTGGTCTGGACTTCACTCAACCTTGAACCTTCTACTT
 L T F G A S V D L V W T S L N L E L L L
 961/321 991/331
 CCA TCA TCT CAG GTG GGA GCC CTG ACT GCG CAG GGG AAT CTT TCA GGC
 GGT TTA GTT CCC
 P S S Q V G A L T A Q G N L S G G L V P
 1021/341 1051/351
 TCGCTGGCTGGATTTCGTCGGGACAGGTGGTGCCGCCCATTTTCAGTCTAAGTCGCAACAGT
 S L A G F V G T G G A A H F S L S R N S
 1081/361 1111/371
 ACCGCTGGTGGCGCCGTGGATGCGGTCGGTTGGGGCGGGCGCTTGGGACTTACCTACAAA
 T A G G A V D A V G W G G R L G L T Y K
 1141/381 1171/391
 CTCACGGATAACACTGTCCTAGGTGCGATGTACAACCTTCAAGACTTCGGTGGGCGATCTC
 L T D N T V L G A M Y N F K T S V G D L
 1201/401 1231/411
 GAGGGGAAGGCGACACTTTCTGCTATCAGTGGTGATGGAGCGGTGCTTCCATTGGATGGC
 E G K A T L S A I S G D G A V L P L D G
 1261/421 1291/431
 GATATCCGTGTAAAAAACTTTGAGATGCCCGCCAGTCTGACGCTTGGCCTCGCTCATCAG
 D I R V K N F E M P A S L T L G L A H Q
 1321/441 1351/451
 TTCAATGAGCGTTGGGTAGTTGCTGCTGATATCAAGCGTGCCTACTGGGGTGATGTAATG
 F N E R W V V A A D I K R A Y W G D V M
 1381/461 1411/471
 GATAGCATGAATGTGGCTTTCATCTCGCAGTTGGGCGGGATCGATGTCGCATTGCCACAC
 D S M N V A F I S Q L G G I D V A L P H
 1441/481 1471/491
 CGCTATCAGGATATAACGGTGGCCTCAATCGGCACTGCTTACAAATATAACAATGATTTA
 R Y Q D I T V A S I G T A Y K Y N N D L
 1501/501 1531/511
 ACGCTTCGTGCTGGATATAGCTATGCACAACAGGCGCTAGACAGCGAACTGATATTGCCA
 T L R A G Y S Y A Q Q A L D S E L I L P
 1561/521 1591/531
 GTGATTCCTGCTTATTTGAAGCGGCACGTTACTTTCGGTGGCGAGTATGACTTTGACAAG
 V I P A Y L K R H V T F G G E Y D F D K
 1621/541 1651/551
 GACTCCAGGATCAATTTGGCAATTTCTTTTGGCCTGAGAGAGCGCGTGCAGACGCCATCG
 D S R I N L A I S F G L R E R V Q T P S
 1681/561 1711/571
 TACTTGGCAGGCACCGAGATGTTGCGGCAAAGCCACAGTCAAATAAATGCAGTGGTTTCC
 Y L A G T E M L R Q S H S Q I N A V V S
 1741/581 1771/591
 TATAGCAAAAATTTTTAAATCCCAAGGGCACGGAGCGTAAGTGATGACGAATGACGAATG

Y S K N F

to d F

M T N V

1801/601

1831/611

TAAACGCAGAGATCGGCCGCATGGTGCTGGCTGGTGGGAATCGAGACCAATCTCCATGATG
N A E I G R M V L A G G I E T N L H D V

1861/621

1891/631

TTGGCGCCGGCAACCCTGTGGTACTCGTTCATGGTTCAGGCCAGGTGTGACCGCCTGGG
G A G N P V V L V H G S G P G V T A W A

1921/641

1951/651

CGAACTGGAGGACGGTCATGCCTGAGTTATCCAGGCATCGCCGCGTCATTGCGCCGGACA
N W R T V M P E L S R H R R V I A P D M

1981/661

2011/671

TGGTGGGCTTCGGTTTCACACAGCGGCCGCACGGGATTCACTACGGCGTCGAGTCCTGGG
V G F G F T Q R P H G I H Y G V E S W V

2041/681

2071/691

TTGCACATCTGGCTGGGATCCTTGATGCCCTGGAACCTCGACCGTGTGATCTCGTGGGGA
A H L A G I L D A L E L D R V D L V G N

2101/701

2131/711

ATTCGTTCCGGCGGTGCCTTGTCTCTGGCCTTTGCTATCCGATTTCCGCATCGGGTTCGCC
S F G G A L S L A F A I R F P H R V R R

2161/721

2191/731

GCCTGGTGCTGATGGGTGCCGTTGGCGTGAGCTTCGAGCTCACGGATGGACTGGATGCAG
L V L M G A V G V S F E L T D G L D A V

2221/741

2251/751

TTTGGGGTTATGAGCCGTCCGTGCCGAACATGCGCAAGGTCATGGACTACTTCGCCTACG
W G Y E P S V P N M R K V M D Y F A Y D

2281/761

2311/771

ACCGAAGTCTCGTTTCCGACGAACTGGCGGAACTGCGCTACAAGGCGAGCACCCGGCCCG
R S L V S D E L A E L R Y K A S T R P G

2341/781

2371/791

GTTTTTCAGGAGGCCTTCGCTTCCATGTTCCCTGCTCCGCGGCAGCGCTGGGTAGATGCGC
F Q E A F A S M F P A P R Q R W V D A L

2401/801

2431/811

TGGCCAGTTCCGATCAGGACATCCGGGACATCCGGCATGAAACGCTGATCCTGCATGGCC
A S S D Q D I R D I R H E T L I L H G R

2461/821

2491/831

GCGACGATCGCGTGATTCCCCTCGAAACCTCGTTGCGGCTGAACCAGCTGATCGAACCT
D D R V I P L E T S L R L N Q L I E P S

2521/841

2551/851

CCCAGTTACATGTCTTTGGCAGGTGTGGCCATTGGGTGCAGATCGAGCAAAACCGGGGCT
Q L H V F G R C G H W V Q I E Q N R G F

2581/861

2611/871

TTATCCGCTTGGTCAACGATTTTCTTGCCGCGGAGGACTGATCGCAAAAACGGGAATGAC
I R L V N D F L A A E D

2701/901
 TGAAAAGTGAGAAGACAATGAATCAGACCGACACATCACCTATCAGGCTGCGCAGGAGCT
 todC1 M N Q T D T S P I R L R R S
 W
 2761/921
 GGAACACCAGCGAGATAGAAGCGCTCTTTGACGAGCATGCCGGACGTATCGATCCGCGCA
 N T S E I E A L F D E H A G R I D P R I
 2821/941
 TTTATACCGATGAGGATCTGTACCAACTCGAACTGGAGCGTGTCTTCGCCCGGTCCTGGC
 Y T D E D L Y Q L E L E R V F A R S W L
 2881/961
 TGCTGTTGGGGCATGAAACCCAGATTCGCAAGCCGGGCGATTACATCACGACCTACATGG
 L L G H E T Q I R K P G D Y I T T Y M G
 2941/981
 GTGAAGACCCTGTCGTGGTCGTCCGGCAGAAAGACGCCAGCATTGCCGTGTTCTGAACC
 E D P V V V V R Q K D A S I A V F L N Q
 3001/1001
 AGTGCCGCCACCGTGGCATGCGCATCTGCCGCGCGGATGCCGGAAACGCGAAGGCGTTCA
 C R H R G M R I C R A D A G N A K A F T
 3061/1021
 CTTGCAGCTACCACGGGTGGGCTTACGACACCGCCGGCAATCTTGTC AATGTGCCTTACG
 C S Y H G W A Y D T A G N L V N V P Y E
 3121/1041
 AGGCCGAATCCTTCGCGTGCCTGAACAAGAAGGAATGGAGCCCGCTGAAGGCCCGGGTAG
 A E S F A C L N K K E W S P L K A R V E
 3181/1061
 AAACCTACAAGGGCCTGATTTTCGCCAACTGGGATGAGAACGCTGTAGACCTCGACACGT
 T Y K G L I F A N W D E N A V D L D T Y
 3241/1081
 ATCTGGGCGAGGCGAAGTTCTACATGGACCACATGCTCGACCGCACCGAGGCCGGCACCG
 L G E A K F Y M D H M L D R T E A G T E
 3301/1101
 AAGCGATCCCGGGCGTGCAGAAGTGGGTCATTCCCTGTA ACTGGAAATTCGCCGCAGAGC
 A I P G V Q K W V I P C N W K F A A E Q
 3361/1121
 AGTTTTGCAGCGACATGTACCATGCCGGGACGACCTCGCATCTGTCTGGCATCCTGGCAG
 F C S D M Y H A G T T S H L S G I L A G
 3421/1141
 GCCTGCCAGAAGACCTTGAAATGGCCGACCTTGCTCCGCCGACAGTTGGCAAGCAGTACC
 L P E D L E M A D L A P P T V G K Q Y R
 3481/1161
 GTGCGTCATGGGGCGGACATGGAAGTGGCTTCTATGTCGGCGACCCCAATCTGATGCTTG
 A S W G G H G S G F Y V G D P N L M L A
 3541/1181
 3571/1191

CCATCATGGGGCCAAAGGTCACCAGCTACTGGACCGAAGGCCCGCGTCGGAAAAGGCGG
 I M G P K V T S Y W T E G P A S E K A A
 3601/1201 3631/1211
 CCGAACGTCTGGGTAGCGTGGAGCGCGGCTCGAAACTCATGGTTCGAGCACATGACCGTCT
 E R L G S V E R G S K L M V E H M T V F
 3661/1221 3691/1231
 TCCCCACGTGTTCTTCTCCAGGTATCAATACGGTCCGGACATGGCATCCGCGCGGGC
 P T C S F L P G I N T V R T W H P R G P
 3721/1241 3751/1251
 CGAACGAGGTCGAGGTATGGGCGTTTACGGTGGTCGATGCTGATGCTCCTGACGATATCA
 N E V E V W A F T V V D A D A P D D I K
 3781/1261 3811/1271
 AGGAAGAGTTCCGGCGCCAGACGCTGCGCACCTTCTCTGCCGGTGGCGTGTTTCGAGCAGG
 E E F R R Q T L R T F S A G G V F E Q D
 3841/1281 3871/1291
 ACGACGGGGAGAAGTGGGTCGAGATCCAGCACATCCTGCGAGGCCACAAGGCGCGGAGCC
 D G E N W V E I Q H I L R G H K A R S R
 3901/1301 3931/1311
 GCCCTTCAATGCCGAGATGAGCATGGACCGACCGTTCGACAACGACCCGGTTTACCCCG
 P F N A E M S M D Q T V D N D P V Y P G
 3961/1321 3991/1331
 GGCGGATCAGCAACAACGTCTACAGCGAGGAAGCTGCCCGCGGGCTCTATGCCATTGGC
 R I S N N V Y S E E A A R G L Y A H W L
 4021/1341 4051/1351
 TGCGGATGATGACATCCCCGACTGGGACGCGCTGAAGGCGACACGCTGAATCCAGAGAC
 R M M T S P D W D A L K A T R
 4141/1381 4171/1391
 GCGGTGGACCTTGTCCATTTGAAATCTACAAGGAACGACCATGATTGATTCAGCCAACAG
todC2 M I D S A N R
 4201/1401 4231/1411
 AGCCGACGTCTTTCTCCGCAAGCCGGCACCCGTAGCGCCGAACTGCAGCACGAAGTCGA
 A D V F L R K P A P V A P E L Q H E V E
 4261/1421 4291/1431
 GCAGTTCTACTATTGGGAGGCCAAGCTTCTCAACGATCGCCGCTTCGAGGAGTGGTTCGC
 Q F Y Y W E A K L L N D R R F E E W F A
 4321/1441 4351/1451
 GCTGCTCGCGGAAGACATTCACTACTTCATGCCATTTCGCACCACGCGGATCATGCGGGA
 L L A E D I H Y F M P I R T T R
 I M R D
 4381/1461 4411/1471
 CTCGCGCCTTGAATACTCAGGCTCCCGAGAGTACGCGCACTTCGATGACGACGCCACGAT
 S R L E Y S G S R E Y A H F D D D A T M
 4441/1481 4471/1491
 GATGAAGGGACGCTTGCAGCAAGATCACGTCCGACGTGAGCTGGTCCGAGAACCCCGCATC

M K G R L R K I T S D V S W S E N P A S
4501/1501 4531/1511
GCGGACCCGGCATCTCGTGAGCAACGTGATGATCGTCGGCGCAGAGGCAGAAGGGGAGTA
R T R H L V S N V M I V G A E A E G E Y
4561/1521 4591/1531
CGAAATCTCAAGCGCCTTCATTGTGTACCGCAATCGTCTGGAGCGGCAGCTCGACATCTT
E I S S A F I V Y R N R L E R Q L D I F
4621/1541 4651/1551
TGCCGGTGAGCGTCGTGATACGTTGCGCCGTAACACGAGCGAGGCCGGGTTTCGAGATCGT
A G E R R D T L R R N T S E A G F E I V
4681/1561 4711/1571
CAATCGGACCATCCTGATCGACCAGAGCACCATCCTGGCCAATAACCTCAGTTTCTTCTT
N R T I L I D Q S T I L A N N L S F F F
4741/1581 4771/1591
CTAGGTGATGTCATGACTTGGACATACATATTGCGGCAGGGTGACCTGCCACCCGGTGAG
to dB M T W T Y I L R Q G D L P P G E
4801/1601 4831/1611
ATGCAGCGCTACGAAGGCGGCCCGGAACCTGTGATGGTCTGCAACGTCGATGGCGAGTTC
M Q R Y E G G P E P V M V C N V D G E F
4861/1621 4891/1631
TTCGCGGTGCAGGATACCTGCACGCATGGGGACTGGGCGTTGTTCGGATGGTTACCTGGAC
F A V Q D T C T H G D W A L S D G Y L D
4921/1641 4951/1651
GGTGATATTGTCGAATGCACGTTGCATTTTCGGCAAGTTCTGCGTGCGGACCGGGAAGGTG
G D I V E C T L H F G K F C V R T G K V
4981/1661 5011/1671
AAGGCGCTGCCTGCTTGCAAACCTATCAAGGTATTCCCAATCAAGGTGCAAGGCGATGAA
K A L P A C K P I K V F P I K V E G D E
5041/1681 5071/1691
GTGCACGTCGATCTCGACAACGGGGAGTTGAAGTGATGGCTACCCATGTGGCGATCATCG
V H V D L D N G E L K O P A
to dA M A T H V A I I G
5101/1701 5131/1711
GCAATGGCGTGGGTGGCTTCACGACCGCGCAGGCCCTACGTGCCGAGGGCTTCGAGGGGA
N G V G G F T T A Q A L R A E G F E G R
5161/1721 5191/1731
GAATCTCGCTGATTGGGGACGAACCGCATCTCCCCTATGACCGACCATCCTTGTC CAAGG
I S L I G D E P H L P Y D R P S L S K A
5221/1741 5251/1751
CGGTTCTCGACGGCAGCCTTGAGCGGCCGCCCATACTGGCCGAGGCCGATTGGTACGGCG
V L D G S L E R P P I L A E A D W Y G E
5281/1761 5311/1771
AGGCCCGCATCGACATGCTGACCGGCCCGGAAGTCACTGCCCTTGATGTGCAGACAAGGA
A R I D M L T G P E V T A L D V Q T R T

5341/1781 5371/1791
 CGATCAGTCTGGATGATGGCACCCACGCTCTCTGCGGACGCCATCGTCATCGCGACGGGCA
 I S L D D G T T L S A D A I V I A T G S
 5401/1801 5431/1811
 GTCGAGCGCGGACGATGGCGTTGCCCGGCAGCCAACTGCCCGGCGTCGTAACGCTGCGCA
 R A R T M A L P G S Q L P G V V T L R T
 5461/1821 5491/1831
 CCTACGGTGACGTGCAGGTATTGCGCGATAGTTGGACTTCCGCGACGCGGCTGCTGATTG
 Y G D V Q V L R D S W T S A T R L L I V
 5521/1841 5551/1851
 TGGGTGGCGGATTGATCGGCTGCGAGGTGCGGACGACGGCGCGCAAGCTCGGCCTGTCGG
 G G G L I G C E V A T T A R K L G L S V
 5581/1861 5611/1871
 TCACGATCCTGGAGGCAGGTGATGAACTGCTGGTCCGAGTACTTGGGCGGCGTATCGGTG
 T I L E A G D E L L V R V L G R R I G A
 5641/1881 5671/1891
 CCTGGCTGCGCGGCCTGCTGACAGAACTTGGTGTGCAGGTGCGAGTTGGGAACGGGTGTCG
 W L R G L L T E L G V Q V E L G T G V V
 5701/1901 5731/1911
 TAGGTTTTTCTGGTGAGGGCCAGCTCGAACAAGTCATGGCCAGCGATGGGCGCAGCTTCG
 G F S G E G Q L E Q V M A S D G R S F V
 5761/1921 5791/1931
 TAGCCGATAGCGCACTCATTGCGTCGGCGCGGAGCCCAGGATCAACTTGC GCGTCAAG
 A D S A L I C V G A E P A D Q L A R Q A
 5821/1941 5851/1951
 CGGGCTTGGCATGTGACCGCGGCGTCATTGTCGATCACTGCGGTGCGACGCTTGCCAAAG
 G L A C D R G V I V D H C G A T L A K G
 5881/1961 5911/1971
 GCGTATTCGCCGTCGGAGATGTGGCCAGTTGGCCGCTGCGCGCCGGCGGCGGCGTTTCGC
 V F A V G D V A S W P L R A G G R R S L
 5941/1981 5971/1991
 TCGAAACCTATATGAACGCGCAGCGCCAAGCCGCGCGGTGGCTGCGGCCATTCTGGGGA
 E T Y M N A Q R Q A A A V A A A I L G K
 6001/2001 6031/2011
 AAAACGTATCGGCACCGCAACTGCCCGTGTCTGACGGAGATCGCTGGGCATCGCATGC
 N V S A P Q L P V S W T E I A G H R M Q
 6061/2021 6091/2031
 AGATGGCGGGCGATATCGAAGGACCTGGTGATTTCGTCTCGCGCGGCATGCCCGGTAGTG
 M A G D I E G P G D F V S R G M P G S G
 6121/2041 6151/2051
 GCGCTGCCCTGTTGTTCCGCCTGCAGGAGCGAAGGATTCAGGCGGTCGTCGCGGTCGATG
 A A L L F R L Q E R R I Q A V V A V D A
 6181/2061 6211/2071
 CACCCCGTGACTTCGCGCTTGCAACCCGATTGGTAGAAGCCCAGCGCGGCAATCGAGCCAG

P R D F A L A T R L V E A R A A I E P A
 6241/2081 6271/2091
 CACGGCTGGCAGATCTTTCAAACAGTATGCGCGATTTTGTTCGTGCGAATGAAGGAGACC
 R L A D L S N S M R D F V R A N E G D L
 6301/2101 6331/2111
 TAACGTGAGACTTGAAGGCGAAGTGGCCTTGGTGACAGGCGGTGGCGCAGGCCTGGGCAG
 todd M R L E G E V A L V T G G G A G L G R
 T
 6361/2121 6391/2131
 AGCGATCGTGGATCGTTATGTCGCGGAAGGTGCGCGTGTCGCGGTGCTGGATAAATCCGC
 A I V D R Y V A E G A R V A V L D K S A
 6421/2141 6451/2151
 GGCAGGCCTGGAAGCGCTCAGGAAACTCCATGGCGATGCAATCGTGGGCGTGGAGGGGGA
 A G L E A L R K L H G D A I V G V E G D
 6481/2161 6511/2171
 TGTTGCTCGCTCGACAGCCATCGTGAGGCTGTGGCCCGCTGCGTCGAAGCGTTCGGCAA
 V R S L D S H R E A V A R C V E A F G K
 6541/2181 6571/2191
 GCTGGACTGCCTGGTTGGCAATGCTGGCGTTTGGGACTACCTGACCCAACCTGGTGGATAT
 L D C L V G N A G V W D Y L T Q L V D I
 6601/2201 6631/2211
 TCCCGACGACCTCATATCGGAGGCATTTCGAGGAAATGTTTCGAGGTCAATGTCAAGGGCTA
 P D D L I S E A F E E M F E V N V K G Y
 6661/2221 6691/2231
 CATCCTGGCGGCAAAGGCTGCGCTACCTGCGCTTTATCAGAGCAAAGGCAGCGCGATATT
 I L A A K A A L P A L Y Q S K G S A I F
 6721/2241 6751/2251
 CACTGTGTCGAATGCCGGTTTCTACCCGGGCGGTGGCGGTGTTCTGTATACAGCTGGCAA
 T V S N A G F Y P G G G G V L Y
 T A G K
 6781/2261 6811/2271
 ACATGCCGTGATTGGATTGATCAAGCAGCTCGCGCACGAATGGGGGCCGCGTATCCGCGT
 H A V I G L I K Q L A H E W G P R I R V
 6841/2281 6871/2291
 CAACGGCATCGCCCCGGTGGCATTTTGGGGAGCGATCTGCGCGGGCTGAAGAGCCTTGA
 N G I A P G G I L G S D L R G L K S L D
 6901/2301 6931/2311
 TTTACAAGACAAGAGCATTTCGACCTTTCCATTGGACGACATGCTGAAATCCGTTCTTCC
 L Q D K S I S T F P L D D M L K S V L P
 6961/2321 6991/2331
 GACCGGGCGGGCCGCACTGCCGAGGAATACGCCGGCGCCTATGTCTTCTTCGCGACGCG
 T G R A A T A E E Y A G A Y V F F A T R
 7021/2341 7051/2351
 CGGCGACACGGTTCCGCTCACCGGTAGCGTGTTGAACTTCGATGGCGGCATGGGCGTGCG

G D T V P L T G S V L N F D G G M G V R
 7081/2361 7111/2371
 TGGCTTGTTTCGAAGCCAGCCTAGGCGCACAGCTCGACAAGCACTTCGGTTGAGACAGGAG
 G L F E A S L G A Q L D K H F G
 7141/2381 7171/2391
 AAGTGTCATGAGCATTCAAAGATTGGGCTACCTCGGCTTCGAAGTCGCAGATGTGCGTTC
*to*E M S I Q R L G Y L G F E V A D V R S
 7201/2401 7231/2411
 ATGGCGTACCTTCGCCACTACCAGGCTGGGGATGATGGAAGCCTCAGCCAGCGAGACGGA
 W R T F A T T R L G M M E A S A S E T E
 7261/2421 7291/2431
 GGCGACGTTTCGAATCGACTCACGTGCCTGGCGACTGTCGGTTCAGCAGAGGCCCCGCAGA
 A T F R I D S R A W R L S V S R G P A D
 7321/2441 7351/2451
 CGACTACCTGTTTGCCGGTTTCGAGGTGGATAGTGAACAGGGGCTACAGGAGGTCAAGGA
 D Y L F A G F E V D S E Q G L Q E V K E
 7381/2461 7411/2471
 AAGCCTGCAGGCCACGGCGTTACCGTCAAGGTCGAAGGAGGGGAGCTGATTGCCAAACG
 S L Q A H G V T V K V E G G E L I A K R
 7441/2481 7471/2491
 CGGTGTGCTTGGGTTGATTTTCATGCACCGATCCGTTTCGGCAATCGCGTCGAGATCTACTA
 G V L G L I S C T D P F G N R V E I Y Y
 7501/2501 7531/2511
 CGGTGCCACCGAACTGTTTCGAGCGACCATTGCTTCGCCACCGGTGTTTCTGGATTTC
 G A T E L F E R P F A S P T G V S G F Q
 7561/2521 7591/2531
 AACTGGAGACCAGGGCTTAGGTCACTATGTGTTGAGCGTCGCAGATGTGGACGCAGCGCT
 T G D Q G L G H Y V L S V A D V D A A L
 7621/2541 7651/2551
 CGCCTTCTATACCAAGGCATTGGGCTTTCAGCTTGCCGATGTCATCGACTGGACCATTGG
 A F Y T K A L G F Q L A D V I D W T I G
 7681/2561 7711/2571
 TGACGGGTTATCCGTGACCCTCTACTTCTGTACTGCAATGGCCGTCACCACTCCTTCGC
 D G L S V T L Y F L Y C N G R H H S F A
 7741/2581 7771/2591
 CTTTGCCAAGTTGCCGGGATCGAAGCGGCTCCATCACTTCATGCTGCAAGCTAATGGCAT
 F A K L P G S K R L H H F M L Q A N G M
 7801/2601 7831/2611
 GGATGACGTGGGCCTGGCATAACGACAAATTTGATGCGGAGCGTGCGGTCGTTATGTCACT
 D D V G L A Y D K F D A E R A V V M S L
 7861/2621 7891/2631
 TGGTCGACACACGAACGACCACATGATTTTCGTTCTACGGTGCCACGCCCTCGGGCTTCGC
 G R H T N D H M I S F Y G A T P S G F A
 7921/2641 7951/2651

GGTCGAGTACGGCTGGGGCGCACGTGAGGTGACCCGCCACTGGTTCGGTGGTGCCTACGA
V E Y G W G A R E V T R H W S V V R Y D
7981/2661 8011/2671
CCGTATCAGCATCTGGGGACACAAGTTCCAGGCGCCCGCCTGACCGGCCAGCCTGGCGGT
R I S I W G H K F Q A P A OPA P A
S L A V
GCTAGTCCTGCTTCTACCTGCATGCCCATATGCCAGAACGTGCTGGACGGCAGGGCAGCA
8101/2701 8131/2711
CACGCAAAAATCCTGGAAGGTGTTAATCGAGGAGAGATATCAGCATGAGCGAACTAGATA
todG M S E L D T
8161/2721 8191/2731
CCGCGCGGACAGGTGCCGTGCGTAAAGCTGCCGACCTGCTGTACGAAGCCACCCGGTCCG
A R T G A V R K A A D L L Y E A T R S G
8221/2741 8251/2751
GTGTGGCCGTGGTGGCGGTGCGCAATCTGATCGGCGAGACGGATTTGGAGGCAGCCTATG
V A V V P V R N L I G E T D L E A A Y A
8281/2761 8311/2771
CAGTACAGGAGGTTAATACACAGAGAGCATTGGTTGCCGGGCGGCGCCTGGTTGGACGCA
V Q E V N T Q R A L V A G R R L V G R K
8341/2781 8371/2791
AGATTGGGCTGACCTCTGTCGCTGTACAGAAGCAGCTCGGAGTGGAACAGCCCGACTATG
I G L T S V A V Q K Q L G V E Q P D Y G
8401/2801 8431/2811
GCATGTTGTTTCGCAGACATGGCGCGTACCGAGGGGGAGGAAATCGCCCTTGATGACGTGC
M L F A D M A R T E G E E I A L D D V L
8461/2821 8491/2831
TCCAACCTAAAGTCGAAGCCGAGATCGCCTTTGTCCTGGGACGTGACCTCGATGGCGATC
Q P K V E A E I A F V L G R D L D G D Q
8521/2841 8551/2851
AATTGACGGTGGCCGACCTCTTTCGCGCCATCGAGTTCGCCGTTCCGGCGATCGAGATCG
L T V A D L F R A I E F A V P A I E I V
8581/2861 8611/2871
TGGGTTTCGCGGATAACCAATTGGGATATCCGTATCACGGACACCATTGCTGACAATGCTT
G S R I T N W D I R I T D T I A D N A S
8641/2881 8671/2891
CGTCTGGCCTGTATGTGCTGGGCTCCACGCCGAAGCGCTTGTGCGATTTTACTCGCGCC
S G L Y V L G S T P K R L C D F D S R Q
8701/2901 8731/2911
AGGCAGGCATGGTGATGGAGCGGCAAGGCATACCGGTGTCTTCCGGGGTAGGGGCGCCT
A G M V M E R Q G I P V S S G V G A A C
8761/2921 8791/2931
GCCTTGGAGCGCCTCTCAACGCAGTCCTTTGGTTGGCCAGGGTCATGGCTCGAGCGGGCC

L G A P L N A V L W L A R V M A R A G R
 8821/2941 8851/2951
 GTCCGTTGCGCACTGGCGACACGGTGCTTTCCGGTGCCTGGGCCCCATGGTGCCAGTGG
 P L R T G D T V L S G A L G P M V P V A
 8881/2961 8911/2971
 CAGGAGGAGATGTATTCGATGTGCGGATAGCCGGGCTTGGATCGGTGACCGCCGCTTTTG
 G G D V F D V R I A G L G S V T A A F A
 8941/2981 8971/2991
 CAAAGGCATAAGCCCGTAAAAACGATCCCATCCACTGTCGCAACCTTCCGGGCCTTGCGT
 K A
 9001/3001 9031/3011
 GAACAGCTGCCGGTTATGCAACCGGACGCGATGGCCTACTGATTCAAGGAGTATCACCAT
todI M
 9061/3021 9091/3031
 GACCCGCAAAGTCAAGGCTGCCATCATTGGTAGCGGTAATATCGGCACCGACCTGATGAT
 T R K V K A A I I G S G N I G T D L M I
 9121/3041 9151/3051
 CAAGATACTCAGGCATGGTCAACACATTGAAATGGGAGCGATGGTTCGGCATCGACCCCGC
 K I L R H G Q H I E M G A M V G I D P A
 9181/3061 9211/3071
 TTCTGACGGTCTGGCACGCGGGGAACGCATGGGGGTGGCTATCACTCATGAAGGTGTCGA
 S D G L A R G E R M G V A I T H E G V E
 9241/3081 9271/3091
 GGGGCTGACGCGCCTGCCGGTGTTCATGAGATCGACGTCGTGTTTCGACGCTACTAGTGC
 G L T R L P V F N E I D V V F D A T S A
 9301/3101 9331/3111
 TGGTGCATGTGAAGAACGAGGCCCTACTGCGTGAGCGCAAGCCAGGACTGCGCATGAT
 G A H V K N E A L L R E R K P G L R M I
 9361/3121 9391/3131
 CGACCTGACACCCGCGGATCGCGCCCTATTGCATCCCGGTGGTCAATGGTGACGACCA
 D L T P A A I A P Y C I P V V N G D D H
 9421/3141 9451/3151
 CCTGGATGCGACGAACGTCAATATGGTCACCTGTGGCGGCCAGGCCACCATCCCCATGGT
 L D A T N V N M V T C G G Q A T I P M V
 9481/3161 9511/3171
 GGCTGCGGTATCGCGCGTAGCCAAGGTGCATTACGCCGAAATCATCGCCAGCATCTCCAG
 A A V S R V A K V H Y A E I I A S I S S
 9541/3181 9571/3191
 CAAGAGCGCCGGCCCCGGCACGCGCGCCAACATCGATGAGTTCACCGAGACCACGTCCAA
 K S A G P G T R A N I D E F T E T T S K
 9601/3201 9631/3211
 GGCCATCGAGGTGGTTGGCGGGGCGGCGAAGGGCAAGGCGATCATCGTCCTGAACCCGGC
 A I E V V G G A A K G K A I I V L N P A
 9661/3221 9691/3231

CGAGCCGCCGCTGATGATGCGAGATGCGGGTTTACACGCTGAGCGACTTCGCTGACATCGA
E P P L M M R D A V Y T L S D F A D I D
9721/3241 9751/3251

CCAGATCGAAGAGTCGGTGCAGCGCATGGCCGACGCAGTGCAGGCATACGTACCCGGCTA
Q I E E S V Q R M A D A V Q A Y V P G Y
9781/3261 9811/3271

TCGCCTGAAGCAGCGCGTGCAGTTCGACCGCATCGAGGCCGATTGTCCGATCCGCATTCC
R L K Q R V Q F D R I E A D C P I R I P
9841/3281 9871/3291

TGGCGTCGGAGACCGCATGAACGGGCTCAAGACTTCGATCTTCCTGGAAGTCGAGGGCGC
G V G D R M N G L K T S I F L E V E G A
9901/3301 9931/3311

TGCACACTACCTGCCAGCTTATGCCGGCAACCTGGACATCATGACCAGTGCCGCGCTGCG
A H Y L P A Y A G N L D I M T S A A L R
9961/3321 9991/3331

CACCGCCGAGAAGTTGGCTGAGCGTTTGCTCGCCTCCCTGGTGCCTGAGGACATAGCCA
T A E K L A E R L L A S L V A

todH M

10021/3341 10051/3351

TGACTCAACAGAACTCTACATCTCTGATGTGACGCTGCGCGACGGCAGCCACGCGATCC
T Q Q K L Y I S D V T L R D G S H A I R
10081/3361 10111/3371

GGCACCAGTACACGGTGGAGCAGGTAAAGCAGATTGCCCGGGCGCTAGATGACGCCAAGG
H Q Y T V E Q V K Q I A R A L D D A K V
10141/3381 10171/3391

TCGACTCCATCGAGGTTGCCACGGCGATGGCCTGCAGGGAGGCAGCTTCAACTACGGCT
D S I E V A H G D G L Q G G S F N Y G F
10201/3401 10231/3411

TTGGCGCGCAATCGGATCTGGAGTGGATTGAAGCAGCCGCGAGCGTGGTCAAGCATGCGA
G A Q S D L E W I E A A A S V V K H A K
10261/3421 10291/3431

AGATCGCCACGCTGCTTTTGGCCGGCATCGGTACTGTGCATGACCTCAAGGCAGTCTATG
I A T L L L P G I G T V H D L K A V Y E
10321/3441 10351/3451

AGGCCGGCGTGC GCGTGGTGC GTGCTACGCACTGCACCGAGGCCGACATCTCCAGGC
A G V R V V R V A T H C T E A D I S R Q
10381/3461 10411/3471

AACACATCGAGTACGCGCGCCATTTGGGCATGGAGGCCGTAGGCTTCCTGATGATGAGCC
H I E Y A R H L G M E A V G F L M M S H
10441/3481 10471/3491

ACATGACTACACCGCAGCACCTGGCCCAGCAGGCCAAGCTGATGGAAAGCTACGGTGCTA
M T T P Q H L A Q Q A K L M E S Y G A T
10501/3501 10531/3511

CTGTCTGTTACGTGGTTCGATTCCGGTGGCGCGCTGAGCATGAACGACGTGCGTGACCGCT

V C Y V V D S G G A L S M N D V R D R F
10561/3521 10591/3531
TCCGCGCCTTCAAGGACGTGCTCAAGCCCGAGACGCAAACAGGAATGCATGCTCACCACA
R A F K D V L K P E T Q T G M H A H H N
10621/3541 10651/3551
ACCTGAGCCTGGGTGTGGCCAACAGCATCGTTGCTGTAGAGAACGGCTGCGACCGCGTGG
L S L G V A N S I V A V E N G C D R V D
10681/3561 10711/3571
ACGCGAGCCTCGCCGGCATGGGCGCTGGCGCTGGCAACGCACCGTTGGAGGTGTTTCATTG
A S L A G M G A G A G N A P L E V F I A
10741/3581 10771/3591
CCGCGGCCGAGCGCATGGGATGGAACCACGGCACCGACCTGTACAAGCTAATGGACGCGG
A A E R M G W N H G T D L Y K L M D A A
10801/3601 10831/3611
CCGACGACTTGGTGCGCCCGCTGCAGGACCGCCCTGTTTCGCGTGGACCGCGAGACGCTGG
D D L V R P L Q D R P V R V D R E T L A
10861/3621 10891/3631
CCCTGGGGTATGCGGGCGTTTACAGCAGCTTCTGCGCCATAGCGAGATGGCGGCCAGTA
L G Y A G V Y S S F L R H S E M A A S K
10921/3641 10951/3651
AATATGGGCTCAAGACGGTGGATATTCTTGTCGAACTCGGACGTCGGCGGATGGTTGGCG
Y G L K T V D I L V E L G R R R M V G G
10981/3661 11011/3671
GCCAGGAAGACATGATCATTGACGTGGCACTCGATCTGCTCAAGCAGCAGGAGCACGAGC
Q E D M I I D V A L D L L K Q Q E H E R
11041/3681 11071/3691
GTATCCGTTCCGAGCCGGTATCCAGGGAGGCGAACTGAACGGAGCATCACATCACTATTG
I R S E P V S R E A N O P A
ATACGCATCAGCCCGAAGCCAATGTAGCGTAGCTCCATTGGCTTGCCTATTTTCGCGTTCA
CCGCCCCCTCGAGAAACGAGCCCAGTACTATTTTCAGGTCGTCCGTAGTTGCTCATCAAAA
AAGTATTCTCAGGATGATACGAGGGCGTATGATCTATAATGAATCCGTCAGAATCTTGTG
11281/3761 11311/3771
AGTCATTAAAGATGAGCTCCTTGGATAGAAAAAGCCTCAAAATAGATCGAAAAATAATT
tods M S S L D R K K P Q N R S K N N Y
11341/3781 11371/3791
ATTATAATATCTGCCTCAAGGAGAAAGGATCTGAAGAGCTGACGTGTGAAGAACATGCAC
Y N I C L K E K G S E E L T C E E H A R
11401/3801 11431/3811
GCATCATATTTGATGGGCTCTACGAGTTTGTGGGCCTTCTTGATGCTCATGGAAATGTGC
I I F D G L Y E F V G L L D A H G N V L
11461/3821 11491/3831

TTGAAGTGAACCAGGTCGCATTGGAGGGGGGGCGGGATTACTCTGGAAGAAATACGAGGGA
 E V N Q V A L E G G G I T L E E I R G K
 11521/3841 11551/3851
 AGCCATTCTGGAAGGCGCGTTGGTGGCAAATTTCAAAAAAACCGAGGCGACCCAAAAGC
 P F W K A R W W Q I S K K T E A T Q K R
 11581/3861 11611/3871
 GACTTGTGAAACTGCATCATCCGGTGAATTTGTTTCGCTGTGATGTTGAGATTCTTGGAA
 L V E T A S S G E F V R C D V E I L G K
 11641/3881 11671/3891
 AATCAGGTGGAAGAGAGGTAATATCGGTTCGATTTTTTCATTGCTGCCAATTTGCAATGAAG
 S G G R E V I S V D F S L L P I C N E E
 11701/3901 11731/3911
 AAGGGAGCATTGTTTACCTTCTTTCGCGGAAGGGCGCAATATTACCGATAAGAAGAAAGCCG
 G S I V Y L L A E G R N I T D K K K A E
 11761/3921 11791/3931
 AGGCCATGCTGGCGTTGAAGAACCAGGAATTGGAGCAGTCGGTTGAGTGTATCCGAAAAC
 A M L A L K N Q E L E Q S V E C I R K L
 11821/3941 11851/3951
 TCGATAATGCGAAGAGTGATTTCTTTGCCAAGGTGAGCCATGAGTTGCGCACTCCGCTGT
 D N A K S D F F A K V S H E L R T P L S
 11881/3961 11911/3971
 CTTTGATTCTAGGCCACTGGAAGCCGTTATGGCGGGCAGAGGCTGGGCGTGAATCGCCGT
 L I L G H W K P L W R A E A G R E S P Y
 11941/3981 11971/3991
 ATTGGAAGCAGTTTGAGGTCATTCAGCGTAATGCAATGACCCTGTTGAAACAGGTTAACA
 W K Q F E V I Q R N A M T L L K Q V N T
 12001/4001 12031/4011
 CGCTGCTTGACTTGGCGAAAATGGACGCCCGGCAGATGGGGCTTTCCTATCGGCGAGCCA
 L L D L A K M D A R Q M G L S Y R R A N
 12061/4021 12091/4031
 ATCTTAGTCAGCTCACCCGTACTATTAGCTCGAATTTTGAAGGAATAGCCCAGCAAAAAT
 L S Q L T R T I S S N F E G I A Q Q K S
 12121/4041 12151/4051
 CAATAACGTTTCGATACAAAACCTGCCTGTACAGATGGTTCGCTGAGGTGGATTGTGAGAAAT
 I T F D T K L P V Q M V A E V D C E K Y
 12181/4061 12211/4071
 ACGAACGCATTATCCTTAACTTGCTTTCCAATGCGTTTAAATTCACCCCTGACGGGGGGC
 E R I I L N L L S N A F K F T P D G G L
 12241/4081 12271/4091
 TTATCCGTTGCTGTCTTAGTTTGAGTCGACCAAATTATGCCTTGGTTACTGTATCTGATA
 I R C C L S L S R P N Y A L V T V S D S
 12301/4101 12331/4111
 GCGGGCCGGGTATTCCTCCTGCACTGCGTAAAGAAATATTTGAACGTTTCCACCAGCTAA
 G P G I P P A L R K E I F E R F H Q L S

A N P A F Q R I T G Y G E K D L E G L S
 13261/4421 13291/4431
 CCATGGAGCAATTGACTCCATCTGACGAAAGCCCACAGATAAAGCAGCGTCTGGCCAATT
 M E Q L T P S D E S P Q I K Q R L A N L
 13321/4441 13351/4451
 TGCTTCAGGGTGGGGGAGCGGAATACAGTGTGGAGCGCTCCTATCTATGCAAAAATGGTT
 L Q G G G A E Y S V E R S Y L C K N G S
 13381/4461 13411/4471
 CTACGATTTGGGCCAATGCGAGTGTCTCGCTGATGCCTCAACGTGTCGGTGAATCTCCAG
 T I W A N A S V S L M P Q R V G E S P V
 13441/4481 13471/4491
 TTATACTGCAGATCATCGATGACATCACTGAGAAGAAACAAGCACAGGAAAATCTTAACC
 I L Q I I D D I T E K K Q A Q E N L N Q
 13501/4501 13531/4511
 AATTGCAGCAACAACCTTGTGTACGTTTCCCGATCAGCTACGATGGGTGAATTTGCAGCCT
 L Q Q Q L V Y V S R S A T M G E F A A Y
 13561/4521 13591/4531
 ATATTGCACACGAGATAAACCAACCGCTCTCGGCGATCATGACCAATGCCAATGCTGGCA
 I A H E I N Q P L S A I M T N A N A G T
 13621/4541 13651/4551
 CACGTTGGTTAGGTAATGAGCCATCTAACATCCCAGAGGCTAAAGAGGCACTGGCTCGCA
 R W L G N E P S N I P E A K E A L A R I
 13681/4561 13711/4571
 TTATCCGAGATTCCGACCGCGCTGCAGAAATTATCCGTATGGTACGCTCCTTCCTGAAGC
 I R D S D R A A E I I R M V R S F L K R
 13741/4581 13771/4591
 GTCAAGAAACGGTGCTGAAACCGATTGATCTAAAAGCACTGGTAACTGATACAAGCCTGA
 Q E T V L K P I D L K A L V T D T S L I
 13801/4601 13831/4611
 TACTTAAGGCCCTAGTCAGAATAACAGTGTCAATTTGGATGTTGTTGCGGATGATGAAC
 L K A P S Q N N S V N L D V V A D D E L
 13861/4621 13891/4631
 TCCCTGAGATATGGGGGGATGGTGTACAGATCCAGCAGTTGATAATAAATCTGGCTATGA
 P E I W G D G V Q I Q Q L I I N L A M N
 13921/4641 13951/4651
 ACGCTATTGAAGCGATCAGCCAAGCCGACTGTGAAACCAGGCAGCTAACCTGTCATTCT
 A I E A I S Q A D C E T R Q L T L S F S
 13981/4661 14011/4671
 CAGGCAATGATACAGGTGATGCGCTTGTTATCTCAGTGAAAGATAACAGGTCCAGGTATTT
 G N D T G D A L V I S V K D T G P G I S
 14041/4681 14071/4691
 CAGAGAGGCAGATGGCGCAGTTGTTCAACGCATTCTACACCACAAAAAAGAAGGGCTTG
 E R Q M A Q L F N A F Y T T K K E G L G
 14101/4701 14131/4711

GTATGGGATTGGCAATCTGTCTTACAATCACGGAAGTGCATAACGGTAAAATATGGGGTTG
 M G L A I C L T I T E V H N G K I W V E
 14161/4721 14191/4731
todT
 AGTGCCCGCCCGCTGGGGGTGCTTGTTCCTGGTAAGTATCCCTGCCAGACAGGGCTCCG
 M P A R W G C L F P G K Y P C Q T G L R
 C P P A G G A C F L V S I P A R Q G S G
 14221/4741 14251/4751
 GCACATGAGTGATCGGGCATCTGTTATCTATATCCTCGATGACGACAATGCAGTACTGGA
 H M S D R A S V I Y I L D D D N A V L E
 T
 14281/4761 14311/4771
 AGCACTGAGCAGCTTGGTGC GTTCAATCGGCCTGAGTGTCGAGTGTTTTTCATCCGCTAG
 A L S S L V R S I G L S V E C F S S A S
 14341/4781 14371/4791
 CGTATTCCTGAACGATGTCAATCGCTCTGCCTGTGGCTGTCTAATTTTGGATGTCCGTAT
 V F L N D V N R S A C G C L I L D V R M
 14401/4801 14431/4811
 GCCCGAGATGAGCGGGTTGGATGTGCAACGACAACACTGAAAGAGCTTGGCGAGCAAATCCC
 P E M S G L D V Q R Q L K E L G E Q I P
 14461/4821 14491/4831
 CATTATTTTTATCAGCGGCCACGGTGATATTCCGATGGCAGTCAAAGCGATCAAGGCGGG
 I I F I S G H G D I P M A V K A I K A G
 14521/4841 14551/4851
 TCGGGTAGACTTCTTCACTAAACCTTTTCGAGAAGAGGAGCTGCTTGGCGCTATTCGCGC
 A V D F F T K P F R E E E L L G A I R A
 14581/4861 14611/4871
 CGCGCTGAAGTTGGCGCCCCAGCAGAGATCAAACGCTCCCCGAGTCAGCGAGCTTAAAGA
 A L K L A P Q Q R S N A P R V S E L K E
 14641/4881 14671/4891
 GAATTACGAAAGCCTCAGCAAACGCGAGCAACAGGTGCTTAAGTTCGTCTTGCGAGGATA
 N Y E S L S K R E Q Q V L K F V L R G Y

 14701/4901 14731/4911
 TCTAAACAAGCAGACGGCTCTAGAGCTTGATATATCGGAAGCAACAGTGAAAGTGCACCG
 L N K Q T A L E L D I S E A T V K V H R
 14761/4921 14791/4931
 CCATAATATCATGAGGAAAATGAAAGTATCTTCAATCCAGGATCTGGTTCGAGTAACTGA
 H N I M R K M K V S S I Q D L V R V T E
 14821/4941 14851/4951
 GCGGCTCAAGGATAGCCTGGAATAGTCGTAGTTCTTCATGGCATGTGAAAAGCATGCCAT
 R L K D S L E
 GAAGAATAGGCCAATACCATGCCAGAGTGGCTACTCTGGCATGGTTTTCGTGGTCAACCAA

ATGTTGGATTGCTTATCTCCTTCACGTTTCAGGCTCAAAAATCCTTTTTGCGGAAGTTGTC

GTGGATGGCGTCGAACCGTTGCTTGGTGGTGTATAGCATGTGGCCCGGCGACATGAACTT

GGCCTCCATGATCGATTTCTTGATATTCTGGTAATTGAGCCAGATCGCCGAAATTGCCGT

GGACGGAGACCCGGATAATACGGGTCTCCAAAAAAGCATTCTTA 15167

TABLA 3. Componentes del operón tod, función y homología

| Gen | Proteína | Homol | Acceso | Identidad | Función/ organismo |
|-------|--|-------|----------|-----------|---|
| todX | Prot. de membrana | PorA | AJ000330 | 43/ 62 | Prot. memb, catabol. estireno/ P. sp Porina esp. tolueno/ P. putida pWW0 Prot. memb. ext., cat. cimeno/ P. putida |
| | | XylN | D63341 | 40/ 63 | |
| | | CymD | U24215 | 32/ 55 | |
| todF | 2-hidroxi-6-oxo hepta,2,4-dienoatohidrolasa | DmpD | X52805 | 65/ 80 | HMSH/ P. putida |
| | | IpbD | AF006691 | 65/ 82 | HOMDH/ P. putida |
| | | XylF | M64747 | 62/ 78 | HMSH/ pWW0 P. putida |
| todC1 | Tolueno dioxigenasa, sub.α | BedC1 | L04642 | 92/ 97 | Componente dioxigenasa, deg. benceno/ P. putida ML2 Componente dioxigenasa, deg. benceno/ P. putida Dioxigenasa, deg. tri-clorobenceno/ P. sp. Dioxigenasa, sub. α/ Burkholderia sp. Toluato 1,2 dioxigenasa PWW0 P. putida |
| | | BnzA | M17904 | 97/ 97 | |
| | | TcbAa | U15298 | 88/ 94 | |
| | | TecA1 | U78099 | 87/ 93 | |
| | | XylX | M64747 | 37/ 55 | |
| todC2 | Tolueno dioxigenasa, sub. β | BnzB | M17904 | 100/ 100 | Comp. Dioxigenasa, deg. benceno/ P. putida Comp. Dioxigenasa, deg. benceno/ pHMT112 P.p.ML2 Dioxigenasa, sub. peq./ Burkholderia sp. Isopropilbenceno dioxigenasa, subunidad/ R. erythropolis |
| | | BedC2 | L04642 | 90/ 94 | |
| | | TecA2 | U78099 | 89/ 93 | |
| | | IpbA2 | U24277 | 77/ 86 | |

| | | | | | |
|-------------|---|-------|----------|----------|---|
| <i>todB</i> | Tolueno dioxigenasa | BnzC | M17904 | 98/ 99 | Benceno dioxigenasa/ P. putida |
| | | BedB | L04642 | 94/ 98 | Benceno dioxigenasa/ P. putida pHMT112 |
| | | TecA3 | U78099 | 89/ 95 | Dioxigenasa,ferredoxina Burkholderia sp. |
| | | CumA3 | D37828 | 49/ 66 | Cumeno dioxigenasa, ferred/ P. fluorescens |
| | | BphA3 | D32142 | 67/ 80 | Difenildioxigenasa, ferred./ Rhodococcus sp |
| <i>todA</i> | Tolueno dioxigenasa | BnzD | M17904 | 100/ 100 | Dioxigenasa, red. P. putida |
| | | BedA | L04642 | 81/ 88 | Dioxigenasa, red. P. putida |
| | | TecA4 | U78099 | 80/ 87 | Dioxigenasa, red. pHMT112/Burkholderia sp |
| | | RedA2 | AJ002606 | 52/ 65 | Dioxigenasa, red. / Sphingomonas sp. RW1 |
| | | NirB | D30689 | 29/ 48 | Nitrato reductasa / B. subtilis |
| | | NasC | L27431 | 29/ 45 | Nitrato reductasa / K. pneumoniae |
| <i>todD</i> | Tolueno dihidrodiol Deshidrogenasa | BnzE | M17904 | 97/ 97 | cis-bencenglicoldes-hidrogenasa / P. putida |
| | | TcbB | U15298 | 89/ 94 | Clorobenceno glicol deshidrogenasa/ P. sp. |
| | | IpbB | U53507 | 58/ 77 | Isopropilbenceno dihi- drodioldeshidrogenasa/ P. sp. JR1 |
| <i>todE</i> | 3-metilcatecol-dioxigenasa | IpbC | U24277 | 67/ 77 | 3-isopropil catecoldio- xigenasa/R.erythropolis |
| | | BphC | U27591 | 61/ 74 | Difenil dioxigenasa. Rhodococcus sp. |
| | | EdoA | L77225 | 52/ 68 | Extradiol dioxigenasa. Rhodococcus rhodochrous |
| | | XylE | X60704 | 37/ 62 | Catecol dioxigenasa/ pWW0 P. putida |
| <i>todG</i> | 2-hidroxi-penta-2,4-dienoato hidratasa | BphE | D16407 | 85/ 91 | HMSD/P. sp.KK102 |
| | | MhpD | Y09555 | 53/ 68 | KPH/ E. coli |
| | | AtdE | AB008831 | 40/ 56 | OPDH/ Acinetobacter sp. |

| | | | | | |
|-------------|---------------------------------|-----------|----------|--------|--|
| | | AtdH | AB008831 | 40/ 58 | OCDC/ Acinetobacter sp. |
| | | XylI | M94186 | 38/ 53 | OCRD/ pWW0 P. putida |
| | | XylJ | M64747 | 36/ 54 | HPDH, pWW0 P. putida |
| | | DmpE | X60835 | 34/ 54 | HPDH, catabolismo de dimetilfenol/ P. putida |
| | | AFGP | U43200 | 23/ 32 | Glicopéptido anticongelante/ B.saida |
| <i>todI</i> | Acil-aldehído deshidrogenasa | BphG | D16407 | 82/ 88 | HMSD/ P. sp. |
| | | MhpF | Y09555 | 75/ 81 | AAD/ E. coli |
| | | DmpF | X60835 | 71/ 81 | AAD/ P. putida |
| | | XylQ | M94186 | 71/ 81 | AAD/ PWW0 P. putida |
| | | CRR1 prot | Y10265 | 58/ 66 | Regulador/ Metarhizium anisopliae |
| | | IgG3 | U63638 | 33/ 53 | Cadena pesada/ Bos taurus |
| <i>todH</i> | 4-hidroxi-2-oxovaleratoaldolasa | BphF | D16407 | 84/ 90 | HOVA/ P. sp |
| | | DmpG | X60835 | 80/ 87 | HOVA, deg. dimetilfenol / P. putida |
| | | MhpE | AE000142 | 79/ 87 | HOVA/ E. coli |
| | | XylK | M94186 | 78/ 86 | HOVA, deg. tolueno/ pWW0 P. putida |
| | | CmtG | U24215 | 72/ 83 | HOVA, deg. cumeno/ P. putida |
| <i>todS</i> | Histidin cinasa | TutC | U57900 | 57/ 73 | Proteína sensora, util. de tolueno/ Thauera T1 |
| | | StyS | AF024619 | 53/ 72 | Cinasa híbrida. P. fluorescens |
| | | StyS | AJ000330 | 52/ 71 | Cinasa-sensor de estireno/ P. sp |
| | | DhkD | AF029704 | 46/ 65 | Cinasa híbrida/ D. discoideum |
| | | CyaC | D89625 | 43/ 67 | Adenilato ciclasa/ Anabaena sp. |
| <i>todT</i> | Regulador | TutB | U57900 | 53/ 72 | Proteína de unión a ADN/ Thauera T1 |
| | | StdR | AF031161 | 49/ 69 | Activador transcripcional/ P. sp. |
| | | StyT | AJ000330 | 49/ 69 | Reg. De respuesta a estireno/ P. sp. |
| | | NodW | M31765 | 46/ 69 | Proteína de nodulación/ B. japonicum |
| | | FixJ | X56658 | 41/ 67 | Proteína reg transcripcional/ A. caulinodans |
| | | DctR | X64733 | 36/ 64 | Regulador de respuesta/ R. capsulatus |

Abreviaturas:

| | |
|-------|--|
| HOHH | 2-hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienoato hidrolasa |
| HMSH | 2-hidroximucónico, semialdehído deshidrogenasa |
| HOMDH | 2-hidroxi-6-oxo-7-metilocta-2,4-dienoato hidrolasa |
| HPDH | 2-hidroxi-penta-2,4-dienoato hidratasa |
| OPDH | 2-oxopenta-4-dienoato hidratasa |
| OCDC | 4-oxalocrotonato descarboxilasa |
| AAD | Acil aldehído deshidrogenasa |
| HMSD | 2-hidroximucónico semialdehído deshidrogenasa |
| HOVA | 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa |
| KPH | 2-cetopentenoato hidratasa |

(*) Porcentage de identidad de proteína / porcentage de residuos positivos.

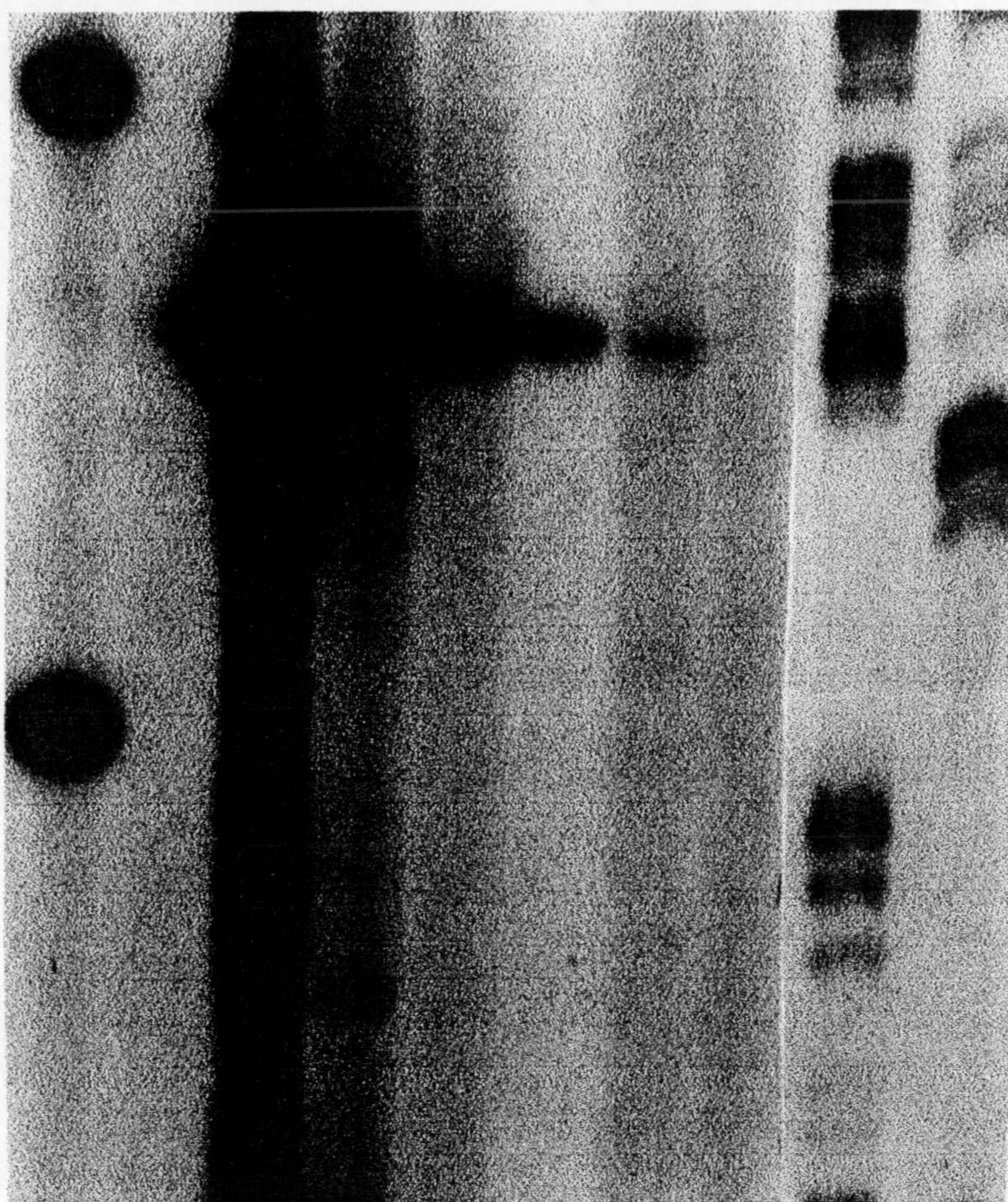


Figura 12. Sitio de iniciación de transcripción del operón *tod*. RNA total se aisló de células de *P. putida* DOT-T1E cultivadas a 30° C en succinato (calle 6), y succinato mas cada uno de los siguientes hidrocarburos aromáticos suplementados en fase gaseosa: tolueno (1), etilbenceno (2), estireno (3), *m*-xileno (4) o benceno (5), M corresponde al marcador de peso molecular tipo -VIII de Boehringer y C y G corresponden a parte de la secuencia del ADN en la región cercana al sitio de iniciación de transcripción.

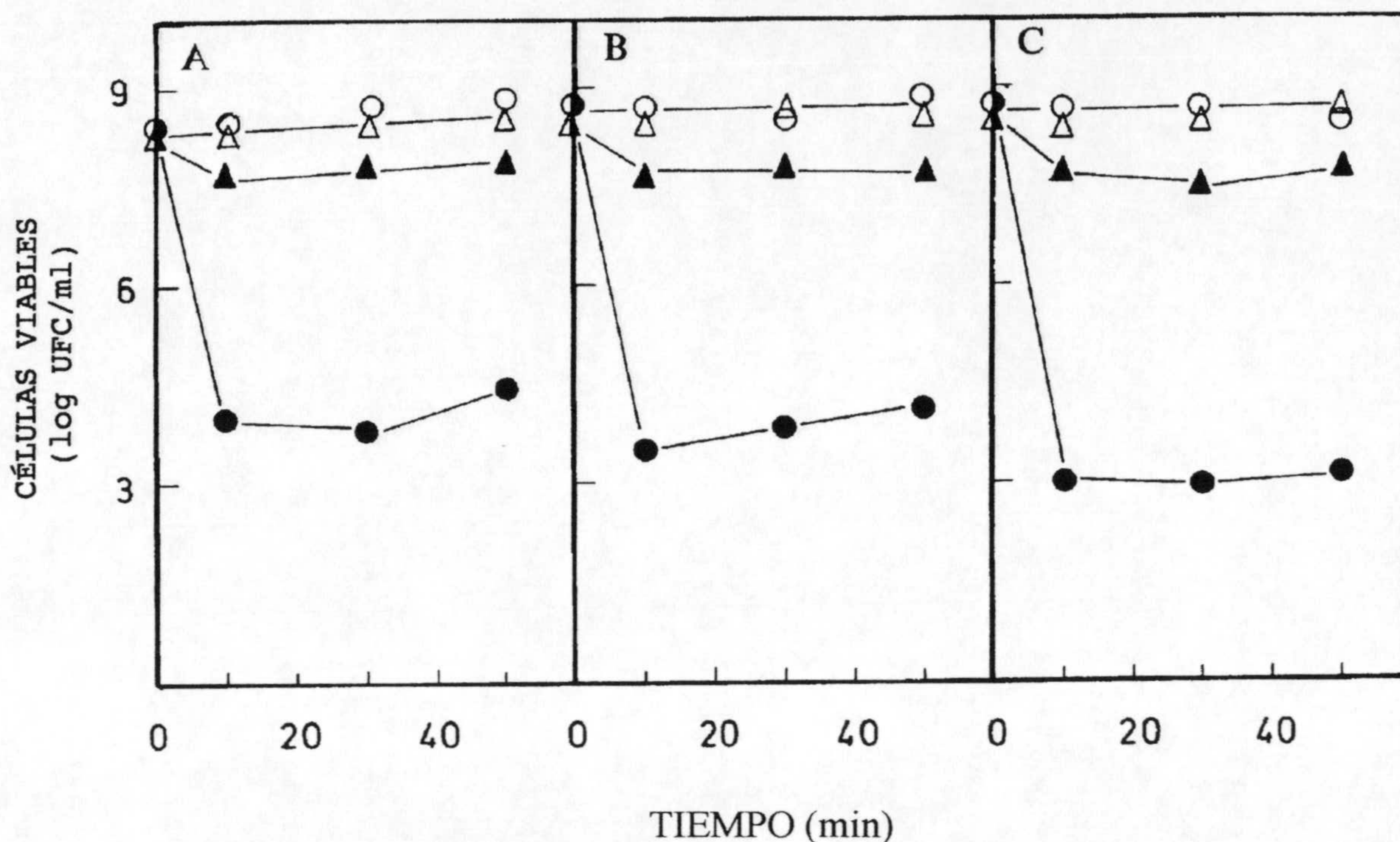


Figura 13. Sobrevivencia a tolueno de las cepas de *Pseudomonas putida* DOT-T1E silvestre y las mutantes en genes de la ruta. Cultivos en LB de toda la noche de las cepas *P. putida* DOT-T1E (A), C5AR5 (B) y G7(C). Se diluyeron 100 veces en medio LB (círculos) o en LB más tolueno en fase de vapor (triángulos). Estos cultivos se incubaron hasta alcanzar la fase exponencial (turbidez a 660 nm de 0,7). Posteriormente se prepararon dos alícuotas, una se guardó como control (símbolos abiertos) y a otra se adicionó 0,3% (v/v) de tolueno (símbolos cerrados). La sobrevivencia se midió por conteo de las unidades formadoras de colonia (CFU) en los tiempos indicados.

Figura 14. Secuencia del operón *ttgDEF* y regiones adyacentes.

1
GgggggggAAGGgggGGgGAGgTGTTATTTTAGGGGGGAGAGGGGgGATTTCTCAGTTTTG
61
CATAATTgCCgCGCCTTTGTGAACCTCTAATTACCACTGACTCTATCCGGGCTTTGCCCCG
121
TTAGACCATCAGTGGGCATTAAGgGTCGACATGCTTGTCATCGATTGGGCACCTGACTTT
181
CCCTGCGATTGGTCCCCCTAAACCCGTGCAGGGTAACAGCCTTgGGCCTTAAGATTACCC
241/81
TCTGCCCCACATTAGGCGAAGCGCACCCGATGAATCGAAACGACCTGCGTCGTGTAGACCG
271/91
ttgS M N R N D L R R V D R
301/101
CAACCTGCTGATCGTGTTTCGAAACGCTGATGCACGAGCGCAGCGTGACCCGTGCCGCAGA
331/111
N L L I V F E T L M H E R S V T R A A E
361/121
AAAACCTGTTTCTCGGCCAACCGGCCATCAGCGCGGGCGCTGTCGCGCCTGCGTAACCTGTT
391/131
K L F L G Q P A I S A A L S R L R N L F
421/141
CGATGACCCGTTGTTTCGTGCGCACAGGGCGCAGCATGGAGCCGTCGGCACGGGCCACGA
451/151
D D P L F V R T G R S M E P S A R A H E
481/161
GATCTTCGCCCTGCTGTCACCGGCACTGGATTTCGATTTCCACGGCAGTCAGCCGCGCCGC
511/171
I F A L L S P A L D S I S T A V S R A A
541/181
CGAATTCGACCCGGCCACCAGCAATGCGGTGTTCCGCATCGGCCTGTCGGACGACGCCGA
571/191
E F D P A T S N A V F R I G L S D D A E
601/201
GTTGCGCTTGCTGCCGCAACTGCTCAAGCGCATTTCGCGCCGAGGCGCCCGGTATCGTGCT
631/211
F A L L P Q L L K R I R A E A P G I V L
661/221
GGTGGTGCGACGGGTCAACTACTTGCTGATGCCAACCCCTGCTGGCCTCGGGCGAGATTTTC
691/231
V V R R V N Y L L M P T L L A S G E I S
721/241
GGTGGGGGTCAGCTACACCAGCGAACTGCCGGCCAACGCCAAGCGCAAGGTGCTGCGCCG
751/251
V G V S Y T S E L P A N A K R K V L R R
781/261
CAGCATGCCGAAACTGCTGCGCGCCGACAGCGTACCCGGCAGCATCACCTGGATGACTT
811/271
S M P K L L R A D S V P G S I T L D D F
841/281
CTGCGCCCGCCCCCATGCGCTGGTGTCGTTTGGCCGGGGACTTGTCCGGGTTTCATCGACGA
871/291

C A R P H A L V S F A G D L S G F I D E
 901/301 931/311
 AGCCCTGGAAGAAATCGGCCGCAAGCGCCACGTGGTGCTGGCGGTACCGCAGTTCAACGG
 A L E E I G R K R H V V L A V P Q F N G
 961/321 991/331
 GCTGGGGAGCTTGCTGGCAGGTACCGATATCGTGGCGACGGTACCGGACTACACGGCGGA
 L G S L L A G T D I V A T V P D Y T A D
 1021/341 1051/351
 TGCCTGACGGCCGCGGGCGGCTTGCGGGCCGAGGATCTGCCGATACCCGTGCGCAGTTT
 A L T A A G G L R A E D L P I P V R S F
 1081/361 1111/371
 CGAACTGCACATGGCCTGGCGGGGGGCACAGGACAATGACCCGGCGGAGCGGTGGCTGCG
 E L H M A W R G A Q D N D P A E R W L R
 1141/381 1171/391
 GTCGCGGATACAGATGTTCTTTGGGGATCCCGATAGTCTTTGACTGAGTTCCACTGAGCA
 S R I Q M F F G D P D S L OPA

CCACAAAACCTTTAAATACATAGAGTTAGCAAGATTTTTTCGTCCATAACCGCCCGTCAGA
 ATCCACTCAATTCCAGCTTGACTGGGGGTATCTTTGGGGTACATCAAGCCCAGATTA
 AAGATACCCCCACACCATGCCCGCCGAAAAACCGCCACCCTTCCGCCAAAAGCTCAGCGA
 TGCCTTCATACGTTTCGCTAACCACATCAGGCAAGTACGCCGATGGCGACGTACCGGGTCT
 GTATCTACAGGTGCGTGCCTCACTTAAACCTGGCAAATCAGCCTCACGGTACTGGCGACT
 GAAATACCGTCTTCGCGGCAAGGAAAACGTGTTTCGTGATCGGCAGGTATCCGGATGTGGG
 CTTGAAAGAAGCCCGTGAACCTCGCCCGGGCAGCGCGCAATAgCGTGGCCAATCACATCGA
 TCCACTCAAAGCAAAAAAGGCCAAGATCGAAGCGCAATGGCTCAACGAAGAACGTACATT
 CgCTTACGTGGCTAAATCTCCGGATTTGGTCAACAAGTCCATTGCAGGGTTTCGCGgTGC
 GCTGCGCAATCACATCTTGCCGGCCATCGGCCGAAAAACCTGTACAGAAATCAGACTTGA
 ACACCTCACCTCGATCATCAGTACGCTGCGCCGTGCCCGCACGATGGCCATGGCCAAACG
 CGTGCGCACCATCATTTCGCGCCGTGCTCGGCTTCGCTGAAGGCCGCGGCTGGGTAGAACG
 CAACGTGGCGCTGAGCAACATCGAGGAACTCAAATCCGCCACGTGGTCACCAGCAATCC
 CGCGATCGAACGACCGGCCGACTTGGGTGAGTTCCTGTTGCGTCTGGATGAACTCGACGC
 GAGCAGCGTGACCACCGCAATGCGCCTGCTGGTGATGCTGCCGGTGCGCCCGGGCGAACT
 GGTGAAAATGCGCTGGGAGGATGTTGATCTGATCAGCGCCGACTGGCGTTACGTTGTCAG
 TAAACTCGGTATCTGGACAAGAGCAAACACATCGTACCGCTGCCAGAGCAGGCACTCGT
 GCTGCTACGTGAACTGTACAAATGCCGGGTGGTGGATGAGGCCGGCAACGGCTGGGTGTT
 CGTCTCGCCGATCTATCCTGGCCGCCCAATCGACGCCACCTCTTTGGCCAAGTCCTACCA
 GCGGATCTGGCCGGAGTACGCCATTACTGCCACGGCTTTCGCGCCACCTACCGCACCAT
 AGCCACGAGCATTAGGGATCGATCCGATCGTGCTCGAGTTGTCACCTTCCCATCGCAT
 GCCAGGAACGTTGGGCGCGGTATATGCGCGCGCACAGCTGCTGCCGCAGCGTCGGGAGGC
 CGCGCAGCAATGGACGGATTATTTGGATCGGTTACGTAAGAATGCAGCGCTGGCGATGCA
 GACTGACTGAATCAAACAAAGGAAGTGCTAACTTGTAATCTAGGAAATAGAATCTGgGC
 TTGTATGAACACACCAGGGTTTGTAACTACAACCTCCAGAATCTTATTACAAGCgATCT
 AATTAACGACCAATAAGCCCAAAAAACCTTAACCCCCACAATTGCTAGAACCTGATAG
 TTAAATCTTATCCGACCTCACAAGATTAAACTCGAACTTATAATACGCTAAACGTAATAA

ATAATACAGTTTCATTTATACACCTCGCGAAGCGCCGTTTGCGCTCAGTTTTCTTGCGCA
AAACACACCTGCCATCGCAGACCGCCTATTTATCTGCCTGGCTGCAACTGCGCTATGGTC
CTGCGCTCAGTAAAGGCGTTCTAACGCCAAGAGTTGCCGTGCAGTTCATTGTCGAGCATT
AGGCCCGCCCCAACGGCGCTGGCGGGTGAGCCATTCAGTCCAATTGAGGTTGATACCGC
CCTGGTCGCCGCTGGCTACAAAGGCAAACCTGGTCAGCCATCGCCTCGCCGTCCTCGCCA
AGTGGCATCGAATAGGTGGGCACCATCGCCCTTAATACAGGGACCAGGTAGATACCTTGC
GGAACGCTTACCGATCCCCATCGGGATCGAGCGCTTGCGCGCCCGAGCGGCCAGAAAGTC
CGCCACGTGATGACCAGCAACCCAACGATTGAACGCACCGCCGACTTCGGTCGGCTTCTG
GAACCTGGACGACTGTCGCTTGGGCAGCGTGCCCGCCGCCATGCGCCAGCAAGCCCTCGT
GCTGCTGTGCAAATTGCGCAAGAGCCACATCGTCGATGATAGCGGCGGGCAGGCTGTT
CGTGTCGTCGGCATAACCGGCCGACCGATCCACCCCGCTTgCAAATTCAAGTCCTTCAGCG
GATTTGACTGGAGTACAACATCACCGGTCACGGgTTTgACGCCACATACCGGACTATTAC
CACGAACACTTgGGCATgGACCAATAGTCATTGACTGgCCgTGCGCATTGCATTCCCGAC
CCCCTGAGCGTCCTGCCACCGCGACCGAGAACGTTTGGCGCGATAAGGAGAACTCTCACGGG
ATAGGTAGGCCTGCGCCGAGCAAAAGTCCTCTAATCAACCCGCAAACCTCCCGAGGCGCTC
GACCAATCGTCACCTCAATATTCTGCTTGCATGCCTGAAGCGCCTGCTGGAATTCCGCCA
CCCTAGTGGTTGCTCGTGAATTGGGGGCCACAATGGATACCGAGTAATGCCCAAGATATG
TGTCCAATAGCACGGAGTAGGAGCACAGCCCTTCGATGTATTTCGTCATGGTCGTCCGCCA
CACCACCGGACTTGATCGTCTTCAATTGTTCAAGCAAGGCCTgCCGCGCCACGCTTCTGG
GCGTACACACAGGTAGAGGATCGGGCAACAAAGCTTGTGCGCTTCTTCCGACAATTTCGG
CCAGTAATACCTTGCCGCCGGAACGGCGGTCGCCGGGACATGAATACCAATGGGAAAGA
CGACGCGTAGTTCTCGTTCAGCAACAACACGATCCAGCACATAAATTTTTTCGCCAGACA
GAGACAACAGGCAAGTCGACTCATAACCTGCTCCGAAAGCGCAATCAGGTGAGGCCTGA
CCAGGGAGATGATGTCCGTCTGCGCCTGAGTGATGAGCCGCCCGAATGCCGGCCCAAGAC
GAAACCCTCCACTGGGCCCCAGAGCCTCCACAAGGTGCTCCGCGCCCAACGCATTGATAA
TGCGTTGTACCGTCGAGCGCGGCAGATCGACGACCTGAGCGATGGCCGCAAGACTCAAGC
CCTGCGGATGACTTCCCAAAGCCCGCATGATCGATGCAGCCCGCGCGATGACCTGTATAC
CGCCATGCCTGGCGCTGCTTTCTTCCGAATCGCTCATAACGTTTCTTCTGATCCAGGCC
ACCGTGCCTGCTCATGATTGGCCACCACTCTAATGGCAAGTGAACGATCAGGCCAGCCGA
GCGACTGATCTCTTGTCTCTGCATTTTCTGGGTGCAGGTCAGTCACGCATGGCATGAA
CGGCTGTTTCGCAAAAACCACATAGTGATACTATTCTGCAATGCGGGCCATGCATTGT

4681/1561

4711/1571

GATTCCCAAAGATCAGTTCTACAACCAGGAGACGAACGGTGAGACTCGAGCGAGCTTTG

ttgD

M R L E R A L

4741/1581

4771/1591

CGTGCGAGACAGTTAATTCCGCTAGCAGCCATCTGGTTGCTGGTGGGTTGCGGTAAGCAG

R A R Q L I P L A A I W L L V G C G K Q

4801/1601

4831/1611

GAAACGGTGGAAAGCACTGCGGGTGCCTCCCGAAGTTGGGGTCTATACCGTGAAGGCCCAA

E T V E S T A V P P E V G V Y T V K A Q

4861/1621

4891/1631

GCACTGACCCTGACCACGGACCTGCCCGGACGCACCTCGGCCTACCGAGTCTCCGAAGTG

A L T L T T D L P G R T S A Y R V S E V

4921/1641

4951/1651

CGTCCTCAGGCCTCCGGCATTCTGCAGAAACGCATGTTTCGTAGAGGGCGCAGAGGTGAAG
 R P Q A S G I L Q K R M F V E G A E V K
 4981/1661 5011/1671
 CAGGGTGAGCAGTTGTACCAGATCGACCCGCGCACCTACGAGGCGCTGTTGGCCCGTGCC
 Q G E Q L Y Q I D P R T Y E A L L A R A
 5041/1681 5071/1691
 GAGGCGAGCCTGTTGACCGCGCAGAATCTCGCCCGCCGTTATGAGCGCCTGCTCGACACC
 E A S L L T A Q N L A R R Y E R L L D T
 5101/1701 5131/1711
 AACGCGATCAGCCAGCAGCAGTACGACGACGCAATGGCCACCTGGAAGCAGGCGCAGGCC
 N A I S Q Q Q Y D D A M A T W K Q A Q A
 5161/1721 5191/1731
 GAGGCCAGATGGCGCGTATCAACATGCAGTACACCAAGGTGCTGGCACCGATTACCGGC
 E A Q M A R I N M Q Y T K V L A P I T G
 5221/1741 5251/1751
 CGCATCGGGCGTTCGGCCGTCACTGAAGGCGCACTGGTGACCAATGGGCAAGCGCAGGAG
 R I G R S A V T E G A L V T N G Q A Q E
 5281/1761 5311/1771
 TTGGCCACCGTTACCCAACCTCGATCCGATCTATGTTGACGTCAATCAGCCTATCACCAGG
 L A T V T Q L D P I Y V D V N Q P I T R
 5341/1781 5371/1791
 CTGCTGGGCCTCAAACGTGCCTTGGAGTCAGGACGCCTGCAGCGCGTTGGGGATAATCAG
 L L G L K R A L E S G R L Q R V G D N Q
 5401/1801 5431/1811
 GCTCAAGTCAGCCTTACCCTCGATGACGGCACACCCTACCCGCTCAAAGGAGTACTCAAG
 A Q V S L T L D D G T P Y P L K G V L K
 5461/1821 5491/1831
 TTCTCCGAGGTTAGCGTCGCCCCCTCCACCGGCTCGGTCACCCTGCGTGCCGAGTTCCCC
 F S E V S V A P S T G S V T L R A E F P
 5521/1841 5551/1851
 AATCCTGATCACAAACTGCTACCGGGCATGTTTCGTCCATGCACTGCTCAATGAGGGCGAG
 N P D H K L L P G M F V H A L L N E G E
 5581/1861 5611/1871
 CAACAGGCAGCCATTCTGGTTCCCCATCAGGCCGTGGGCCGTGATGCGCGGGGAGTGCCT
 Q Q A A I L V P H Q A V G R D A R G V P
 5641/1881 5671/1891
 ACCGTATGGGTGGTTAAGCCAGATAACACCGTGGAATCGCGTGAAGTGCAAACCTTGCGAG
 T V W V V K P D N T V E S R E V Q T L Q
 5701/1901 5731/1911
 ACCGTAGGCAACGCCTGGTTACTAGGTGCGGGTATCAATGATGGCGAGCGGGTGATTACC
 T V G N A W L L G A G I N D G E R V I T
 5761/1921 5791/1931
 GAGGGCGTCCAGCTGGCCCGCTCAGGTATCAAAGTTAAGCCTGTTGCCGCAAGAACGTC
 E G V Q L A R S G I K V K P V A A K N V

TGACCACCCCTGCCGAATTTGAGGAAATTCTCGTAAAGGTCAAGGCGGATGGTTCACAGG
 T T P A E F E E I L V K V K A D G S Q V
 6661/2221 6691/2231
 TGCGCGTCAAGGATCTTGAccGcGTcGTCCTGGCTTCTGAAAACCTTCGCGATTTCCGCCA
 R V K D L D R V V L A S E N F A I S A K
 6721/2241 6751/2251
 AATACCGAGGTCAGGATTCAGCGGGCCTGGGCCTGGGCCTGCGTCTGGCCAGCGGTGGCA
 Y R G Q D S A G L G L G L R L A S G G N
 6781/2261 6811/2271
 ACCTGCTGGAGACGGTGAAAGCGGTCAAGGCAGAGCTTGAGAAACAGAAGGCCTACCTGC
 L L E T V K A V K A E L E K Q K A Y L P
 6841/2281 6871/2291
 CAGAAGGCGTTGAAGTCATCTATCCATACGATACCTCGCCGGTAGTGGAAGCCTCGATCG
 E G V E V I Y P Y D T S P V V E A S I D
 6901/2301 6931/2311
 ACTCCGTGGTGCACACCATCCTAGAAAGCCGTGGTCCTAGTGTTCTGGTGATGTTCTGT
 S V V H T I L E A V V L V F L V M F L F
 6961/2321 6991/2331
 TCCTGCAGAGCCTACGTGCCACCATCATTCCAACCTTGGCAGTGCCGGTGGTCTTGCTGG
 L Q S L R A T I I P T L A V P V V L L A
 7021/2341 7051/2351
 CGGCGTTTGCATTGCTGCCGTACTTTGGTATCAGCATCAACGTAAGTACTGACCATGTATGCCA
 A F A L L P Y F G I S I N V L T M Y A M
 7081/2361 7111/2371
 TGGTGCTCGCGATCGGCCTGCTGGTGGATGATGCGATCGTAGTCGTGGAGAACGTCGAAC
 V L A I G L L V D D A I V V V E N V E R
 7141/2381 7171/2391
 GCCTGATGCATGACGAGGGGCTATCGCCTCTGGAGGCGACCCGCAAGTCGATGGGGCAGA
 L M H D E G L S P L E A T R K S M G Q I
 7201/2401 7231/2411
 TCTCCGGGGCATTGGTCCGCATCGGTATGGTGCTCTCGGCAGTATTTGTGCCGATGGCAT
 S G A L V G I G M V L S A V F V P M A F
 7261/2421 7291/2431
 TCTTCGGCGGTTCCGCGGGCATCATCTACAAACAGTTCGCTGTCACCATCGTTATCTGCA
 F G G S A G I I Y K Q F A V T I V I C M
 7321/2441 7351/2451
 TGTCGCTGTCAGTATTGGTGGCGCTGATTTTCACGCCAGCGCTGTGCGCGACCATTCTCA
 S L S V L V A L I F T P A L C A T I L K
 7381/2461 7411/2471
 AGGCACCAGAAAATGATGCTCACCACGAGAAGAAAGGCTTCTTCGGCTGGTTCAACCGTA
 A P E N D A H H E K K G F F G W F N R S
 7441/2481 7471/2491
 GCTTTGACCGCAACAGCGCACGCTTCGAGCGGGGTGTGGGCGGCATACTCAAGCATCGCG
 F D R N S A R F E R G V G G I L K H R G

7501/2501
 GGCGCTACCTGCTGATCTTCGCACTGATCACCGCCGGTACTGGTTACCTGTTACCCAAA
 R Y L L I F A L I T A G T G Y L F T Q I
 7561/2521
 TTCCAAGGCTTTCCTGCCAAGCGAAGACCAGGGGTTGATGATGACAGAGGTGCGCATGC
 P K A F L P S E D Q G L M M T E V R M P
 7621/2541
 CACTGAACGCATCCGCCGAGCGCACCGAGGTTGTTCTACAGGAGGTCAAGGACTACCTGC
 L N A S A E R T E V V L Q E V K D Y L L
 7681/2561
 TCAAGGAGGAAGGGCAACTCGTTCGACCACGTCATGACCGTCAACGGCTTCAACTTCGCCG
 K E E G Q L V D H V M T V N G F N F A G
 7741/2581
 GACGCGGACAGAACTCGGGCCTGGTGCTGGTGGTGCTCAAGGACTGGGCCGCCCGCCAGG
 R G Q N S G L V L V V L K D W A A R Q A
 7801/2601
 CTGCCGGAGAGGACGTGCTCAGCGTGGCCGAGCGGGCCAACGCTCGCTTTGCCAGGATCA
 A G E D V L S V A E R A N A R F A R I K
 7861/2621
 AGGACGCTACGGTTATGGCATTTCGTGCCACCCGCGGTCCTGGAAATGGGTAAATGCGATGG
 D A T V M A F V P P A V L E M G N A M G
 7921/2641
 GCTTCGACCTTTACTTTGCAGGACAATTTGGGGCTTGGTCACGAATCACTCATGGCAGCGC
 F D L Y L Q D N L G L G H E S L M A A R
 7981/2661
 GGAACCAGTTCCTGGAAGTGGCTGCCGAGAACCCAGTCTGCGTGCAGTACGCCCAACG
 N Q F L E L A A E N P S L R A V R P N G
 8041/2681
 GCAAGGACGATGAACCGCAGTTTCAAGTCAAGATCGACGACGAGAAAGCGCGTGCGCTGC
 K D D E P Q F Q V K I D D E K A R A L Q
 8101/2701
 AAGTCAGCATCGCTTCGATCAACGACACCATGAGCGCCGCTGGGGCTCGATGTATGTCA
 V S I A S I N D T M S A A W G S M Y V N
 8161/2721
 ATGACTTCATTGACCTGGGTCGGGTCAAGCGTGTGTACATTCAGGGGGTGGACAGCTCGC
 D F I D L G R V K R V Y I Q G V D S S R
 8221/2741
 GGATCGCTCCGGAAGATTTTCGACAAATGGTACGTGCGCAATGCCTTGGGCGAGATGGTGC
 I A P E D F D K W Y V R N A L G E M V P
 8281/2761
 CGTTCTCCGCCTTCGCCACTGGCGAATGGATCCATGGCTCGCCAAAGCTTGAACGTTACG
 F S A F A T G E W I H G S P K L E R Y G
 8341/2781
 GCGGTATCTCGGCCGTGAATATCCTCGGTGAGCCTGCTCCTGGCTTCAGCACTGGCGACG

G I S A V N I L G E P A P G F S T G D A
 8401/2801 8431/2811
 CCATGATCGCGATCGCACAAATCATGCAGCAGCTACCATCCGGTATCGGCCTGAGCTACA
 M I A I A Q I M Q Q L P S G I G L S Y N
 8461/2821 8491/2831
 ACGGCCTGTCCTACGAGGAGATCCGAACAGGTGACCAGGCGCCAATGCTCTATGCCTTGA
 G L S Y E E I R T G D Q A P M L Y A L T
 8521/2841 8551/2851
 CCGTCCTGATCGTGTTCTGTGCCTAGCGGCGCTCTACGAAAGCTGGTCGGTACCGATGT
 V L I V F L C L A A L Y E S W S V P M S
 8581/2861 8611/2871
 CGGTGATACTCGTGGTCCCCTCGGCATCTTTGGTGCGGTGCTCGCCACCTTGTGGCGCG
 V I L V V P L G I F G A V L A T L W R G
 8641/2881 8671/2891
 GCCTGGAAGCCGATGTGTACTTCCAGGTGGGCCTGATGACCACTGTCGGGTTGTCAGCGA
 L E A D V Y F Q V G L M T T V G L S A K
 8701/2901 8731/2911
 AAAACGCGATCCTGATCATCGAGTTCGCCAAGGAACTGTACGAAAAAGAAGGCGTACCGC
 N A I L I I E F A K E L Y E K E G V P L
 8761/2921 8791/2931
 TGGTCAAGGCTGCCATCGAAGCGGCCAGGCTGCGTCTGCGTCCGATCATAATGACCTCTC
 V K A A I E A A R L R L R P I I M T S L
 8821/2941 8851/2951
 TCGCTTTCACCTTTGGCGTACTGCCAATGGCCCGTGCCACCGGCGCAAGTGCAGGCAGTC
 A F T F G V L P M A R A T G A S A G S Q
 8881/2961 8911/2971
 AGCACTCCATTGCCACCGGCGTGGTAAGCGGCATGATCACCGCCACCGTACTTGCCGTGT
 H S I A T G V V S G M I T A T V L A V F
 8941/2981 8971/2991
 TCTTCGTACCTTTGTTCTATGTAGTGGTTGTGAAAGTGTTTCGAACGCAACAGGAAACCAG
 F V P L F Y V V V V K V F E R N R K P A
 9001/3001 9031/3011
 CTGCGCTCGCGGAAGAAGAATTGGCATGAAGACTCACTATCTTTTCGATCGCACTGAGCGT
ttgF M K T H Y L S I A L S V
 A L A E E E L A
 9061/3021 9091/3031
 AGCGCTAAGCGGCTGTAGTCTCATCCCTGACTACCAGCGCCCGCCTGCCCCCATCCAAGC
 A L S G C S L I P D Y Q R P P A P I Q A
 9121/3041 9151/3051
 CGGCTGGCCCCAGGGCGAAGCCTACGCCAAGCTCAAGGCAGGTACTCATCGTCCCTCTCA
 G W P Q G E A Y A K L K A G T H R P S Q
 9181/3061 9211/3071
 GACGCGCGATGCAGAGCTGAATTGGCAAGTATTCTTTTCGCGATCCAGTCATGCGCGAACT
 T R D A E L N W Q V F F R D P V M R E L

F T A G R L R G N L D Y R N V I K D I N
10141/3381 10171/3391
CGTAGCCGAGTACGAGAAAAGCATCCAGACCGCCTTCCGCGAGGTAGCCGATGGCCTGGC
V A E Y E K S I Q T A F R E V A D G L A
10201/3401 10231/3411
AGCGCGCGGCACTTTTGGCGAACAACACTGCAGGCCAGCGCGACTTGGTCGATAACAACCA
A R G T F G E Q L Q A Q R D L V D N N Q
10261/3421 10291/3431
AGCTTACTACAAATTGGCCTATCAACGCTACGACGAGGGCGTGGACAATTATCTGCCGGT
A Y Y K L A Y Q R Y D E G V D N Y L P V
10321/3441 10351/3451
GCTCGATGCACAGCGTGAGCTGTTTCGCCGCACAACAACAGTTCCTTTCGGACCGCCTCAA
L D A Q R E L F A A Q Q Q F L S D R L N
10381/3461 10411/3471
TCAGCTCAGCAGCGAGGTGAGACTGTTCAAGGCCCTGGGTGGTGGCTGGGATAACATTTTC
Q L S S E V R L F K A L G G G W D N I S
10441/3481 10471/3491
CTCCCAGCCACTTACCGCTCAGAACACTGAGCAAAACAGGCCGCGTCTCTAGGACGCGGCC
S Q P L T A Q N
TTCATCGCAACAGTGGAAACCACAGTCAGAC

UNIVERSIDAD DE GRANADA
17 FEB. 2000
COMISION DE DOCTORADO

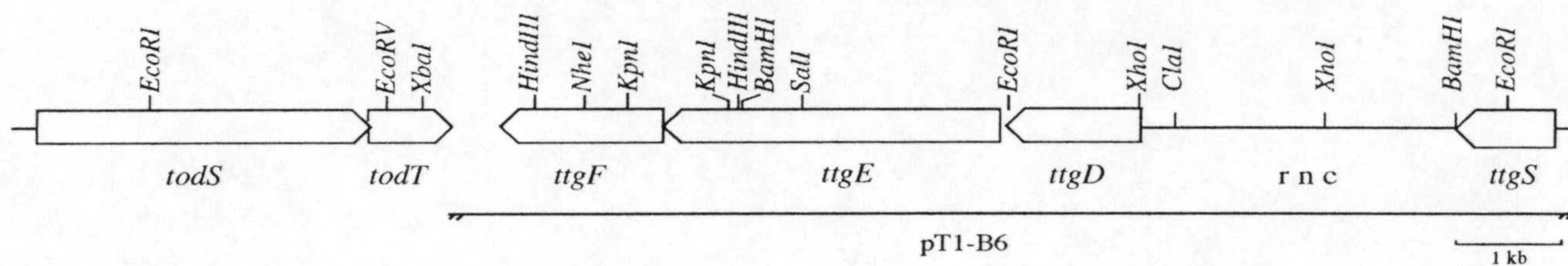


Figura 15. Mapa de restricción y organización de los genes del operón *todST* y los del sistema de eflujo *ttgDEF* así como el gen regulador *ttgS* del plásmido pT1-B6.

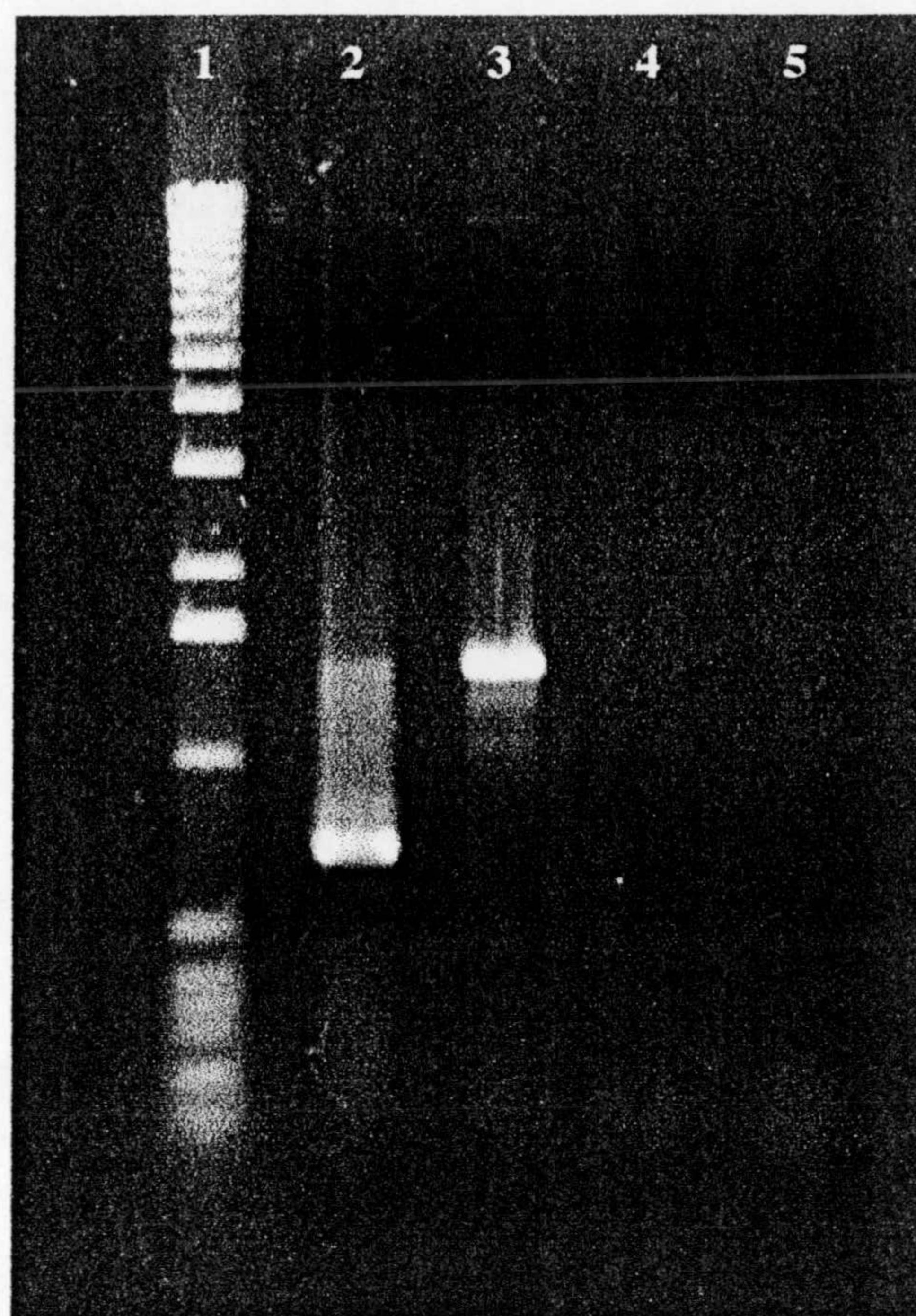


Figura 16. RT-PCR de los genes *ttgDEF* de *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Muestras de ARN total se aislaron de *P. putida* DOT-T1E cultivada en medio mínimo con succinato como fuente de carbono (carriles 4 y 5) y succinato y tolueno en fase gaseosa (carriles 2 y 3). El proceso de aislamiento y las condiciones de amplificación se describen en la sección de Materiales y Métodos. El carril 1 corresponde al marcador de ADN de 1 kb; 2, producto de amplificación de la región entre los genes *ttgD* y *ttgE*; 3, entre *ttgE* y *ttgF*; 4, entre *ttgD* y *ttgE* y 5, entre *ttgE* y *ttgF*.

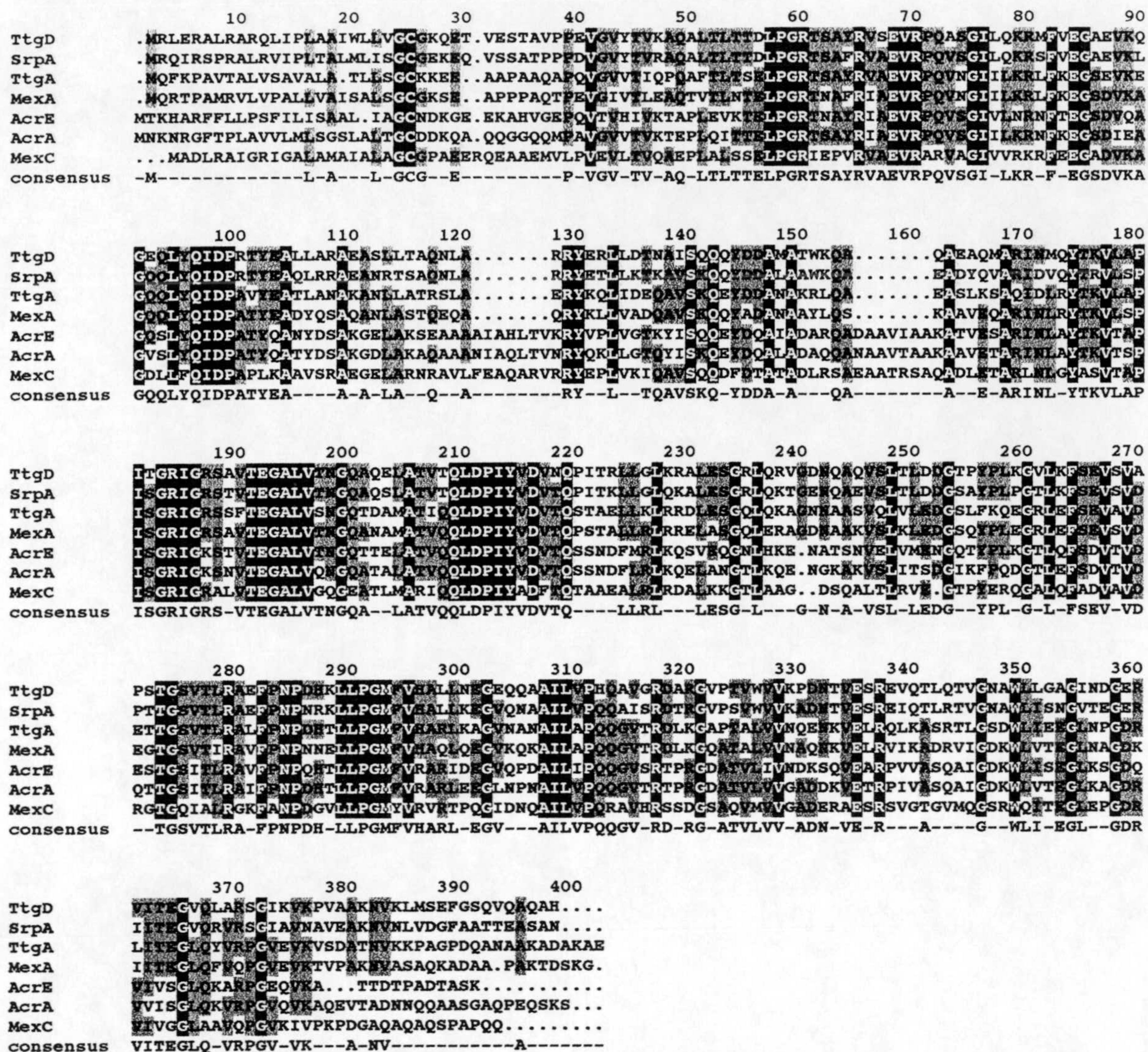
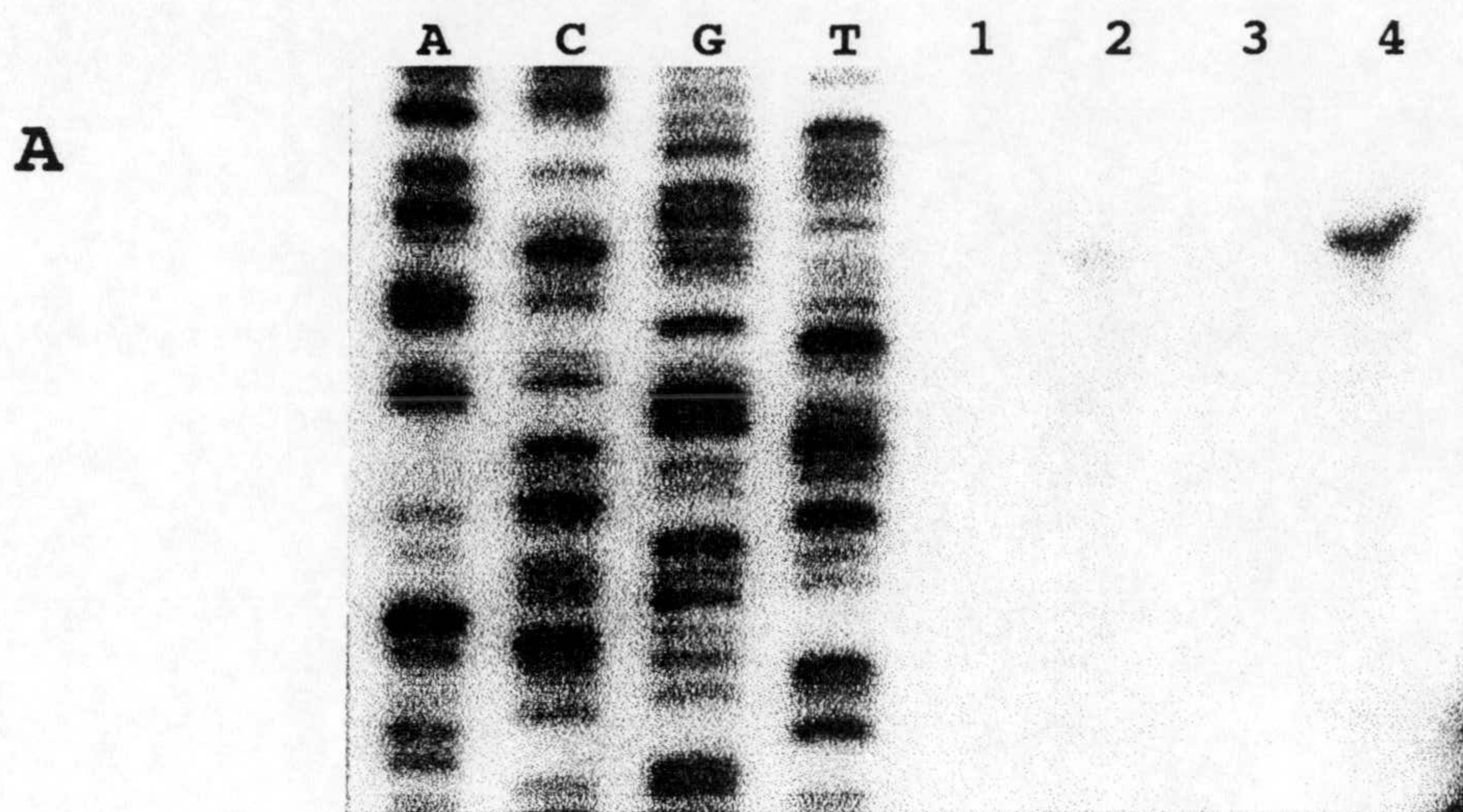


Figura 17. Alineamiento de la secuencia de la proteína TtgD con las de mayor homología, estas son: SrpA de *P. putida* S-12 (Kieboom et al., 1998); TtgA de *P. putida* DOT-T1 (Ramos et al., 1998); MexA de *P. aeruginosa* (Poole et al., 1993); AcrE de *E. coli* (Klein et al., 1990); AcrA de *E. coli* (Ma et al., 1993) y MexC de *P. aeruginosa* (Poole et al., 1996). Se utilizó el programa Align-Clustal. Cuando el residuo era idéntico en todas las proteínas, se muestra en fondo negro; si era idéntico al menos en el 51% de las proteínas el es fondo gris. Un aminoácido se eligió para el consenso cuando aparecía en al menos 4 de las 7 proteínas alineadas.



B

```

5'-GTGCCTGCTCATGATTGGCCACCACTCTAATGGCAAGTGAACG
  ATCAGGCCAGCCGAGCGACTGATCTCTCTTGTCTCTGCATTTT
  CTGGGTGCAGGTCAGTCACGCATGGCATGAACGGCTGTTTCGC
  AAAAACCACATAGTGATACTATTCTGCAATGCGGGCCATGC
  ATTGTGATTCCCAAAGATCAGTTCTACAACCAGGAGACGAAC
  GGTGAGACTCGAGCGAGCTTTGCGTGCGAGAGACAGTTAATTC
  CGCTAGCAGCCATCTGGTTGCTGGTGGGTTGCGGTAAGCAGGA
  AACGGTGGAAAGCACTGCGGTGCCTCCCGAAGTTGGGGTCTAT
  GACGCACCTCGGCCTACCGAGTCTCCGAAGTGCGTCCTCAGGC
  CTCCGGCATTCTGCAGAAACGCATGTTTCGTAGAGGGCGCAGAG-3'

```

Figura 18. Determinación del sitio de iniciación de transcripción del operón *ttgDEF*. **A.** ARN total de *P. putida* DOT-T1E cultivada en succinato (carril 1) y succinato en presencia de hidrocarburos aromáticos en fase gaseosa; tolueno (carril 2), *m*-xileno (carril 3) y estireno (carril 4). En la figura se muestra el ADNc (296 pb) obtenido con el oligonucleótido complementario a *ttgD*. ACGT es una escalera que permite determinar el tamaño y localizar el sitio de iniciación. **B.** Secuencia del ADN de la región del promotor de *ttgD*. El sitio de iniciación de transcripción se indica por un asterisco seguido por una flecha que muestra la dirección de la transcripción: las secuencias -10 y -35 están enmarcadas. El codón **GTG** es el de inicio del gen y la secuencia complementaria del oligonucleótido es la subrayada.

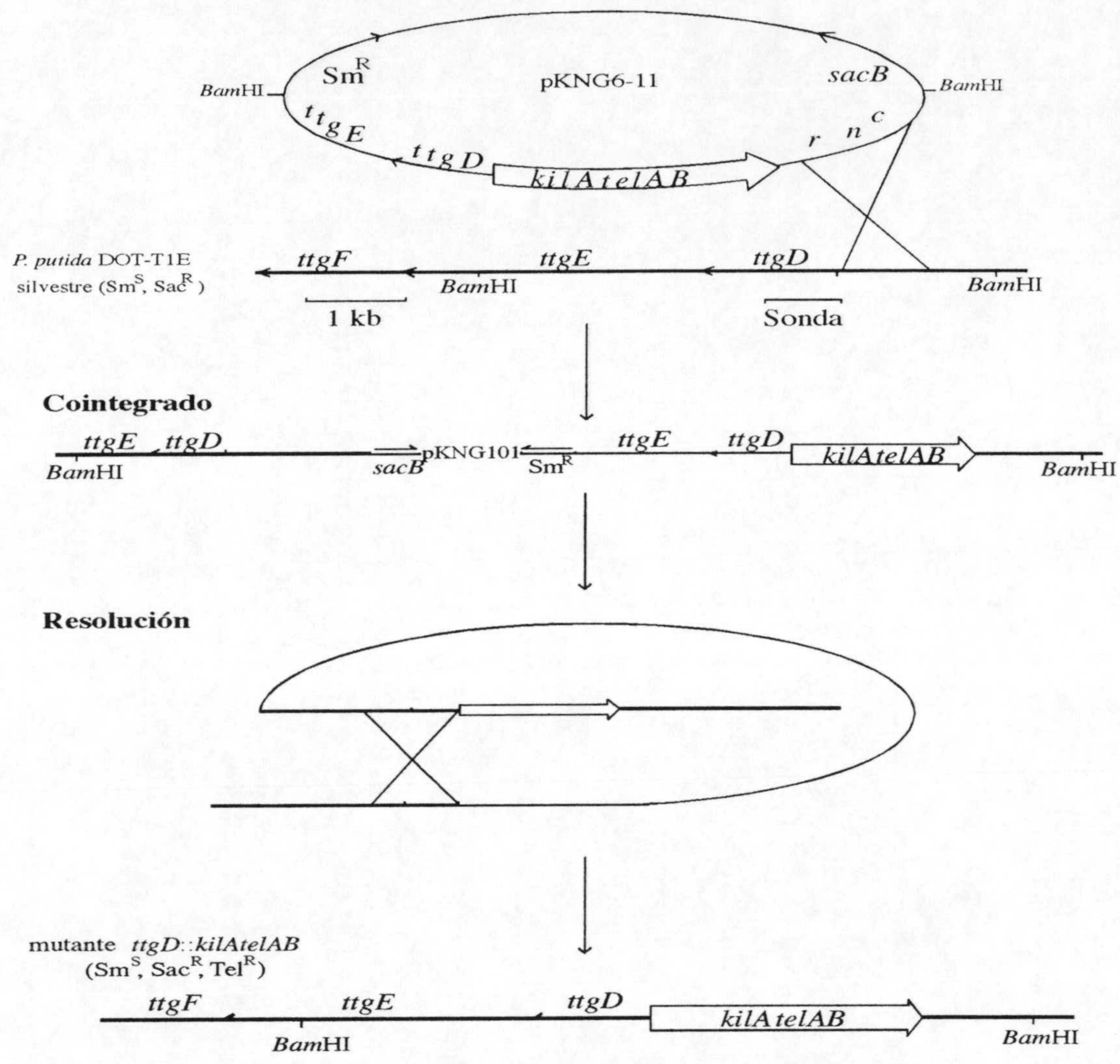


Figura 19 A. Interrupción del gen *ttgD* con el cassette de telurito y reemplazamiento en el cromosoma de *P. putida* DOT-T1E.

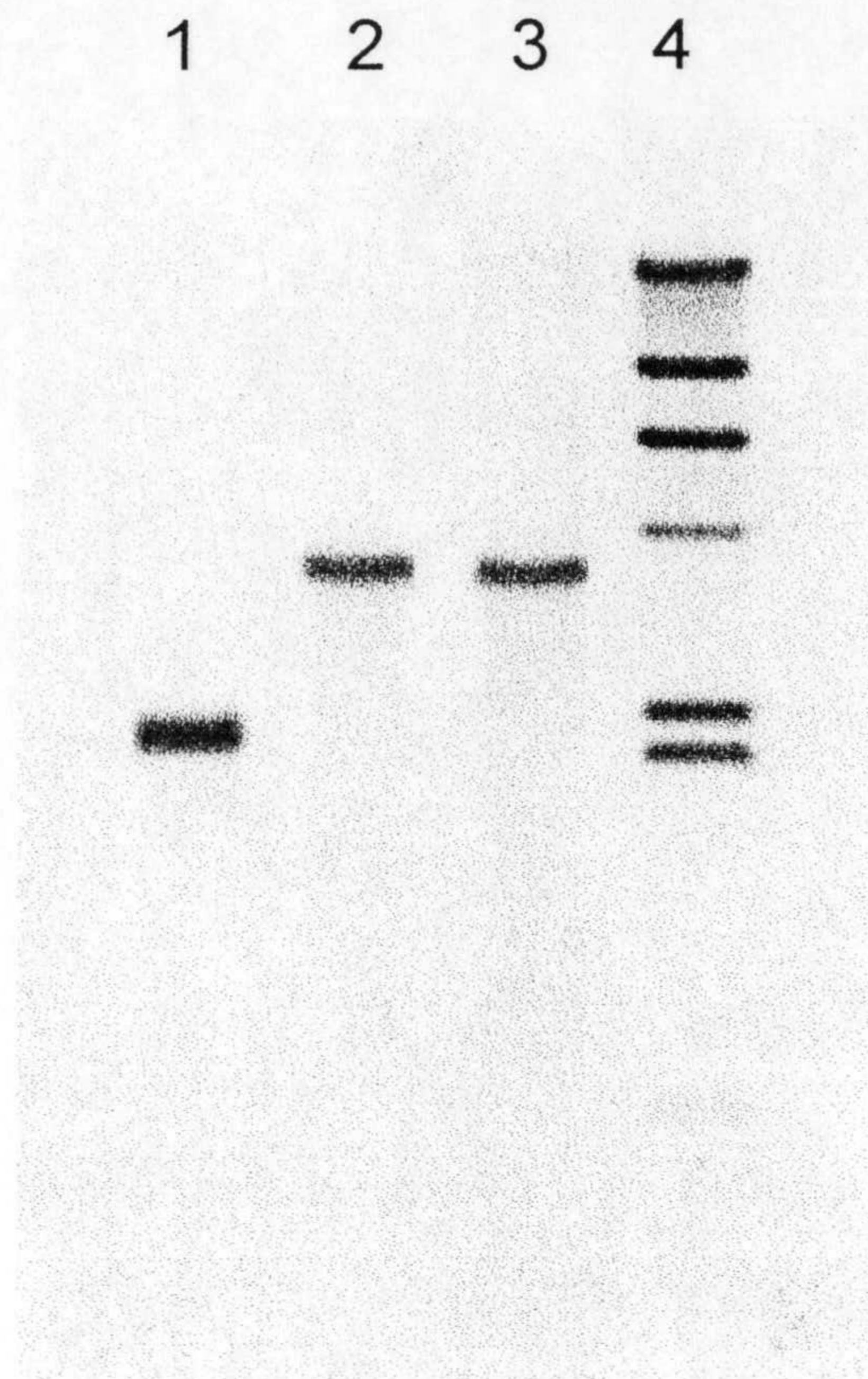


Figura 19b. Hibridación de ADN cromosomal de las cepas silvestre y mutantes en el gen *ttgD*. Los ADNs fueron digeridos con *EcoRI* y el fragmento del gen *ttgD* usado como sonda se muestra en la figura 12A. Carril 1, ADN de *P. putida* DOT-T1E; 2, ADN del clon resuelto, m6; 3, ADN del clon resuelto derivado del mutante *P. putida* DOT-T1E-18 y 4, Marcador λ /*HindIII*.

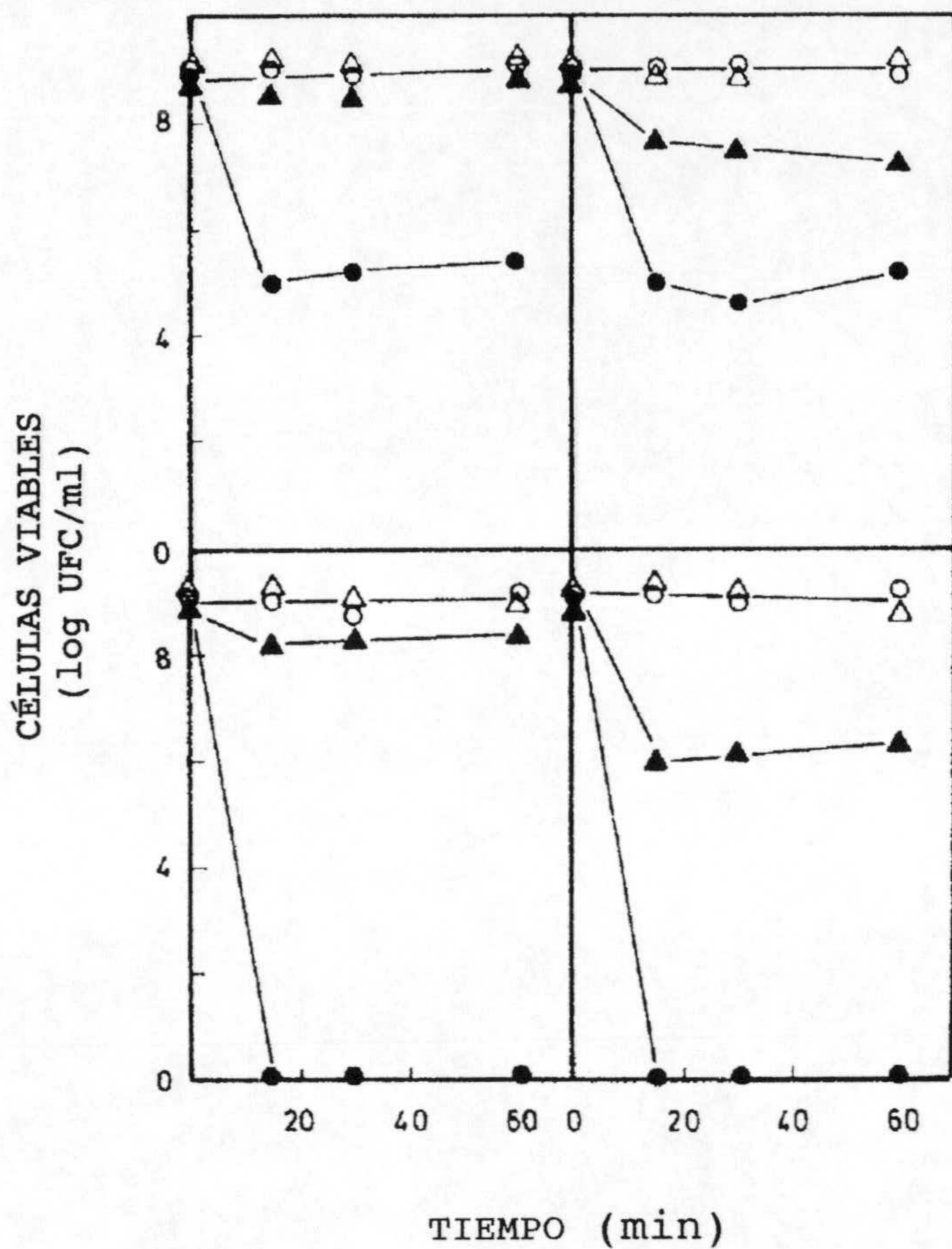


Figura 20. Sobrevivencia a choque de tolueno de las cepas *P. putida* DOT-T1 y mutantes en los genes de extrusión. Las células fueron incubadas en 30 ml de LB (círculos abiertos) o LB con tolueno en fase gaseosa (triángulos) hasta una D. O. de 1. Los cultivos fueron divididos en dos, a uno se adicionó 0,3% de tolueno (símbolos cerrados) y otro permaneció como control (símbolos abiertos). El panel **A** corresponde a *P. putida* DOT-T1E; **B**, *P. putida* DOT-T1 (Δ ttgD); **C**, *P. putida* DOT-T1 (Δ ttgB) y **D** *P. putida* DOT-T1 (Δ ttgA Δ ttgD).

M 1 2 3 4 5 6 7

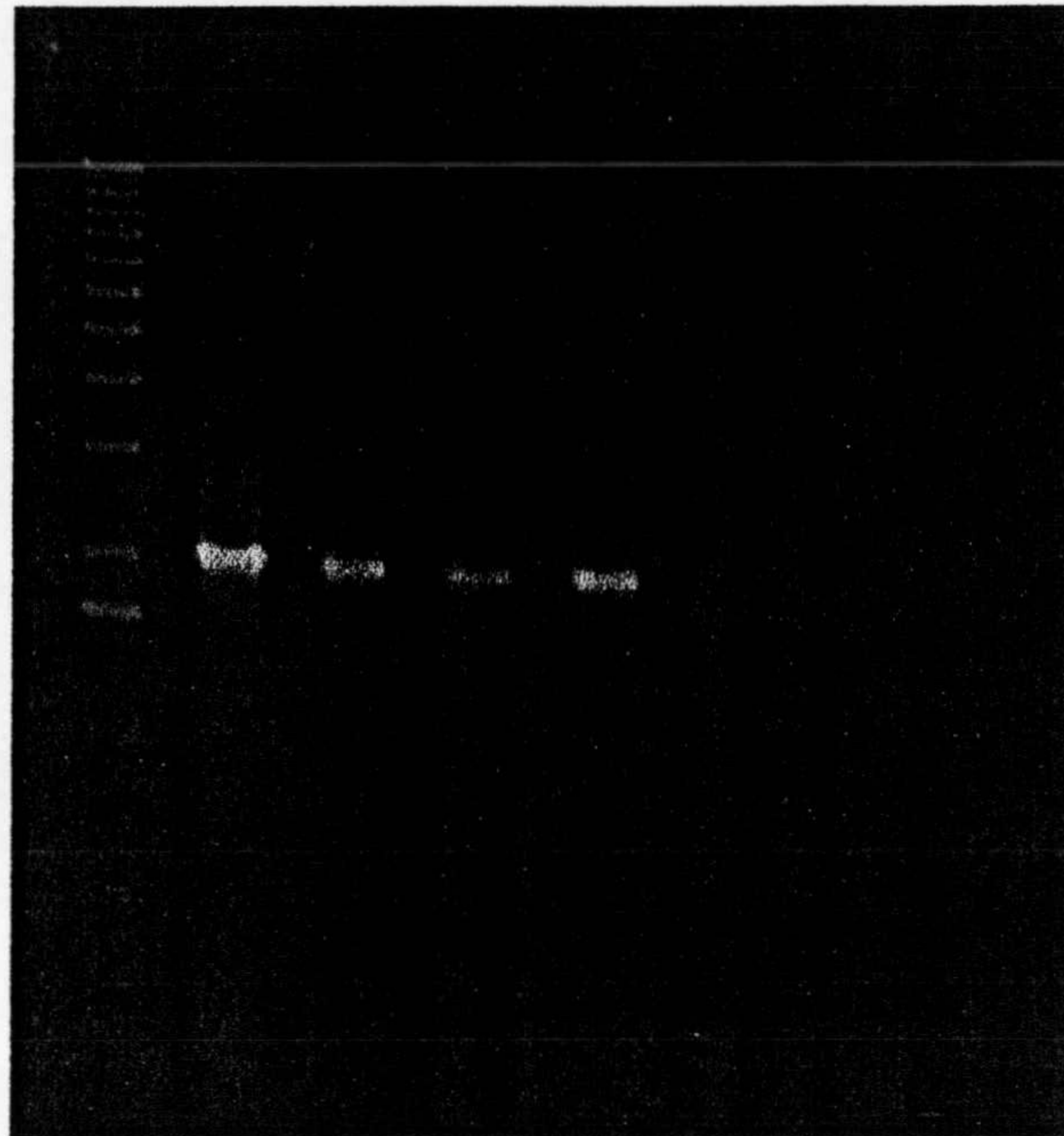
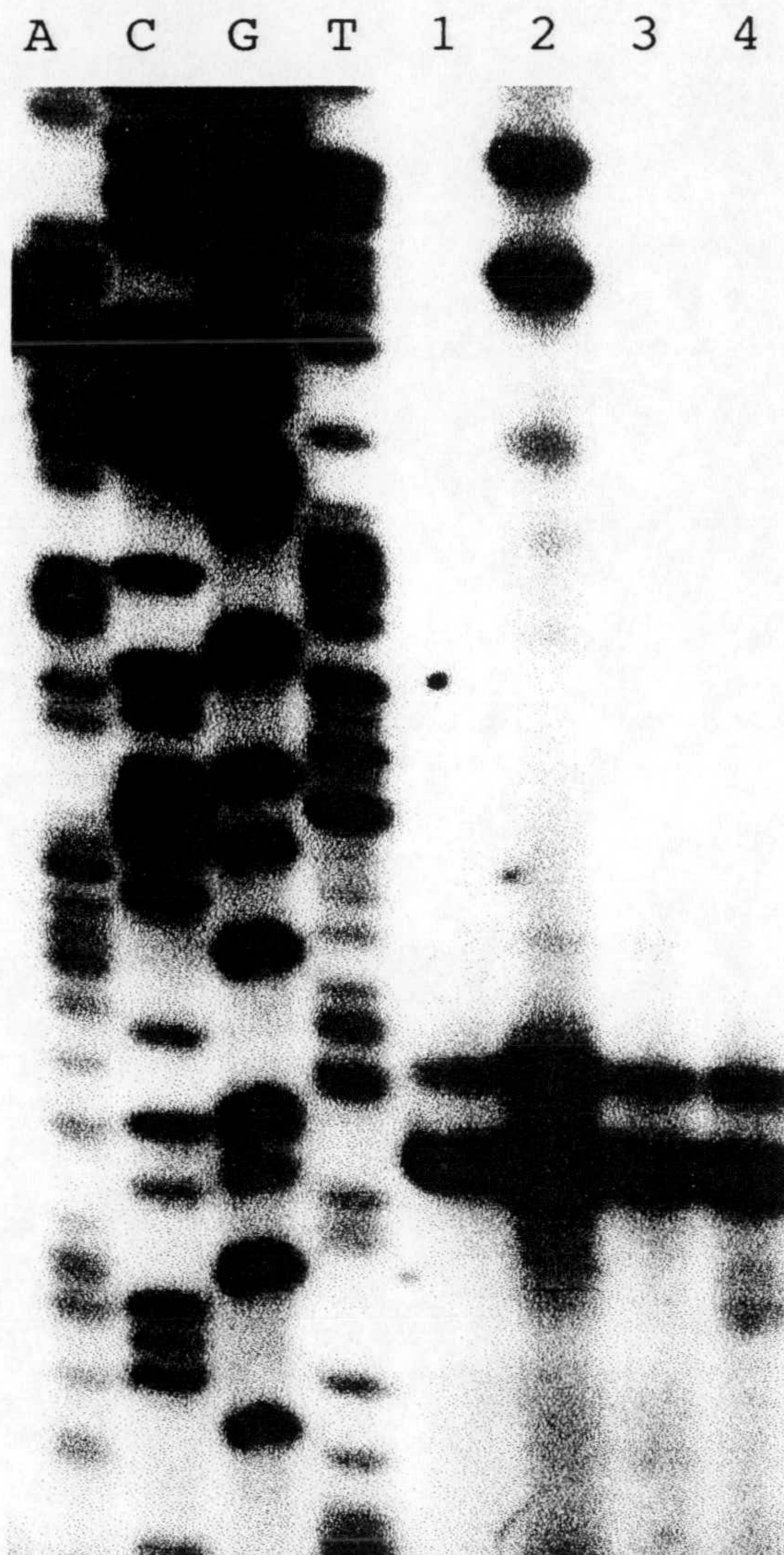


Figura 21. Amplificación por PCR de ADN cromosomal de cepas de *Pseudomonas*. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se presenta en la sección de Materiales y Métodos. Carril 1, *P. putida* DOT-T1E; 2, *P. putida* F1; 3, *P. putida* SMO16; 4, *P. putida* MTB6; 5, *P. putida* 2440; 6, *P. mendocina* KR1; 7, *P. aeruginosa* PAO1 y M, Marcador de ADN de 1 kb.



GAGGGCGTATGATCTATAATGAATCCGTCAGAATCTTGTGAGTCATTAAAG**ATG**GAGCT

Figura 22. Transcripción del gen *todS*. ARN total fue aislado como se describió en Materiales y Métodos e hibridó contra el oligonucleótido marcado con [³²P]- γ -ATP complementario a *todS*. A C G T se muestran como escalera de secuencia; carril 1, células incubadas en medio mínimo con succinato; 2, en succinato y tolueno en fase gaseosa; 3, en succinato y *m*-xileno y 4, en succinato y *p*-hidroxibenzoato. En la secuencia en la parte inferior de la foto se muestra la localización de sitios de inicio de la transcripción señalados con flechas y el codón de inicio del gen *todS* con negritas.

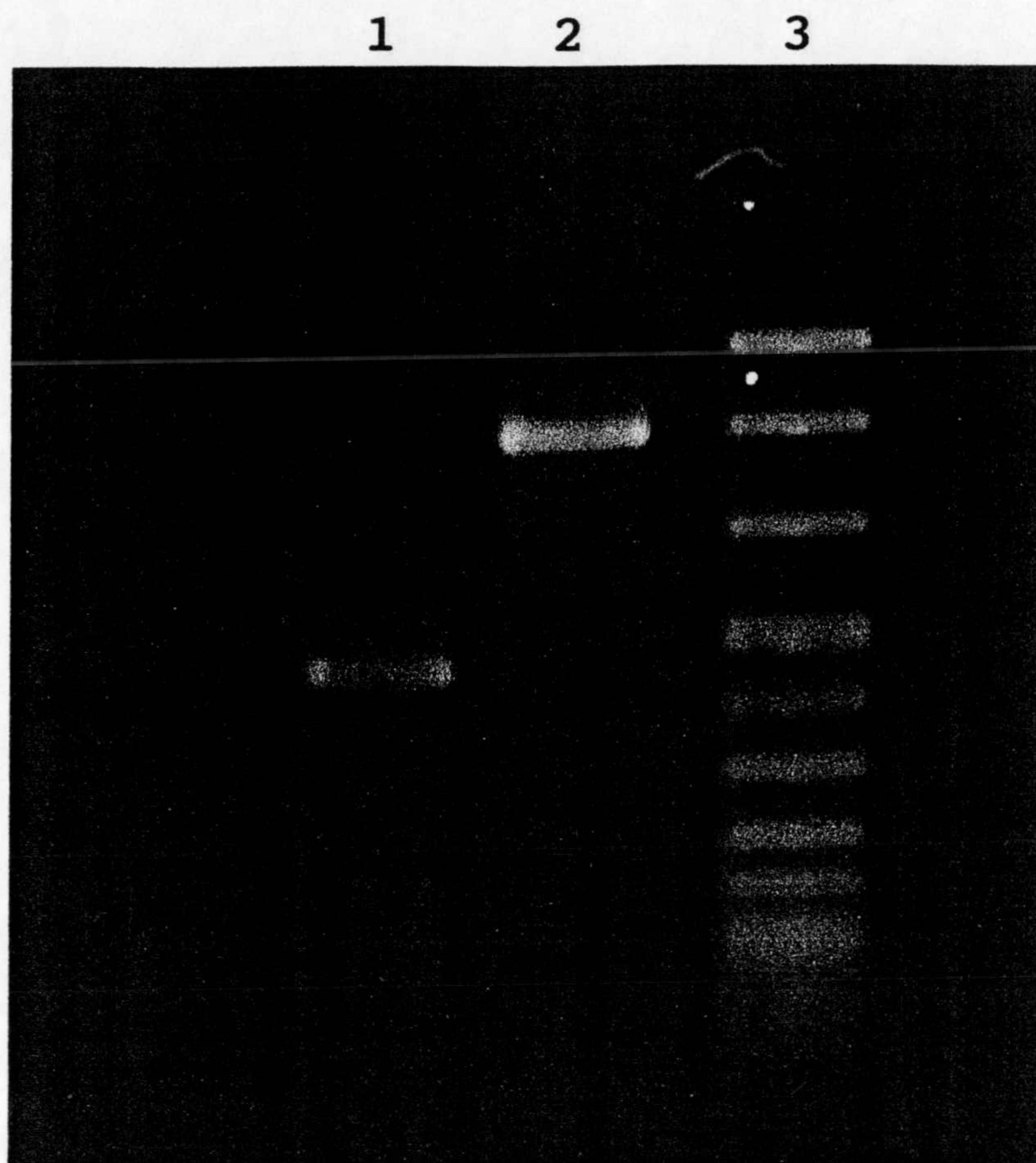


Figura 23. RT-PCR de la región *todH*, *todS* y *todT* de *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Se aisló ARN total de células cultivadas en medio mínimo con succinato como fuente de carbono y tolueno en fase gaseosa. El carril 1 corresponde al producto de la reacción utilizando un oligonucleótido del extremo 3' del gen *todH* (5'-CTCAAGACGGTGGATATTCTTG-3') y uno del extremo 3' de *todS* (5'-GTGCATGTTCCACCGTC-3'); el 2 corresponde a la del oligonucleótido del extremo 3' de *todS* (5'-TCTCGCTGATGCCTCAACGTGTCG-3') y el del extremo 5' de *todT* (5'-CTGCTCAGTGCTTCCAGTACTG-3'); 3, marcador de peso molecular tipo VIII de Boehringer.

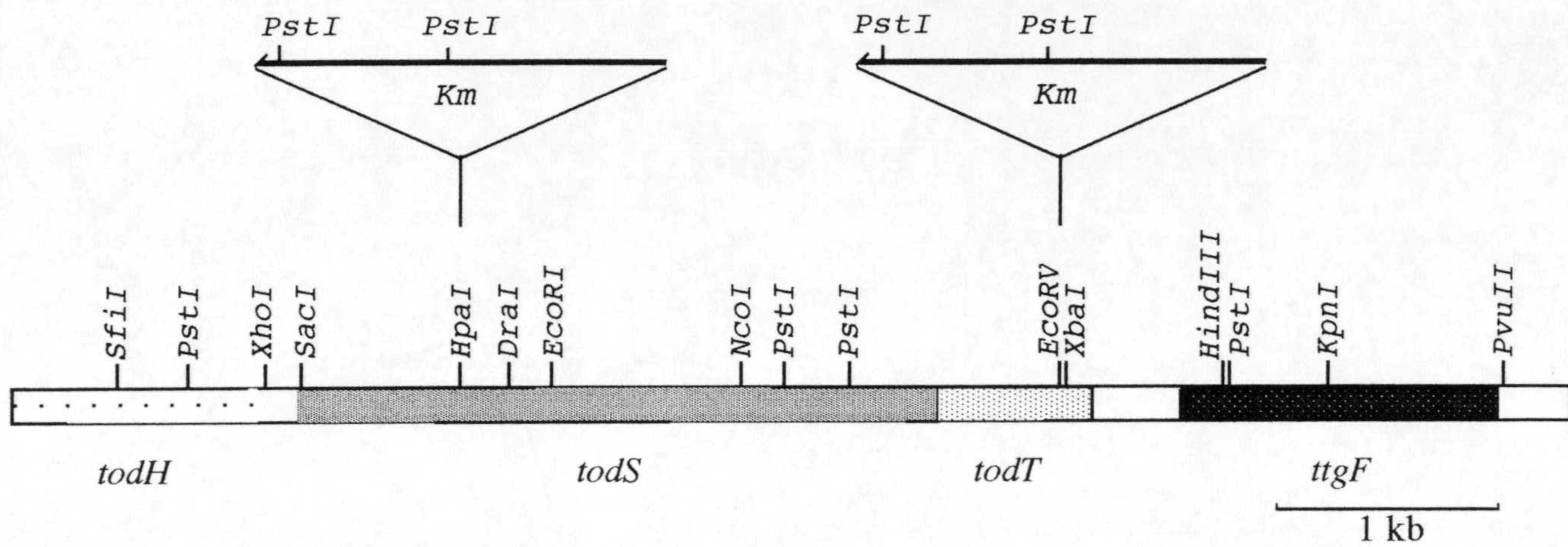


Figura 23. Mapa de los genes reguladores *todS* y *todT*. El fragmento *XhoI-HindIII* de 4,3 kb fue subclonado en el plásmido pUC18 para obtener el pT1-155 en el que posteriormente se insertó en cada uno de los sitios *HpaI* y *EcoRV* el cassette de resistencia a kanamicina para generar los mutantes *P. putida* DOT-T1-S1 y *P. putida* DOT-T1-T2 correspondientes a los genes *todS* y *todT* respectivamente.

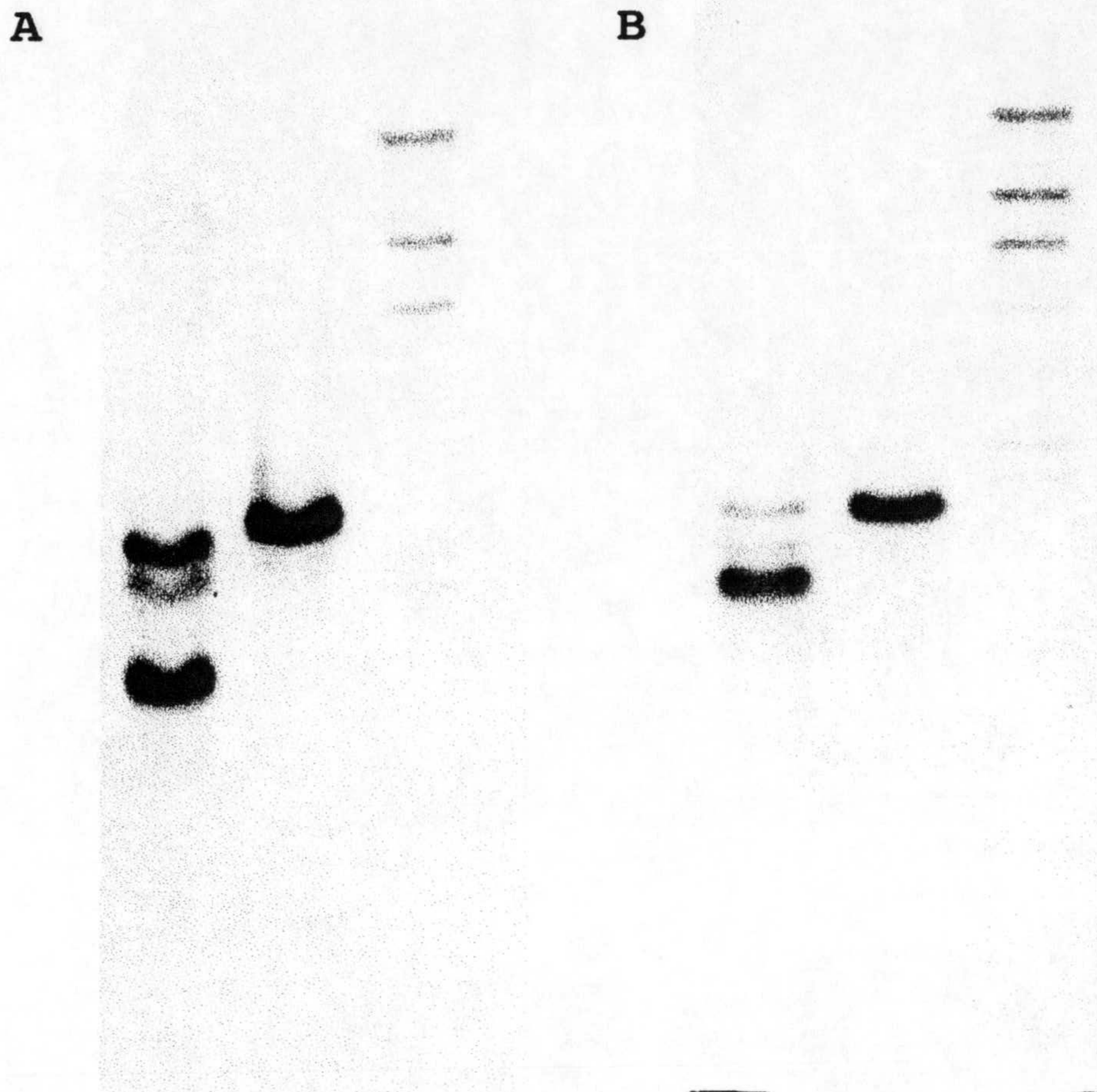


Figura 24. Reemplazo de los genes *todS* y *todT* con el gen de resistencia a kanamicina. En la figura se presentan hibridaciones de ADN cromosomal digerido con *Pst*I. **A.** *P. putida* DOT-T1E-S1 (carril 1), *P. putida* DOT-T1E (carril 2), marcador de peso molecular λ /*Hind*III (carril 3). Como sonda para la hibridación de esta membrana se utilizó el gen *todS* que fue marcado por amplificación con dUTP-digoxigenina. **B.** *P. putida* DOT-T1E-T2 (carril 1), *P. putida* DOT-T1E (carril 2) y marcador de peso molecular λ /*Hind*III (carril 3). Para esta membrana se utilizó como sonda el gen *todT* marcado de igual manera que *todS*.

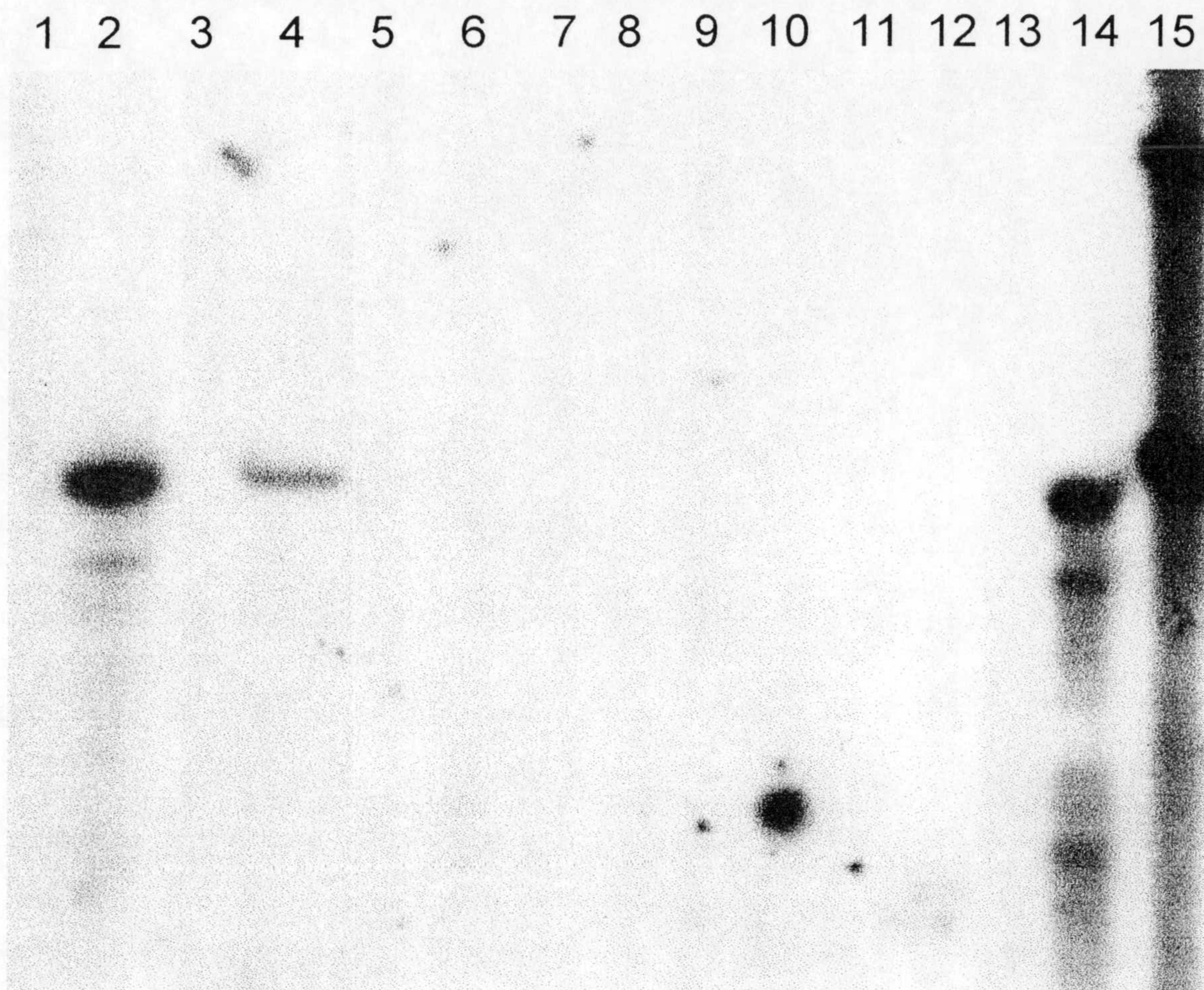


Figura 26. Efecto de las mutaciones en *todS* y *todT* sobre la expresión de *todX*. Extensión de cebador se realizó con ARN obtenido de células cultivadas en succinato con o sin inductores. En los carriles 1-4 se muestra la expresión del gen de la cepa silvestre en succinato, tolueno, *p*-hidroxibenzoato y *m*-xileno respectivamente; en 5-8 se muestran la del mutante *todS*::Km y el mismo orden del medio de cultivo que los anteriores; en 9-12 la del mutante *todT*::Km; 13-14, la del mutante en *todH*::Tn5 en succinato y tolueno; 15, marcador XIV de Boehringer.

A C G T 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

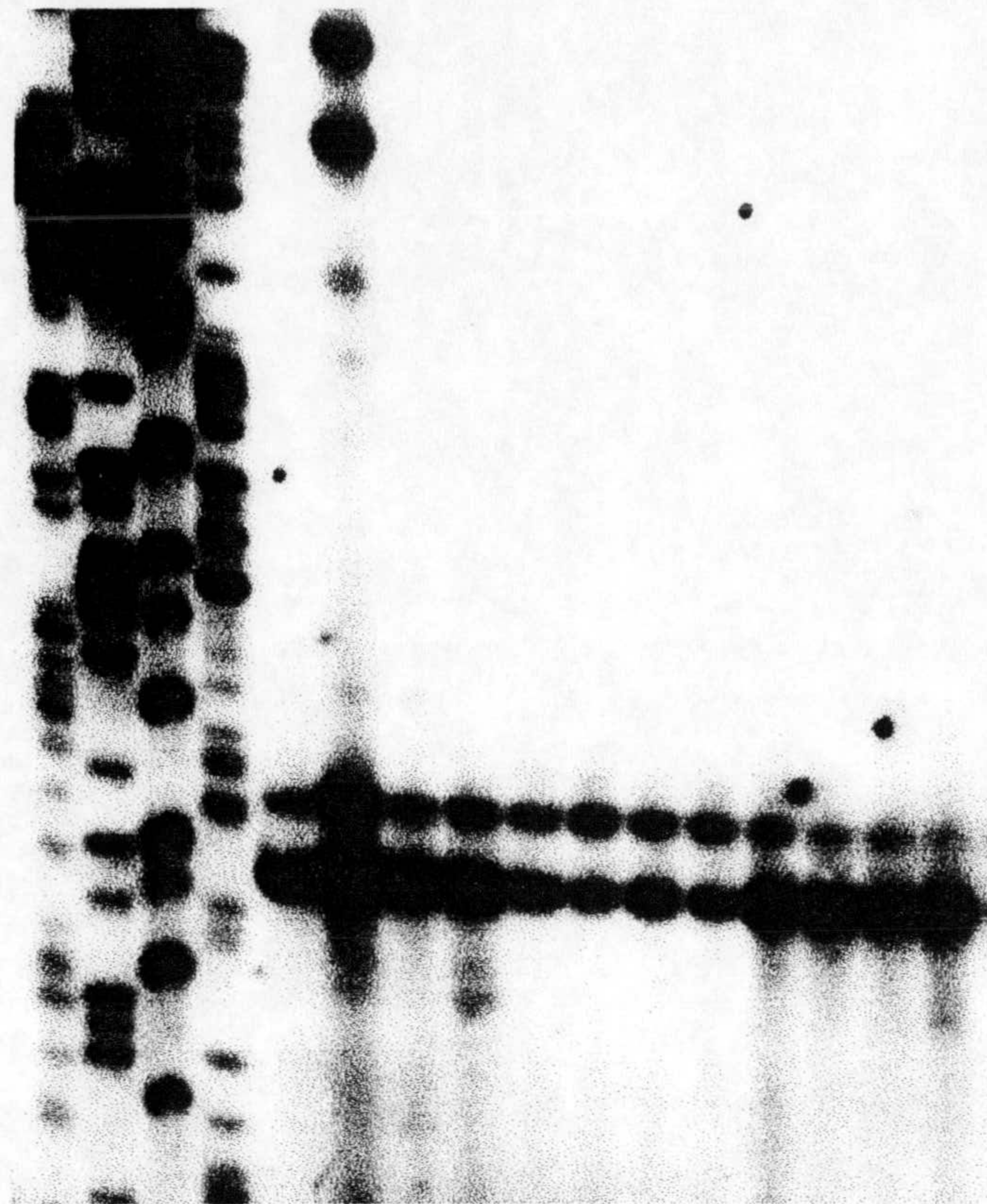


Figura 25. Transcripción del operón *todST* en *Pseudomonas putida* DOT-T1E y mutantes en los genes *todS* y *todT*. Los ARNs se aislaron de células incubadas en medio mínimo con succinato como fuente de carbono (carriles 1, 5 y 9); succinato con tolueno en fase gaseosa (carriles 2, 6 y 10); succinato con *m*-xileno (carriles 3, 7 y 11) y succinato con *p*-hidroxibenzoato (carriles 4, 8 y 12). A C G T muestran la secuencia de la región donde se localiza el sitio de iniciación de transcripción. Los carriles 1 a 4 corresponden a los ADNc de *P. putida* DOT-T1E, 5 a 8 a los de la mutante *P. putida* DOT-T1-S1; 9 a 12 a los de la mutante *P. putida* DOT-T1-T2.

DISCUSIÓN

DISCUSION

I. Identificación de la ruta de degradación de tolueno de *P. putida*.

Como otros disolventes orgánicos, el tolueno es altamente tóxico y causa la muerte de la mayoría de los microorganismos a concentraciones iguales o mayores a 0,1% (v/v). Sin embargo se han descrito cepas del género *Pseudomonas* (Inoue y Hirokoshi, 1989; Cruden et al., 1992; Ramos et al., 1995) que toleran concentraciones de tolueno mayores de 0,1% en el medio de cultivo y los mecanismos responsables para esta tolerancia en estas cepas han despertado un gran interés en la industria biotecnológica ya que pueden tener aplicaciones en las biotransformaciones en sistemas de dos fases y en restauración de sitios contaminados (Segura et al., 1999). A mediados de los noventa se aisló en nuestro grupo una bacteria, *Pseudomonas putida* DOT-T1, que puede crecer en mayores concentraciones de tolueno y utilizaba el disolvente como fuente de carbono y energía (Ramos et al., 1995). Hasta ahora se han descrito cinco rutas para la degradación de tolueno en distintas cepas de *Pseudomonas*. En este trabajo se ha pretendido abordar y responder a dos tópicos en nuestro sistema biológico. Primero, investigar la ruta de degradación de tolueno y su regulación y segundo, ahondar en los mecanismos moleculares por los que *Pseudomonas putida* DOT-T1 muestra tolerancia a tolueno. Para abordar la ruta de degradación de tolueno en esta cepa se generaron mutantes que fueron incapaces de crecer en un medio mínimo con tolueno como fuente de carbono. De esta serie se puede esperar que las mutaciones se encontrasen en cualquier punto de la ruta o en algún factor que directa o indirectamente regulase la expresión de los genes catabólicos. Si la mutación se encontrase en un paso inicial de la ruta donde se acumulase el compuesto intermedio, éste podría ser detectado por algún tipo de

análisis, p. ej. cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía de gases-espectrometría de masas. La serie de mutantes generadas se cultivaron con glucosa como fuente de carbono en presencia de tolueno y de los sobrenadantes se obtuvieron cromatogramas tras análisis de HPLC. Estos análisis nos permitieron identificar de manera inequívoca intermediarios de la ruta por lo que se decidió iniciar la caracterización genética de las mismas. Se eligió una de las mutantes llamada *P. putida* DOT-T1-m5 para su análisis.

Para la caracterización de la mutante era preciso determinar el gen donde el transposón Tn5 se había incorporado. La secuencia de los clones obtenidos tras la selección con kanamicina nos indicó que el gen interrumpido era un gen con alta homología a *todH* y *xylK*. Análisis posteriores por PCR y secuencia nos ayudaron a confirmar que el gen interrumpido y los contiguos formaban parte del operón de la ruta Tod. Todos los genes de la ruta incluyendo los reguladores fueron secuenciados. De esta manera pudimos responder a la primer pregunta acerca de la ruta.

1. 2. Análisis de las secuencias de los productos génicos de la ruta *tod*

El análisis de la secuencia nucleotídica de la ruta *tod* reveló un alto contenido de G+C (60%) lo cual es característico de las cepas de *Pseudomonas*. Las secuencias de nucleótidos se tradujeron a los respectivos secuencias polipeptídicas y se compararon con las secuencias de proteínas depositadas en los bancos. Estos datos nos indicaron que algunos componentes de Tod presentan alto grado de homología con proteínas de los bancos de datos, tal es el caso de la tolueno dioxigenasa (*todC1C2BA*). Tanto en la subunidad α (*todC1*) como en la β (*todC2*) son homólogas con los componentes de la dioxigenasa que participan en la degradación de benceno en diferentes cepas de *P. putida* o la degradación de triclorobenceno en la cepa *Pseudomonas* sp. y *Burkholderia* sp. (Tabla 3). Asimismo la

tolueno dihidrodiol deshidrogenasa, el producto del gen *todD* presentó homología con las enzimas correspondientes en las rutas de degradación de benceno y clorobenceno de los organismos antes citados. En el caso de la 3-metilcatecol dioxigenasa de, producto del gen *todE*, la homología no parece tan alta (67% en el caso de la 3-isopropil catecol dioxigenasa de *R. erythropolis* y menor respecto a las de otras cepas). En el caso de la enzima codificada por *todG* solo se encontró alta homología con la codificada por el gen *bphE* de la degradación de bifenilo por la cepa *Pseudomonas* sp. KK102, las proteínas de otras cepas mostraron altos niveles de similaridad pero menores o iguales a 53%. En *todI* y *todH* la homología es más conservada. Sin embargo en el caso de *TodS* y *TodT* las proteínas que regulan la expresión del operón *tod*, se conservan algunas regiones pero en general el porcentaje de homología no es mayor de 57%.

Los valores de las homologías de la Tabla 3 así como la organización de los diferentes grupos u operones de las rutas catabólicas sugieren que éstos pueden ser combinados como módulos a los cuales otros genes periféricos pueden ser incorporados lo cual se puede traducir en ventajas que la bacteria puede aprovechar dependiendo de las condiciones de su entorno natural.

1. 3. Regulación de la ruta *tod*

Los genes *todS* y *todT* codifican dos proteínas que muestran alta similitud con miembros de la superfamilia de los sistemas de transducción de señales de dos componentes encontrados tanto en procariontes como eucariotes (Appleby *et al.*, 1996; Parkison y Kofoid, 1992; Reizer y Saier, 1997). *TodS* es una proteína de 108,758 Da que muestra similitud a las proteínas sensoras de histidin kinasa en particular a *StyS*, *TutC* y *BpdS* que regulan la degradación aeróbica de estireno en *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco *et al.*, 1998), catabolismo anaeróbico de tolueno en *Thauera* sp. T1 (Coshigano y Young, 1997) y bifenilo y policlorobifenilo por *Rhodococcus* sp. M5 (Labbé *et al.*, 1997) respectivamente. El extremo amino terminal de *TodS*

(aminoácidos 1 a 75) se asemeja a la región básica de la cremallera de leucina que interviene en la dimerización de proteína y unión a ADN de un número de proteínas (Lau et al., 1997). Otra característica interesante de TodS compartida solo con StyS y TutC es la presencia de un dominio receptor flanqueado por dos dominios canónicos de kinasas. El gen *todT* codifica una proteína de 23,343 Da (207 aminoácidos) que muestra una considerable similitud con los principales reguladores de respuesta de los sistemas de dos componentes, por ejemplo los reguladores de respuesta StyR (Velasco et al., 1998) y TutB (Coshigano y Young, 1997). Estos reguladores parecen contener una cavidad ácida con tres residuos Asp (Baikalov et al., 1996; Parkinson y Kofoid, 1992; Volz, 1993). Se supone que dicho dominio es el sitio aceptor del grupo fosforilo que le transfiere al sensor TodS fosforilado. El extremo carboxilo de TodT contiene una secuencia (aa 143 a 185) que tiene 17 de los 19 residuos consenso de la región de unión a ADN de los miembros de la familia de reguladores LuxR/FixJ (Pao y Saier, 1995; Reizer y Saier, 1997). Aparentemente un elemento de unión tipo "linker Q" (Wootton y Drummond, 1989) sería responsable de la unión entre el dominio receptor de señal y el módulo de unión a ADN.

Para determinar cómo se regula la ruta *tod*, se preparó ARNm de células de la cepa silvestre y se determinó la expresión de los operones en *todX* y *ytodST*. Los datos revelaron que *todST* se expresa constitutivamente mientras que la expresión de *todX* es inducible.

Con el objeto de entender un poco más acerca del control transcripcional, en este estudio se generaron mutantes en los genes *todS* y *todT* y se analizó el patrón de expresión de los operones en *todX* y *todS* bajo diferentes condiciones de cultivo.

Por consiguiente, basado en el análisis de secuencia y tomando en cuenta que tanto TodS y TodT están presentes en las células y la expresión de P_{todX} requiere la presencia de tolueno, puede proponerse que en presencia de hidrocarburos aromáticos TodS los percibe y fosforila TodT el cual a su vez activa la expresión de P_{todX} (Figura 22). Este modelo de

regulación general corrobora los resultados de algunos otros grupos (Lau *et al.*, 1997). La expresión de *todX* era inexistente en los mutantes deficientes de TodS y TodT. El gen *todS* se expresa constitutivamente desde dos promotores del tipo sigma-70. De los dos promotores *todS*, P_{todS1} se expresaba a un bajo nivel en el mutante deficiente en TodS.

La expresión del promotor P_{todS1} parece ser estimulada por la proteína TodS aun en presencia de tolueno porque el nivel de expresión de P_{todS1} es más alto en un mutante *todS*⁺ que en un *todS*⁻. Parece que la proteína TodS es multifuncional ya que no solo percibe tolueno en el medio de cultivo e interviene en la fosforilación de TodT, sino que también sería capaz de promover su propia transcripción desde el promotor P_{todS1} . El papel regulador se sustenta en la presencia de una región de cremallera de leucina que podría intervenir en la dimerización de la proteína y su unión a ADN. Esta autorregulación asegura un cierto nivel de las proteínas regulatorias dispuestas para percibir la presencia del hidrocarburo y la activación de los genes catabólicos a través de una eficiente cascada (Figura 22). El carácter multifuncional de TodS una proteína reguladora y sensora de tolueno con actividad enzimática es inusual, pero hay al menos un precedente en el sistema de utilización de prolina de bacterias entéricas y *Pseudomonas* en el que la proteína PutA no es solo una enzima con dos actividades enzimáticas que convierten la prolina en glutamato sino que es también capaz de regular la expresión desde los promotores *put* en respuesta a la presencia de prolina en el medio de cultivo (Vilchez *et al.*, 2000)

Se ha descrito que la proteína TodT es capaz de unir hacia arriba del extremo 5' del promotor P_{todX} , y parece promover la transcripción de este promotor una vez que es fosforilado por la proteína TodS respondiendo a la presencia de efectores en el medio de cultivo. La necesidad para esta activación es clara de los resultados obtenidos en un mutante deficiente en TodS de *P. putida* DOT-T1E en el cual la proteína TodT no era capaz de activar la transcripción de P_{todX} .

Ya que el sistema TodS/TodT se asemeja a los de otros sistemas catabólicos, por ejemplo la ruta para degradación anaeróbica de tolueno (Coshigano y Young, 1997), la ruta de oxidación de estireno por *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco et al., 1998) y la ruta de bifenilo de *Rhodococcus* sp. cepa 5 (Labbé et al., 1997); sería interesante saber si el modelo regulatorio propuesto para los operones *tod* es universal o específico para el sistema de degradación aeróbico de tolueno.

II. Genes de extrusión

Hemos localizado junto al operón *tod*, un grupo de genes los que al comparar su secuencia en el banco de datos mostraron una considerable homología con otros sistemas descritos en la extrusión de disolventes o antibióticos. A este grupo de genes lo denominamos en este estudio *ttgDEF*. Lo interesante del resultado es la cercanía entre ambos grupos de genes, uno de degradación y otro con funciones de extrusión de tolueno. Su organización física al parecer se mantiene en las cepas que expresan la ruta *tod* sin importar su origen ya que habían sido aisladas de distintos países y continentes. Es posible que en *Pseudomonas* estos dos grupos de genes hayan coevolucionado para conferir una mayor tolerancia a tolueno aun cuando estos niveles sean distintos en cada una de ellas.

Los genes *ttgDEF* de *Pseudomonas putida* DOT-T1E parecen conformar un operón. Las evidencias que apoyan esta hipótesis son : i) La identificación de un único punto de iniciación de transcripción en 5' con respecto al gen *ttgD*, el solapamiento en la secuencia de aminoácidos de TtgE y TtgF y los resultados de RT-PCR realizados entre las secuencias de *ttgD* y *ttgE* y *ttgE* y *ttgF*.

La expresión de los genes *ttgDEF* parece estar bajo regulación positiva en respuesta a la presencia de hidrocarburos aromáticos, por ejemplo tolueno y estireno (Figura R11). El punto de iniciación de transcripción fué identificado por análisis de iniciador de cebador. La secuencia hacia el extremo 5' del sitio de iniciación de

ttgD se comparó con secuencias de promotores reconocidos por la ARN polimerasa con diferentes factores sigma y no se encontró homología significativa en las regiones -10 y -35 de este promotor (Marqués et al., 1999). En los genes del operón *tod* cuya transcripción es mediada por la proteína TodT dada la presencia de hidrocarburos aromáticos (Lau et al., 1997). El promotor P_{todX} consta de tres regiones, la de -10/ -35, una región rica en AT en la zona de -40 y una secuencia invertida (ATAAAGTTTAT) alrededor del sitio -120, el cual presumiblemente es el sitio de unión de TodT (Lau et al., 1997). El alineamiento de las secuencias de P_{todX} y P_{ttgD} no mostró conservación de secuencia lo que sugería que los reguladores de estos promotores eran distintos.

Los sistemas de extrusión TtgABC de *P. putida* DOT-T1, MexAB-OprM de *P. aeruginosa* y el AcrAB-TolC de *E. coli* remueven hidrocarburos aromáticos y antibióticos (Aono et al., 1998; Li, 1998; Ramos et al., 1998). El sistema TtgDEF no parece tener funciones en la remoción de antibióticos, al menos de aquellos utilizados en este ensayo ello se sustenta en es que tanto la cepa silvestre como el mutante en *ttgD* eran igualmente sensibles a cefotoxima, ciprofloxacina, gentamicina, kanamicina, ácido nalidíxico, piperacilina y tetraciclina. Esto sugiere que el sistema TtgDEF es más restringido en la especificidad de sustratos que los TTgABC, MexAB-OprM y AcrAB-TolC. Se ha descrito por ejemplo que en *P. putida* S-12 (Isken, 1998), el sistema SrpABC extruye hidrocarburos y no antibióticos. El análisis de las secuencias reveló que SrpABC y TtgDEF eran más similares entre sí (80%) que cuando se comparaba con TtgABC (72%), MexABOprM (68%) y ArcAB-TolC (62%). Con este ejemplo se sugiere que aunque en sistemas RND de extrusión de drogas existen grupos cuyas funciones son distintas.

Como se mencionó anteriormente, el sistema TtgDEF es inducido por algunos hidrocarburos aromáticos. Para analizar la función del sistema TtgDEF en la tolerancia a tolueno, se generó una mutante con interrupción en el gen *ttgD* y se analizó el comportamiento de éste cuando se cultivó en ausencia y en presencia de tolueno (fase gaseosa) a un choque de tolueno líquido. Con células sin

preinducir no se encontró diferencia alguna respecto al comportamiento de la cepa silvestre (Figura R13). Esto es alrededor de 1 en 10^4 células sobrevivieron al choque de tolueno. Esto podría ser posible porque el sistema TtgABC estaba activo siendo éste constitutivo. Sin embargo cuando el mutante era preinducido con tolueno, sólo el 1% de la población sobrevivió al choque del disolvente frente al casi 100% de la población de la cepa silvestre, lo cual demostró que esta bomba juega un papel importante en la tolerancia al disolvente.

El número de células de *P. putida* DOT-T1 que toleran el choque de tolueno una vez que han sido expuestas al disolvente en fase gaseosa es mayor que el de aquéllas que no han sido preexpuestas (Figura R13). Esto puede ser debido a que otra bomba inducible además a la TtgDEF pueda funcionar en la extrusión de tolueno. En *P. putida* S-12 (Kieboom, 1998a; 1998b) se ha descrito una bomba inducible y distinta a TtgDEF, la denominada SrpABC. Esta bomba también está presente en la cepa de *P. putida* DOT-T1E (A. Rojas y A. Segura, datos no publicados), y ello podría explicar la sobrevivencia frente a los posibles daños que los disolventes podrían causar a la célula en altas concentraciones.

La existencia de una tercera bomba se apoya también por los resultados obtenidos con una doble mutante carente de las bombas TTgABC y TtgDEF. Esta cepa, al igual que una mutante TtgABC no sobrevivió al choque de tolueno en células sin preexponer al disolvente, como era de esperar al carecer del sistema TtgABC (preexpuestas a tolueno). Sin embargo en condiciones inducidas era relativamente tolerante lo que sugiere la existencia de otra bomba inducible que interviene en el proceso de tolerancia a tolueno.

Por otro lado, una región de 3,5 kb en 5' con respecto a los genes *ttgDEF* fue secuenciada sin encontrarse un marco de lectura definido excepto algunas secuencias de 100-400 pb que mostraban homología a distintas proteínas como PnbR de *Pseudomonas* sp. YH102 o una proteína de nodulación NodD2 de *Bradyrhizobium elkanii* y varias otras con funciones

regulatorias pero en todos los casos son secuencias de genes incompletos.

Esta región que aparentemente no codifica para proteínas funcionales, pudo haber sido integrada a lo largo de la evolución. Llama la atención este hecho ya que más allá de esas 3,5 kb se encontró un marco de lectura abierto que al compararlo en el banco de datos mostró una alta homología con el gen *mexT* de *Pseudomonas aeruginosa*. En esta bacteria el producto del gen *MexT* es regulador del sistema *MexEF-OprN*, el cual es responsable de la extrusión de ciertos antibióticos (Köhler *et al.*, 1997). Para analizar con más detalle la función de este gen, éste se interrumpió con un cassette de kanamicina. Los análisis de sobrevivencia a un choque de tolueno de un cultivo incubado en presencia y ausencia de tolueno así como una extensión de cebador en muestras de ARN obtenidas de cultivos con y sin tolueno revelaron:

- i) que en el fondo *TtgS* no tiene lugar la inducción de los genes *ttgDEF* y
- ii) que un mutante carente de *TtgS* es hipersensible a un choque de tolueno en células precultivadas en presencia de éste cuando se suministró a través de la fase gaseosa.

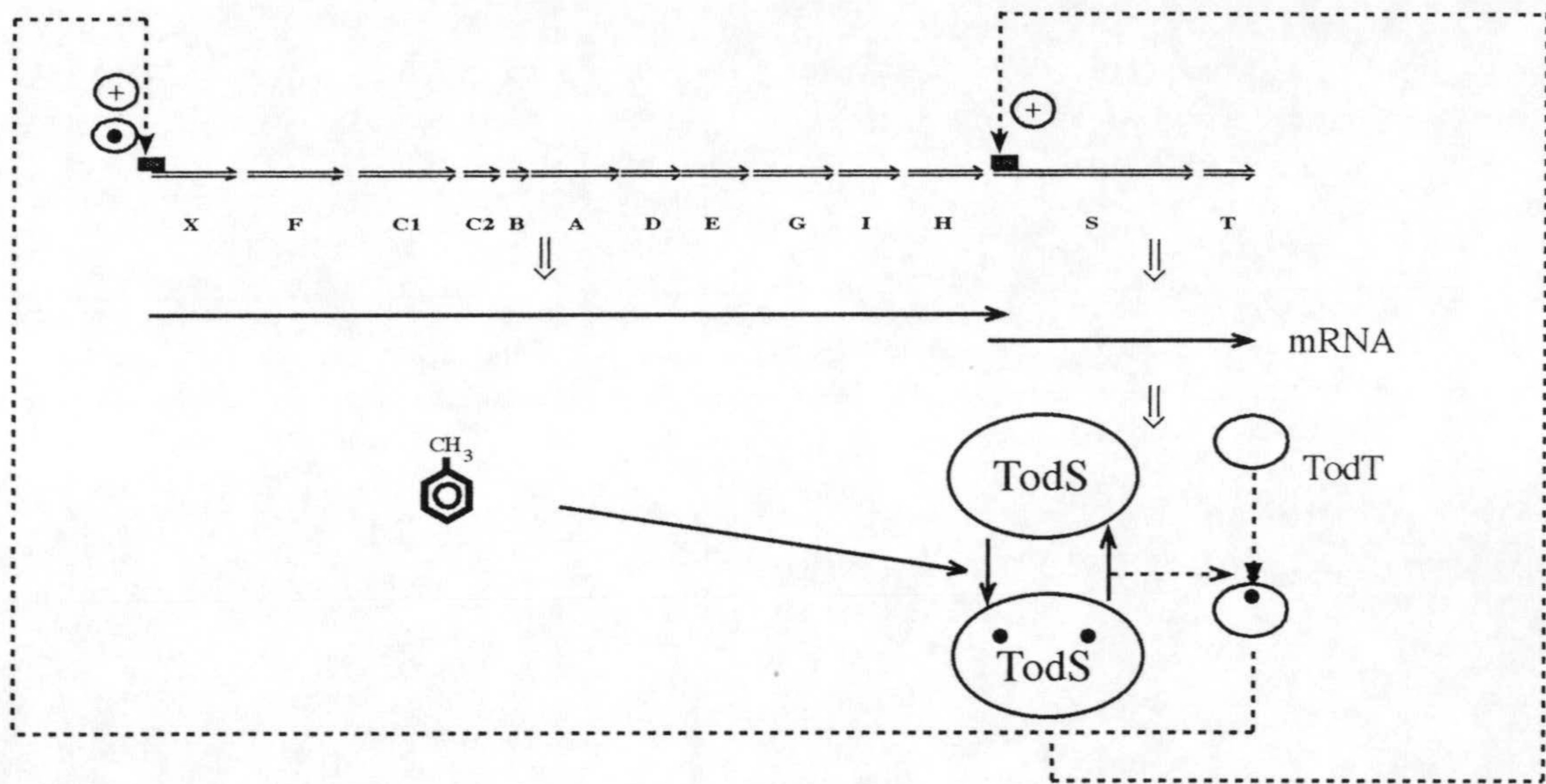


Figura 28. Modelo de regulación propuesto del operón *tod* por medio de TodS y TodT.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abril, M.A., Michán, C. 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.
- Alekshun, M.N. y Levy, S.B.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **41**: 2067-2075.
- Alexander, M.** 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* **211**:132-38.
- Aono, R., Aibe, K., Inoue, A. y Horikoshi, K.** 1991. Preparation of organic solvent-tolerant mutants from *Escherichia coli* K-12. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1935-1938.
- Aono, R., Kobayashi, M., Nakajima, H. y Kobayashi, H.** 1995. A close correlation between improvement of organic solvent tolerance levels and alteration of resistance toward low levels of multiple antibiotics in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 213-218.
- Aono, R., Tsukagoshi, N. y Yamamoto, M.** 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.
- Asako, H., Nakajima, H., Kobayashi, K., Kobayashi, M. y Aono, R.** 1997. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1428- 1433.
- Auling, G., Reh, M., Lee, C. M., and Schlegel, H. G.** 1978. *Pseudomonas pseudoflava*, a new species of hydrogen-oxidizing bacteria: Its differentiation from *Pseudomonas flava* and other yellow-pigmented, gram negative, hydrogen-oxidizing species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**, 82-95.

- Ausubel, F.M., Brent, R.E., Kingston, D.D., Moore, J.G., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. 1991. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Ballard, R. W., Doudoroff, M., Stainer, R. Y., and Mandel, M. 1968. Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas diminuta* and *P. vesiculare*. J. Gen. Microbiol. 53, 349-361.
- Bartels I., Knackmuss H.J. y Reineke W. 1984. Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. Appl. Environ. Microbiol. 47:500-505.
- Bayly, R.C. y Dagley, S. 1969. Oxoenic acids as metabolites in the bacterial degradation of catechols. Biochem. J. 111:303-307.
- Blumer, M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. Sci. Am. 234:35.
- Blumer, M. and Rudrum, N. J. Inst. Petrol. 56:99(1970).
- Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B., Driessen, A.J.M. y Konings, W.N. 1997. Mechanisms of multidrug transporters. FEMS Microbiol. Rev. 21: 55-84
- Borneff, J., Selenka, F., Knute, H. y Maximos, A. 1968. The synthesis of 3,4-benzopyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in plants. Arch. Hyg. Bakteriologie. 152(3): 279-282.
- Brammar, W. J., and Clarke, P. H. 1964. Induction and repression of *Pseudomonas aeruginosa* amidase. J. Gen. Microbiol. 37, 307-319.
- Byrne A.M. y Olsen R.H. 1996. Cascade regulation of the toluene-3-monooxygenase operon (*tbuA1UBVA2C*) of *Burkholderia pickettii* PK01: role of the *tbuA1* promoter (*PtbuA1*) in the expression of its cognate activator, *TbuT*. J. Bacteriol. 178:6327-6337.
- Byrne A.M., Kukor J.J. y Olsen R.H. 1995. Sequence analysis of the gene cluster encoding toluene-3-monooxygenase from *Pseudomonas pickettii* PK01. Gene 154:65-70.
- Byrne, A.M. y Olsen, R.H. 1996. Cascade regulation of the toluene-3-monooxygenase operon (*tbuA1UBVA2C*) of *Burkholderia pickettii* PK01: role of the *tbuA1* promoter (*PtbuA1*) in the

expression of its cognate activator, TbuT. J. Bacteriol. 178:6327-6337.

Cronan, J.E. 1968. Phospholipid alterations during growth of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 95: 2054-2061.

Cruden, D.L., Wolfram, J.H., Rogers, R.D. y Gibson, D.T. 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2723-2729.

Dagley S., Chapman P.J. y Gibson D.T. 1965. The metabolism of beta-phenylpropionic acid by an achromobacter. Biochem. J. 97:643-650..

Dagley, S. 1981. New perspectives in aromatic catabolism. In Lessinger T, Cook AM Hütter R and Nüesch J. (eds) Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds (pp 181-186). Academic Press. New York.

Dagley, S. 1986. Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in Pseudomonads, p.527-555. Ornston L.N. y Sockatch J.R. (ed.). En: The Bacteria. Academic, New York.

Davis, D. H. 1967. Studies on the gram negative hydrogen bacteria and related organisms. Ph.D. Thesis, Univ. of California, Berkeley.

De Lorenzo V. y Timmis K.N. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5 y Tn10-derived minitransposon. Methods in enzymology. 235:386-405.

de Smet, M.J., Kingma, J. y Witholt, B. 1978. The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 506: 64-80.

den Dooren Jong, L. E. 1926. "Bigdrage tot de kennis van het mineralisatieproces." Nijgh & Van Ditmar, Rotterdam.

Diefenbach, R. y Keweloh, H. 1994. Synthesis of *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8 by direct isomerization of the double bond of lipids. Arch. Microbiol. 162: 120-125.

Esteve-Núñez, A., Lucchesi, G. Philipp, B, Schink, B. y Ramos, J.L. 2000. Respiration of TNT by *Pseudomonas* JLR11. J. Bacteriol. In press.

Feist, C.F. y Hegeman, G.D. 1969. Regulation of the meta cleavage pathway for benzoate oxidation by *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **100**:1121-1123.

Fellay, R., Frey, J. y Krisch, H. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. Gene **52**: 147-154.

Fralick, J.A. 1996. Evidente that TolC is required for functioning of the Mar/ACRAB efflux pump of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **178**: 5803-5805.

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.

Gibson, D.T., Abdul, A.S. y Olsen, R.H. 1988. Microbial degradation of aromatic hydrocarbon in hydrogeologic material: microcosm studies, p.53-69. En: Proceedings of the Second National outdoor action conference on aquifer restoration: groundwater and geophysical methods. National Water Well Association, Dublin, Ohio.

Gibson, D.T. and Subramanian, V. 1984 Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson D.T.(ed) Microbial degradation of Organic Compounds (pp 361-369) Marcel Dekker. New York.

Gibson, D.T., Koch, J.R. y Kallio, R. E. 1968. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. Biochemistry **7**:2653-2662.

Gray, P.H.H. y Thornton, H.G. 1928. Zentralbl. Bakteriologie (II) **73**:74.

Hahn, D.R., Solenberg, P.J. y Baltz, R.H. 1991. Tn5099, a *xylE* promoter probe transposon for *Streptomyces* spp. J.Bacteriol. 173:5573-5577..

Haigler, B.E., Pettigrew, C.A. y Spain, J.C. 1992. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150. Appl. Environ. Microbiol. 58:2237-2244.

Hamamoto, T., Takata, N., Kudo, T. y Horikoshi, K. 1994. Effect of temperature and growth phase on fatty acid composition of the psychrophilic *Vibrio* sp. strain no. 5710. FEMS Microbiol. Lett. 119: 77-81.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.

Harayama S. 1984. Transposon mutagenesis analysis of the meta-cleavage pathway operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. J. Bacteriol. 160:251-255.

Harayama S. y Reikik M. 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified in two different gene families. J. Biol. Chem. 264:15328-15333.

Harayama S. y Timmis K.N. 1989. Catabolism of aromatics hydrocarbons by *Pseudomonas*, p.151-174. Hopwood D.A. y Charter K. (ed.). En: Genetics of bacterial diversity. Academic, New York.

Harayama S. y Timmis K.N. 1992. Aerobic biodegradation of aromatics hydrocarbons by bacteria, p.99-156. Sigel H. y Sigel A. (ed.). En: Degradation of environmental pollutants by microorganism and their metalloenzymes. Marcel Dekker Inc, New York.

Harayama S., Kok M. y Neidle E.L. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. Annu. Rev. Microbiol. 46:565-601.

Harayama S., Leppik R.A., Reikik M., Mermond N., Lehrbach P.R., Reineke W. y Timmis K.N. 1986. Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the *xylA* product. J. Bacteriol. 167:455-461.

Harayama S., Rekik M., Wasserfallen A. y Bairoch A. 1987. Evolutionary relationships between catabolic pathways for aromatics: conservation of gene order and nucleotide sequences of catechol oxidation genes of pWW0 y NAH7. Mol. Gen. Genet. 210:241-247.

Harayama S., Rekik M., Wubbolts M., Rose K., Leppik R.A. y Timmis K.N. 1989. Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. J. Bacteriol. 171:5084-5055.

Hartingsvelt, J., Marinus, M. G., and Stouthamer, A. H. 1971. Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* blocked in nitrate or nitrite dissimilation. Genetics 67:469-482.

Hartline, R. A., and Gonsalus, I. C. 1971. Induction specificity and catabolite repression of the early enzymes in camphor degradation by *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 106: 468-478.

Heipieper, H.J., Diefenbach, R. y Keweloh, H. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1847- 1852.

Herrero, M., V. de Lorenzo and 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.

Holtwick, R., Meinhardt, F. y Keweloh, H. 1997. *Cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids: cloning and sequencing of the *cti* gene from *Pseudomonas putida* P8. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4292-4297.

Huertas, M.J. 1999. Supervivencia en suelos de bacterias del género *Pseudomonas* que degradan y metabolizan disolventes orgánicos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Ingram, L.O. 1977. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. Appl. Environ. Microbiol. 33:1233-1236.

- Inoue, A. y Horikoshi, K. 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* **338**:264-266.
- Inoue, A., Nojima, H. y Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *Gene* **96**: 23-28.
- Inouye S., Gomada M., Sangodar U.M.X., Nakazawa A. y Nakazawa T.. 1981. Upstream regulatory sequence for transcriptional activator *XylR* in the first operon of xylene metabolism on the TOL plasmid. *J. Mol. Biol.* **216**:251-260.
- Inouye S., Nakazawa A. y Nakazawa T. 1983. Molecular cloning of gene *xylS* of the TOL plasmid: evidence for positive regulation of the *xylDEGF* operon by *xylS*. *J. Bacteriol.* **148**:413-418.
- Inouye S., Nakazawa A. y Nakazawa T. 1986. Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylS* on the *Pseudomonas putida* TOL plasmid and identification of the protein product. *Gene* **44**:235-242.
- Isken, S. y de Bont, J.A.M. 1996. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J. Bacteriol.* **178**: 6056-6058.
- Johnson B.F. y Stanier R.Y. 1971. Dissimilation of aromatics compounds by *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **107**:468-475.
- Johnson G.R. y Olsen R.H. 1995. Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene-2-monoxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol* **61**:3336-3346.
- Johnson G.R. y Olsen R.H. 1997. Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4047-4052.
- Junker, F. y Ramos, J. L. 1999. Involvement of the *cis/trans* isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **181**:5693-700.
- Kaniga, K., I. Delor and 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.

Kaphammer B.J., Kukor J.J. y Olsen R.H. 1990. Cloning and characterization of a novel toluene degradative pathway from *Pseudomonas pickettii* PK01, p.243. En: Abstr, 90th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol, American Society for Microbiology. Washington D.C.

Kern, W. 1947. Helv. Chim. Acta 30:595.

Keweloh, H. y Heipieper, H.J. 1996. Trans unsaturated fatty acids in bacteria. Lipids 31:129-137.

Keweloh, H., Weyrauch, G. y Rehm, H.J. 1990. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol 33:66-71.

Kieboom, J., Dennis, J.J., de Bont, J.A.M. y Zylstra, G.J. 1998a. Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. J. Biol. Chem. 273:85-91.

Kieboom, J., Dennis, J.J., Zylstra, G.J. y de Bont, J.A.M. 1998b. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. J. Bacteriol. 180:6769-6772.

Kim, K., Lee, S., Lee, K. y Lim, D. 1998. Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. J. Bacteriol. 180: 3692-3696.

Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II and K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166:175-176.

Kukor, J.J. y Olsen, R.H. 1990. Molecular cloning, characterization, and regulation of a *Pseudomonas pickettii* PK01 gene encoding phenol hydroxylase and expression of the gene in *Pseudomonas aeruginosa* PA01c. J.Bacteriol. 172:4624-4630.

Kukor, J.J. y Olsen, R.H. 1991. Genetic organization and regulation of a meta cleavage pathway for catechols produced from catabolism of toluene, benzene, phenol, and cresols by *Pseudomonas pickettii* PK01. J.Bacteriol. 173:4587-4594.

- Lau, P.C.K., Bergeron, H., Labbé, D., Wang, Y., Brousseau, R. y Gibson, D.T. 1994. Sequence and expression of the *todGHI* genes involved in the last three steps of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Gene*. **146**:7-13.
- Lau, P.C.K., Wang, Y., Patel, A., Labbé, D., Bergeron, H., Brousseau, R., Kosnishi, Y. y Rawlings, M. 1997. A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:1453-1458.
- Leahy, J.G. y Olsen, R.H. 1997. Kinetics of toluene degradation by toluene-oxidizing bacteria as a function of oxygen concentration and the effect of nitrate. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**:23-30.
- Leahy, J.G., Johnson, G.R. y Olsen, R.H. 1997. Cross-regulation of toluene monooxygenases by the transcriptional activators TbmR y TbuT. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3736-3739.
- Lendenmann, U. y Spain, J.C. 1996. 2-aminophenol,1,6-dioxygenase: a novel aromatic ring cleavage enzyme purified from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.* **178**:6227-6232.
- Levy, S.B. 1992. Active efflux mechanism for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 695-703.
- Lewis, K., Hooper, D.C. y Ouellete, M. 1997. Multidrug resistance pumps provide bread defense. *Am. Soc. Microbiol. News* **63**: 605-610.
- Li, X., Zhang, L. y Poole, K. 1998. Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J. Bacteriol.* **180**: 2987-2991.
- Loffeld, B. y Keweloh, H. 1996. *Cis/trans* Isomerization of unsaturated fatty acids as possible control mechanism of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* P8. *Lipids* **31**: 811-815.
- Ludwig, M.L., Weber, L.D. y Ballou, D.P. 1984. Characterization of crystals of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biol. Chem.* **259**:14840-14842.
- Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaido, H. y Hearst, J.E. 1993. Molecular cloning and characterization

of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 175: 6299-6313.

Mandelstam, J. y Jacoby, G. A. 1965. Induction and multisensitive end-product repression in the enzymic pathway degrading madelate in *Pseudomonas fluorescens*. Biochem. J. 94, 569-577.

Marqués, S., Ramos, J.L. y Timmis, K.N. 1993. Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL meta fission pathway operon around the transcription initiation point, the *xylTE* and the *xylFJ* region. Biochem. Biophys. Acta. 1216:227-236.

Mars, A.E., Kasberg, T., Kaschabek, S.R., Van Agteren, M.H., Janssen, D.B. y Reineke, W. 1997. Microbial degradation of chloroaromatics: use of the meta-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. J. Bacteriol. 179:4530-4537.

Menn, F.M., Zylstra, G.J. y Gibson, D.T. 1991. Location and sequence of the *todF* gene encoding 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydrolase in *Pseudomonas putida* F1. Gene. 104:91-94.

Migula, W. (1894). Ueber ein neues System der Bakterien. Arb. Bakteriolog. Inst. Karlsruhe 1, 235-238.

Møller, S., Pedersen, A. R., Poulsen, L. K., Arvin, E. y Molin, S. 1996. Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 62:4632-4640.

Murray, K. y Williams, P.A. 1974. Role of catechol and the methylcatechols as inducers of aromatic metabolism in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 117:1153-1157.

Nakai, C., Kagamiyama, H., Nozaki, M., Nakazawa, T., Inouye, S., Elbina, Y. y Nakazawa, A. 1983. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *P. putida* mt-2. J. Biol. Chem. 258:2923-2928.

Nakajima, H., Kobayashi, K., Kobayashi, M., Asako, H. y Aono, R. 1995b. Overexpression of the *robA* gene increases

organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 2302-2307.

Nakajima, H., Kobayashi, M., Negishi, T. y Aono, R. 1995a. *soxRS* gene increased the level of organic solvent tolerance in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **59**: 1323-1325.

Newman, L.M. y Wackett, L.P. 1995. Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. Biochemistry **34**:14006-14076.

Newman, L.M. y Wackett, L.P. 1997. Trichloroethylene oxidation by purified toluene 2-monooxygenase: products, kinetics, and turnover-dependent inactivation. J. Bacteriol. **170**:90-96.

Nikaido, H. 1999. Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. J. Bacteriol. **181**:4-8.

Nishizuka, Y., Ichiyama, A., Nakamura, S. y Hayaishi O. 1962. J. Biol. Chem. **237**:269-272.

Okusu, H., Ma, D. y Nikaido, H. 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli*. Antibiotic-resistance (Mar) mutants. J. Bacteriol. **178**:306-308.

Olsen, R., Kukor, J.J. y Kaphamer, B. 1994. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PK01. J. Bacteriol. **176**:3749-3756..

Ornston, L.N. 1966. The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. Regulation. J. Biol. Chem. **241**:3800-3810.

Palleroni, N.J. 1986. Taxonomy of *Pseudomonas*. In "The Bacteria", Vol. X. Sokatch, J.R. (ed). Academic Press. London. pp 3-25.

Paulsen, I.T., Brown, M.H. y Skurray, R.A. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. **60**:575-608.

Paulsen, I.T., Park, J.H., Choi, P.S. y Saier, Jr, M.H. 1997. A family of Gram-negative bacterial outer membrane

factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 156:1-8.

Pinkart, H.C. y White, D.C. 1997. Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. J. Bacteriol. 179:4219-4226.

Pinkart, H.C., Wolfram, J.W., Rogers, R. y White, D.C. 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to o-xylene. Appl. Environ. Microbiol. 62:1129-1132.

Ramos, J. L., E. Duque, M. J. Huertas and A. Häidour. 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, J.L., Díaz, E., de Dowling, D., Lorenzo, V., Molin, S., O'Gara, F., Ramos, C. y Timmis, K.N. 1994. The behavior of bacteria designed for biodegradation. Bio/Technology 12:1349-1358.

Ramos, J.L., Duque, E., Godoy, P. y Segura, A. 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1 E. J. Bacteriol. 180: 3323-3329.

Ramos, J.L., Duque, E., Rodríguez-Herva, J.-J., Godoy, P., Häidour, A., Reyes, F., y Fernández-Barrero, A.. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. J. Biol. Chem. 272:3887-3890.

Ramos, J.L., Marqués, S. y Timmis, K.N. 1997. Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. Annu. Rev. Microbiol. 51:341-373.

Ramos, J.L., Mermod, N. y Timmis, K.N. 1987. Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding meta-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. Mol. Microbiol. 1:293-300.

Reineke, W., Jeenes, D.J., Williams, P.A. y Knackmuss, H.J. 1982. TOL plasmid pWW0 in constructed halobenzoate-

degrading *Pseudomonas* strains: prevention of *meta* pathway. J. Bacteriol. 150:195-201.

Rekker, R.F. y de Kort, H.M. 1979. The hydrophobic fragmental constant; an extension to a 1000 data point set. Eur. J. Med. Chem. 14: 479-488.

Riegert, U., Heiss, G., Fischer, P. y Stolz, A. 1998. Distal cleavage of 3-chlorocatechol by an extradiol dioxygenase to 3-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde. J. Bacteriol. 180:2849-2853.

Roberts, L. 1987. Discovering microbes with a taste for PCBs. Science 237:p75-77.

Rojo, F., Pieper, D.H., Engesser, K.H., Knackmuss, H.J. y Timmis, K.N. 1987. Assemblage of *ortho* cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. Science 238:1395-1398.

Russell, N.J., Kogut, M. y Kates, K. 1985. Phospholipid biosynthesis in the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola* during adaptation to changing salt concentration. J Gen. Microbiol. 131: 781-789.

Sala-Trepat, J.M., Murray, K. y Williams, P.A. 1972. The metabolic divergence in the *meta* cleavage pathway of catechols by *Pseudomonas putida* NCIB 10015. Eur. J. Biochem. 28:347-356.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Sánchez-Romero, J.M. 1997. Desarrollo de herramientas moleculares para el análisis genético and la generación de nuevos fenotipos en *Pseudomonas*. Tesis Doctoral.

Sands, D. C., Gleason, F. H., and Hildebrand, D. C. 1967. Cytochromes of *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. 94:1785-1786.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Biotechnology 1992;24:104-108.

Selvaraj, G., Iyer, V.N., 1983. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. J. Bacteriol. 156, 1292-1300.

- Shields, M.S., Montgomery, S.O., Chapman, P.J., Cuskey, S.M. y Pritchard, P.H. 1989. Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1624-1629.
- Shields, M.S., Reagin, M.J., Gerger, R.R., Campbell, R. y Somerville, C. 1995. TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1352-1356.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M. y Poolman, B. 1994. Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 8022-8028.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M. y Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201 -222.
- Sikkema, J., Poolman, B., Konings, W.N. y de Bont, J.A.M. 1992. Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J. Bacteriol.* **174**: 2986-2992.
- Söhngen, N.L. 1913. *Centr. Bakteriolog., Parasitenk Abt.* **II** 37:595.
- Stainer, R.Y., Palleroni, N.J., and Doudoroff, M. 1966. The Aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159-271
- Stormer, K. 1908. *Zentralbl. Bakteriolog., Parasitenk. Infek.* **20**:282.
- Suutari, M. y Laakso, S. 1994. Microbiol fatty-acids and thermal adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 129-137.
- Swanson, R.V., Alex, L.A. y Simon, M.I. 1994. Histidine and aspartate phosphorylation: two component system and the limits of homology. *Trends. Biol. Sci.* **19**: 458-490.
- Timmis, K N., Rojo, F. and Ramos, J L. 1988. Prospects for laboratory engineering of bacteria to degradate pollutants. In "Environmental Biotechnology:Reducing Risks from Environmental Chemicals Through Biotechnology". Omenn, G S (ed). New York. Plenum.

- Vílchez, S., Molina, L., Ramos, C. y Ramos, J. L. 2000. Proline catabolism by *Pseudomonas putida*: Cloning, characterization, and expression of the *put* genes in the presence of root exudates. *J. Bacteriol.* **182**:91-99.
- Wagner, R. 1914. *Z. Garngsphysiol.* **4**:289.
- Wang, Y., Rawlings, M., Gibson, D.T., Labbé, D., Bergeron, H., Brousseau, R. y Lau, P.C.K. 1995. Identification of a membrane protein and a truncated LysR-Type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1. *Mol. Gen. Genet.* **246**:570-579.
- Weber, F.J. y de Bont, J.A.M. 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**:225-245.
- Weber, F.J., Isken, S. y de Bont, J.A.M. 1994. *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defense mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**:2013-2017.
- White, D.G., Goldman, J.D., Demple, B. y Levy, S.D. 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS* or *robA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:612-6126.
- Whited, G.M. y Gibson, D.T. 1991a. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**:3010-3016.
- Whited, G.M. y Gibson, D.T. 1991b. Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**:3017-3020.
- Williams, P.A., Shaw, L.M., Pitt, C.W. y Vreal, M.. 1991. *XylUW*, two genes at the start of the upper pathway operon of TOL plasmid pWW0, appear to play no essential part in determining its catabolic phenotype. *Microbiol.* **143**:101-107.
- Worsey, M.J. y Williams, P.A. 1975. Metabolism of toluene and the xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **124**:7-13.

Wright, A. y Olsen, R.H. 1994. Self-mobilization and organization of the genes encoding the toluene metabolic pathway of *Pseudomonas mendocina* KR1. Appl. Environ. Microbiol. **60**:235-244.

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.

Yen, K. y Karl, M.R. 1992. Identification of a new gene, *tmoF*, in the *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. J. Bacteriol. **174**:7253-7261.

Yen, K., Karl, M.R., Blatt, L., Simon, M., Winter, R., Fausset, P., Lu, H., Harcourt, A.A. y Chen, K.K. 1991. Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. J. Bacteriol. **173**:5315-5327.

Young, L. Y. 1984. Anaerobic degradation of aromatic compounds. In " Microbial Degradation of Organic Compounds " (Gibson, DT, ed), pp. 487-523. Dekker, New York.

Zylstra, G.J. y Gibson, D.T. 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **264**:14940-14946.