

4/77

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>613380400</u>
Nº Copia <u>i15499108</u>

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha <u>8/05/2002</u>
ENTRADA NUM. <u>1709</u>

EL SISTEMA Tol-OprL de *Pseudomonas putida*
KT2440. ESTUDIO DE SU FUNCIÓN Y ANÁLISIS
DE SU EXPRESIÓN GÉNICA

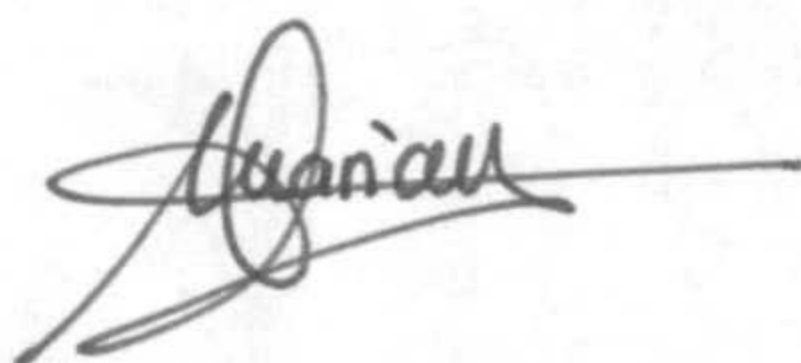
TESIS DOCTORAL



Marian Llamas Lorente
2002

**EL SISTEMA Tol-OprL DE
P. putida KT2440. ESTUDIO DE SU FUNCIÓN Y
ANÁLISIS DE SU EXPRESIÓN GÉNICA**

Memoria que presenta la licenciada en
Biología, Marian Llamas Lorente, para
aspirar al Título de Doctora



Fdo.: Marian Llamas Lorente

Vº Bº del Director



Fdo.: Juan Luis Ramos Martín
Doctor en Biología
Profesor de Investigación del C.S.I.C.

Vº Bº del Director



Fdo.: José Juan Rodríguez Herva
Doctor en Biología

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

ÍNDICE

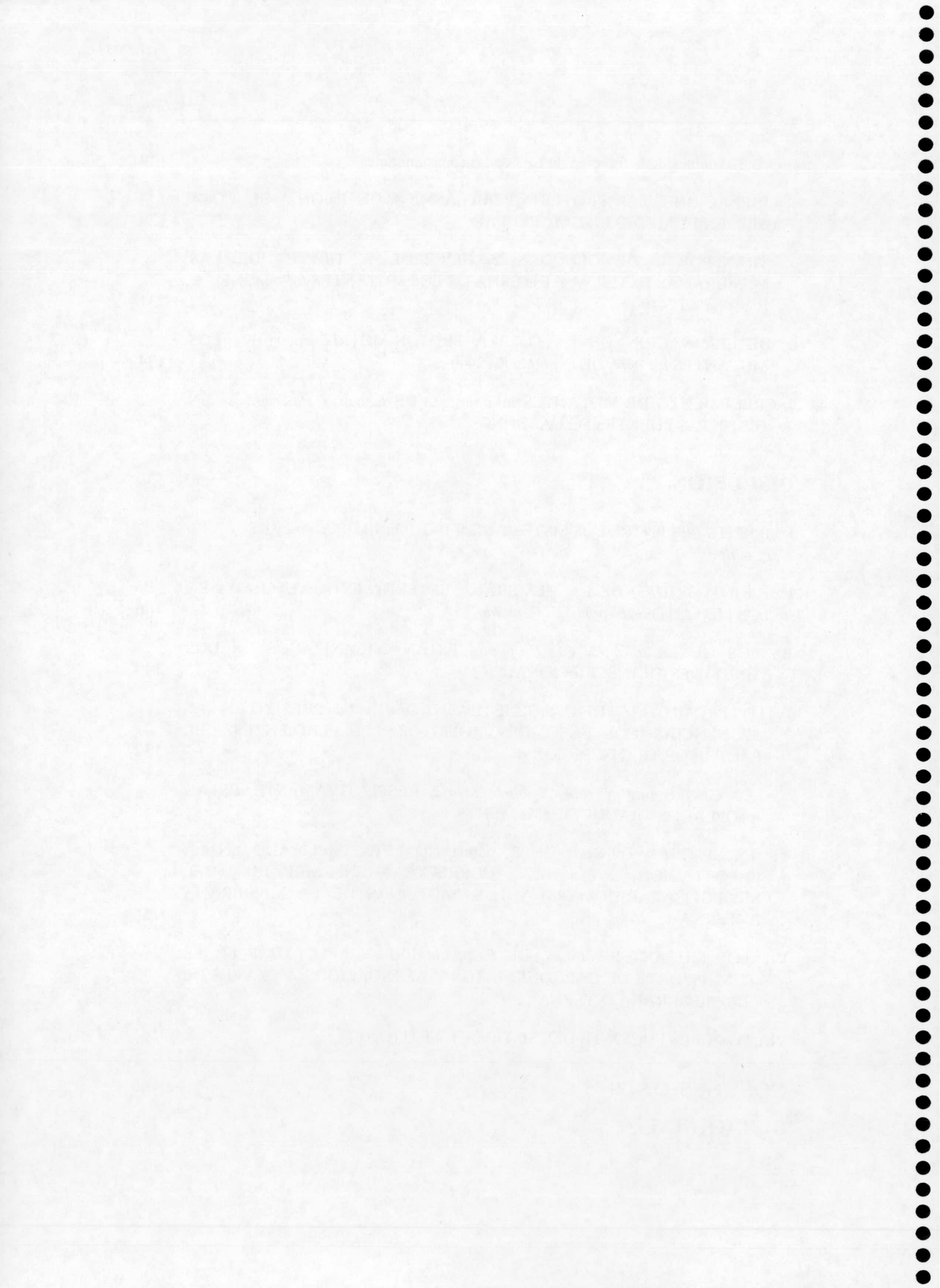
ÍNDICE	ix
ABREVIATURAS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABLAS	xxi
INTRODUCCIÓN	1
1. LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	3
1.1. Estructura y composición de la membrana externa	3
1.1.1. Fosfolípidos	
1.1.2. Lipopolisacáridos (LPS)	3
1.1.3. Proteínas	7
(i) Porinas de difusión general o canales no específicos	7
(ii) Canales de difusión específicos	11
(iii) Receptores de alta afinidad	13
(iv) Lipoproteínas	14
(v) Otras proteínas destacadas	16
1.2. Funciones de la membrana externa	19
1.2.1. La membrana externa como barrera de exclusión y de permeabilidad selectiva	20
1.3. Ensamblaje de los componentes de la membrana externa	23
1.3.1. Fosfolípidos	23
1.3.2. LPS	23
1.3.3. Proteínas	24
2. EL SISTEMA Tol-PAL(OprL)	27
OBJETIVOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	38
1. CEPAS BACTERIANAS Y SU CONSERVACIÓN	43
2. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	45
2.1. Medios de cultivo	45

2.2. Condiciones de cultivo	46
2.3. Antibióticos	46
3. PLÁSMIDOS	46
4. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO	57
5. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL	57
6. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS	58
6.1. Por transformación mediante choque térmico	58
6.2. Por electroporación	58
6.3. Por conjugación	58
7. TÉCNICAS COMUNES DE MANIPULACIÓN DE ADN	59
7.1. Electroforesis de ADN	59
7.2. Recuperación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa	59
7.3. Secuenciación de ADN	59
7.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente ("PCR")	60
7.5. Transferencia de ADN a membrana e hibridación ("Southern blotting")	60
7.6. Otras técnicas de manipulación de ADN	61
8. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES POR INTERCAMBIO ALÉLICO	61
9. ENSAYOS DE MOVILIDAD BACTERIANA	62
10. ENSAYOS DE RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD	62
10.1. Ensayos de resistencia y sensibilidad a antibióticos	62
10.2. Ensayos de resistencia y sensibilidad a SDS, EDTA y deoxicolato	63
11. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	63
11.1. Microscopía de células vivas	63
11.2. Microscopía electrónica de transmisión	64
11.3. Microscopía electrónica de barrido	64
12. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA E INMUNODETECCIÓN ("WESTERN BLOTTING")	64
12.1. Preparación de lisado celular total	64
12.2. Aislamiento de proteínas de la membrana externa	65
12.3. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (EGPA-SDS)	66
12.4. Tinción de proteínas con Azul de Coomassie	66

12.5. Transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección	67
13. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PERIPLÁSMICAS EN EL MEDIO EXTRACELULAR	69
14. ANÁLISIS DE LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)	70
14.1. Preparación de LPS y electroforesis	70
14.2. Tinción de plata específica para LPS	70
15. TÉCNICAS COMUNES DE MANIPULACIÓN DE ARN	71
15.1. Extracción de ARN	71
15.2. Determinación de la concentración de ARN	73
16. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE CEBADOR	73
16.1. Marcaje de cebadores	73
16.2. Reacción de extensión	73
16.3. Separación de cadenas de ADNc mediante electroforesis	74
16.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a transcripción reversa (RT-PCR)	75
17. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA	76
18. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	77
19. EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE CON COMPUESTOS MARCADOS CON ^{14}C	77
19.1. Método de preparación de esferoplastos	77
19.2. Experimento de transporte de ^{14}C -glucosa y ^{14}C -glicerol	78
20. MEDIDA DE LA FUERZA PROTÓN-MOTRIZ (pmf)	79
21. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS	79
RESULTADOS	81
Capítulo I: CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE MUTANTES <i>tol-oprL</i> DE <i>Pseudomonas putida</i>	83
RESUMEN	83
1. CONSTRUCCIÓN DE LOS MUTANTES <i>tol</i> DE <i>P. putida</i> KT2440	84
2. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS MUTANTES <i>tol</i> de <i>P. putida</i> KT2440	90
2.1. Crecimiento de los mutantes <i>tol</i> en medio rico LB	90

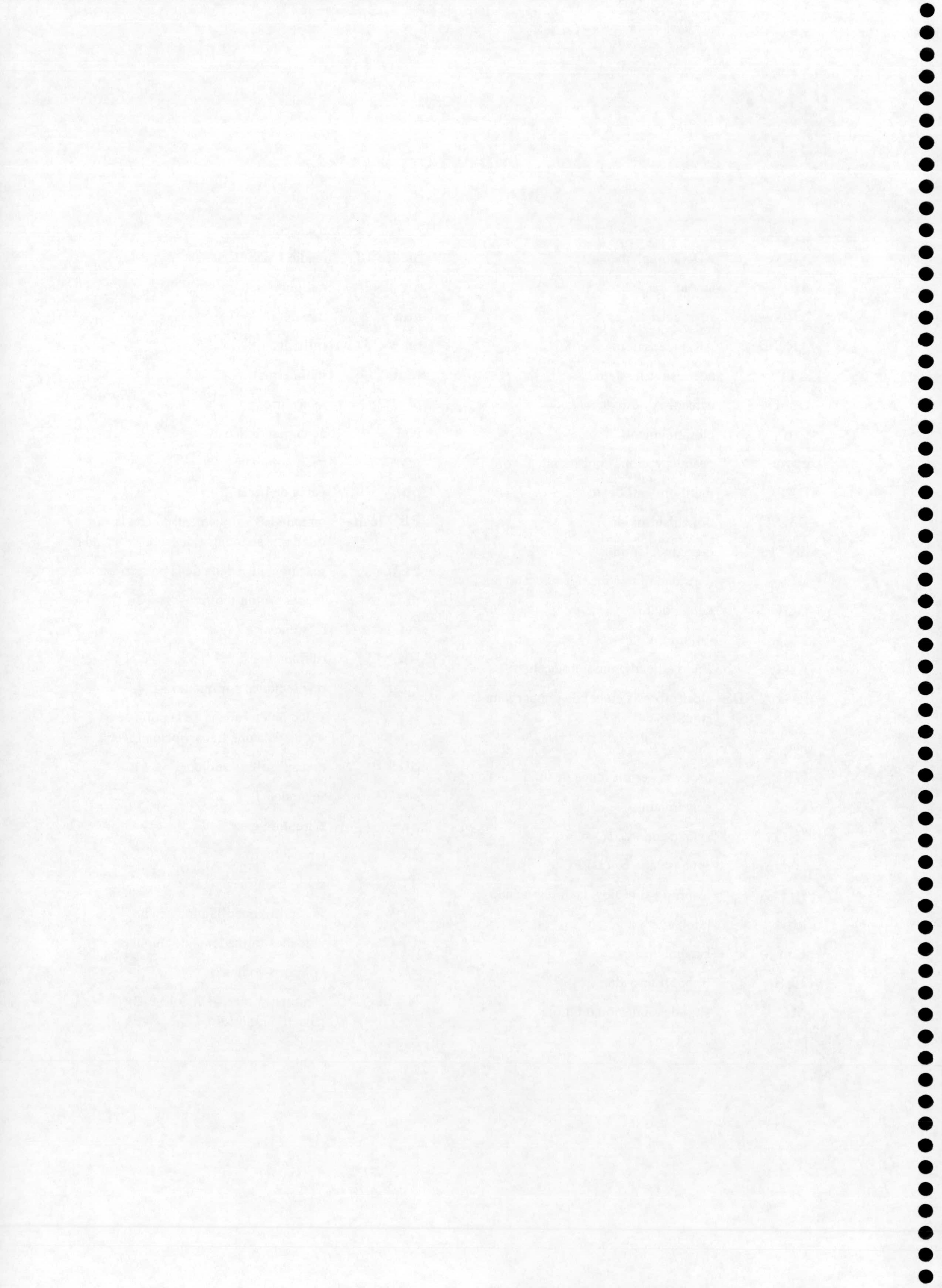
2.2. Ensayos de resistencia/sensibilidad a diferentes compuestos	91
2.3. Observación de los mutantes <i>tol</i> al microscopio óptico y electrónico	93
3. LIBERACIÓN DE ENZIMAS PERIPLÁSMICOS AL MEDIO EXTRACELULAR	95
Capítulo II: ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES <i>tol-oprL</i> de <i>Pseudomonas putida</i>	99
RESUMEN	99
1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS OprL y TolA de <i>P. putida</i>	101
2. IDENTIFICACIÓN DEL PUNTO DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE <i>oprL</i>	102
3. IDENTIFICACIÓN DE OTROS POSIBLES PROMOTORES DE LOS GENES <i>tol-oprL</i> DE <i>P. putida</i>	105
4. ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES <i>tol-oprL</i> DE <i>P. putida</i> MEDIANTE RT-PCR	107
5. EFECTO DE LA FASE DE CRECIMIENTO Y DE LA CONCENTRACIÓN DE HIERRO EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>tol-oprL</i> de <i>P. putida</i> KT2440	107
6. ANÁLISIS DE FUSIONES TRADUCCIONALES DE LOS GENES <i>tol-oprL</i> DE <i>P. putida</i> AL GEN <i>lacZ</i>	111
Capítulo III: PAPEL DEL SISTEMA Tol-OprL EN EL TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS Y AMINOÁCIDOS A TRAVÉS DE LA ENVUELTA CELULAR	117
RESUMEN	117
1. CRECIMIENTO DE LOS MUTANTES <i>tol-oprL</i> DE <i>P. putida</i> EN DISTINTAS FUENTES DE CARBONO	118
2. CONSTRUCCIÓN DE UN MUTANTE <i>oprB</i> DE LA CEPA <i>P. putida</i> KT2440	119
3. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA EXTERNA DE LOS MUTANTES <i>tol-oprL</i> de <i>P. putida</i>	123
3.1. Estudio de la composición de proteínas de la membrana externa	123
3.3.1. Análisis de la proteína OprF en la membrana externa de los mutantes <i>tol-oprL</i> de <i>P. putida</i> KT24440	124
3.3.2. Análisis de la proteína OprD en la membrana externa de los mutantes <i>tol-oprL</i> de <i>P. putida</i> KT24440	127
3.3.3. Análisis de la proteína OprB en la membrana externa de los mutantes <i>tol-oprL</i> de <i>P. putida</i> KT24440	128

3.2. Análisis de la fracción de LPS de las cepas mutantes	129
4. LIBERACIÓN DE LA PROTEÍNA PERIPLÁSMICA DE UNIÓN A GLUCOSA (GBP) EN EL MEDIO EXTRACELULAR	129
5. TRANSPORTE DE GLUCOSA Y GLICEROL A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS EXTERNA E INTERNA DE LOS MUTANTES <i>tol-oprL</i> DE <i>P. putida</i> KT2440	131
6. DETERMINACIÓN DE LA FUERZA PROTÓN-MOTRIZ (pmf) EN LOS MUTANTES <i>tol-oprL</i> DE <i>P. putida</i> KT2440	134
7. CRECIMIENTO DE MUTANTES <i>tol-pal(oprL)</i> DE <i>E. coli</i> Y <i>P.aeruginosa</i> EN DISTINTAS FUENTES DE CARBONO	136
DISCUSIÓN	139
I. SIMILITUDES ENTRE LOS SISTEMAS Tol-PAL (OprL) DE <i>E. coli</i> y de <i>P. putida</i>	142
II. LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA ESTA ALTERADA EN LOS MUTANTES <i>tol-oprL</i> DE <i>P. putida</i>	146
III. LOS GENES <i>tol-oprL</i> DE <i>P. putida</i> ESTÁN ORGANIZADOS EN DOS UNIDADES TRANSCRIPCIONALES	149
IV. LOS PROMOTORES DE LOS GENES <i>tol-oprL</i> DE <i>P. putida</i> PRESENTAN LAS SECUENCIAS CONSENSO DE PROMOTORES DEPENDIENTES DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN σ^{70}	152
V. LOS GENES <i>tolR</i> Y <i>tola</i> , Y <i>oprL</i> Y <i>orf2</i> , RESPECTIVAMENTE, ESTÁN ACOPLADOS TRADUCCIONALMENTE	155
VI. EL SISTEMA Tol-OprL DE <i>P. putida</i> NO ESTÁ IMPLICADO EN LA EXPORTACIÓN Y EL CORRECTO ENSAMBLAJE DEL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) Y LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA	156
VII. LOS MUTANTES <i>tol-oprL</i> DE <i>P. putida</i> ESTÁN AFECTADOS EN EL TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS Y AMINOACIDOS A TRAVÉS DE LA MEMBRANA INTERNA	157
VIII. POSIBLES FUNCIONES DEL SISTEMA Tol-PAL(OprL)	161
CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA	169



ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario	medio LB	medio Luria-Bertani
Ap	ampicilina	mg	miligramos
ARNasa	ribonucleasa	min	minuto(s)
ARNm	ARN mensajero	ml	mililitros
ATP	adenosin trifosfato	mm	milímetros
C23O	catecol-2,3-dioxigenasa	μl	microlitros
Cm	cloramfenicol	Nal	ácido nalidíxico
cpm	desintegraciones por minuto	p/v	peso/volumen
DEPC	dietil pirocarbonato	pb	pares de bases
DMSO	dimetilsulfóxido	PBS-leche	tampón PBS suplementado con la cantidad que se indique de leche desnatada
dNTPs	desoxinucleótidos	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
DO₆₆₀	densidad óptica medida a $\lambda=660$ nm	pmf	fuerza protón-motriz
DOC	deoxicolato	ref.	referencia
DTT	ditiotreitól	Rif	rifampicina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	rpm	revoluciones por minuto
EGPA-SDS	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una transcripción reversa
Fig.	figura	SDS	dodecil sulfato sódico
GBP	proteína periplásmica de unión a glucosa	seg	segundo(s)
Gm	gentamicina	Sm	estreptomicina
H₂O_d	agua desionizada	Tc	tetraciclina
H₂O_{DEPC}	agua tratada con DEPC	TCA	ácido tricloroacético
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido	Tris	tris(hidroximetil)aminometano
kb	kilobases	UFC	unidades formadoras de colonias
Km	kanamicina	v/v	volumen/volumen
LPS	lipopolisacárido	X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
MCS	sitio de clonación múltiple		

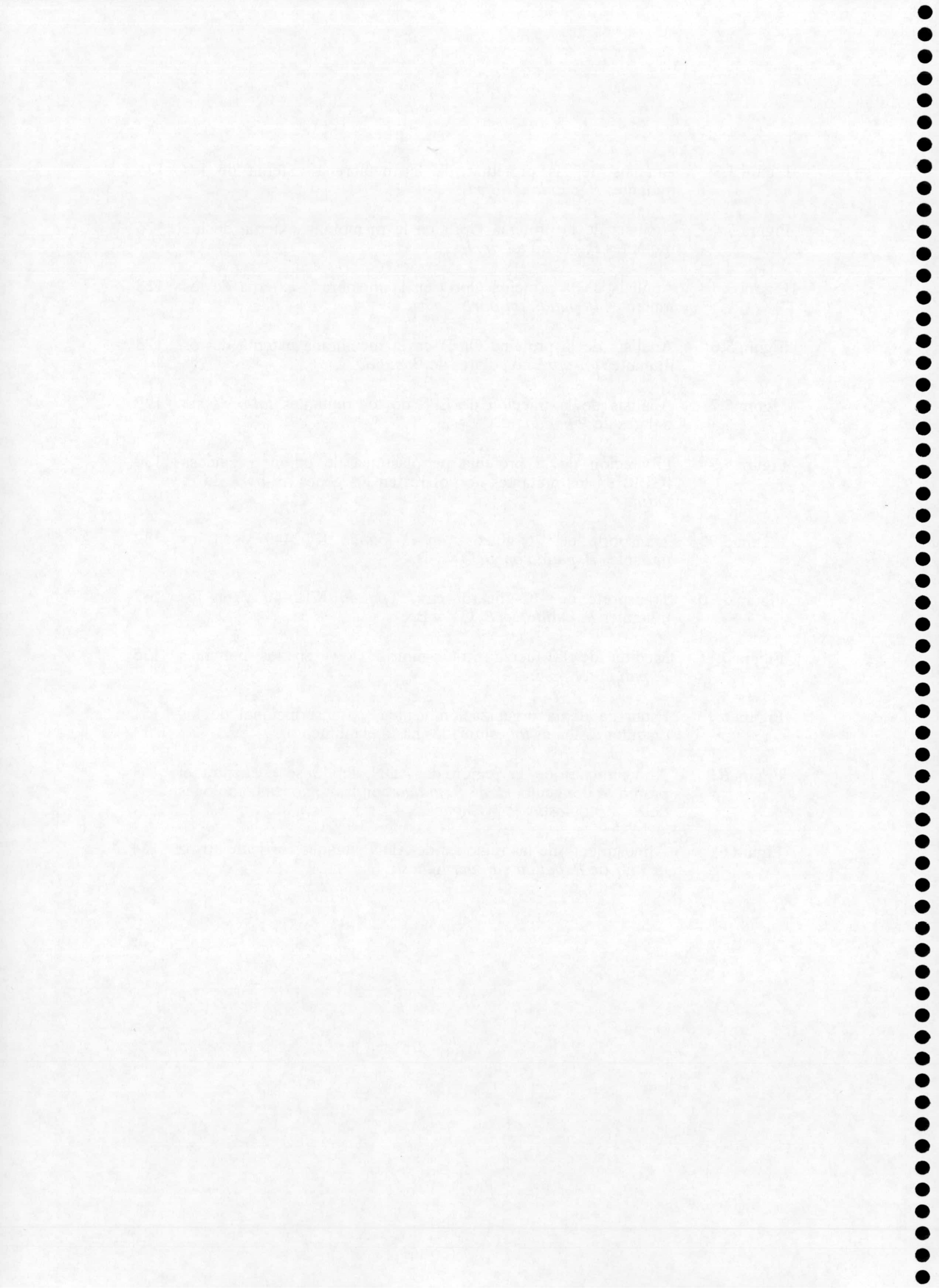


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Membrana externa	4
Figura 1.2	Estructura de una molécula de LPS	5
Figura 1.3	Patrón de plegamiento de la porina OmpF	9
Figura 1.4	Ruta propuesta para la biosíntesis de la lipoproteína de Braun (Lpp)	15
Figura 1.5	Modelo tridimensional del sominio amino terminal de OprF	18
Figura 1.6	Posible esquema de ensamblaje y secreción de LPS	24
Figura 1.7	Sistema Tol-PAL	28
Figura 1.8	Modelo propuesto para la translocación de la colicina A	32
Figura 1.9	Modelo de transducción de energía dependiente de TonB	
Figura 1.10	Visión periplásmica del modelo de ensamblaje propuesto para los segmentos transmembrana del complejo de membrana interna TolQ-R-A	34
Figura 2.1	Plásmido pBBR1MCS-5	48
Figura 2.2	Plásmido pCHESI Ω Km	49
Figura 2.3	Interposón Ω -Km del plásmido pHP45 Ω Km	50
Figura 2.4	Plásmido pJB3Km1	51
Figura 2.5	Plásmido pKNG101	52
Figura 2.6	Plásmido pMLB1034	53
Figura 2.7	Plásmido pUC18	54
Figura 3.1	Secuencia correspondiente a los genes ' <i>ruvB</i> , <i>orf1</i> , <i>tolQ</i> , <i>tolR</i> , <i>tolA</i> , <i>tolB</i> , <i>oprL</i> , <i>orf2</i> , <i>orf3</i> y <i>orf4</i> de <i>P. putida</i> KT2440	85
Figura 3.2	Esquema de la región de 7.577 pb del cromosoma de <i>P. putida</i> que contiene el conjunto de genes <i>tol-oprL</i>	85

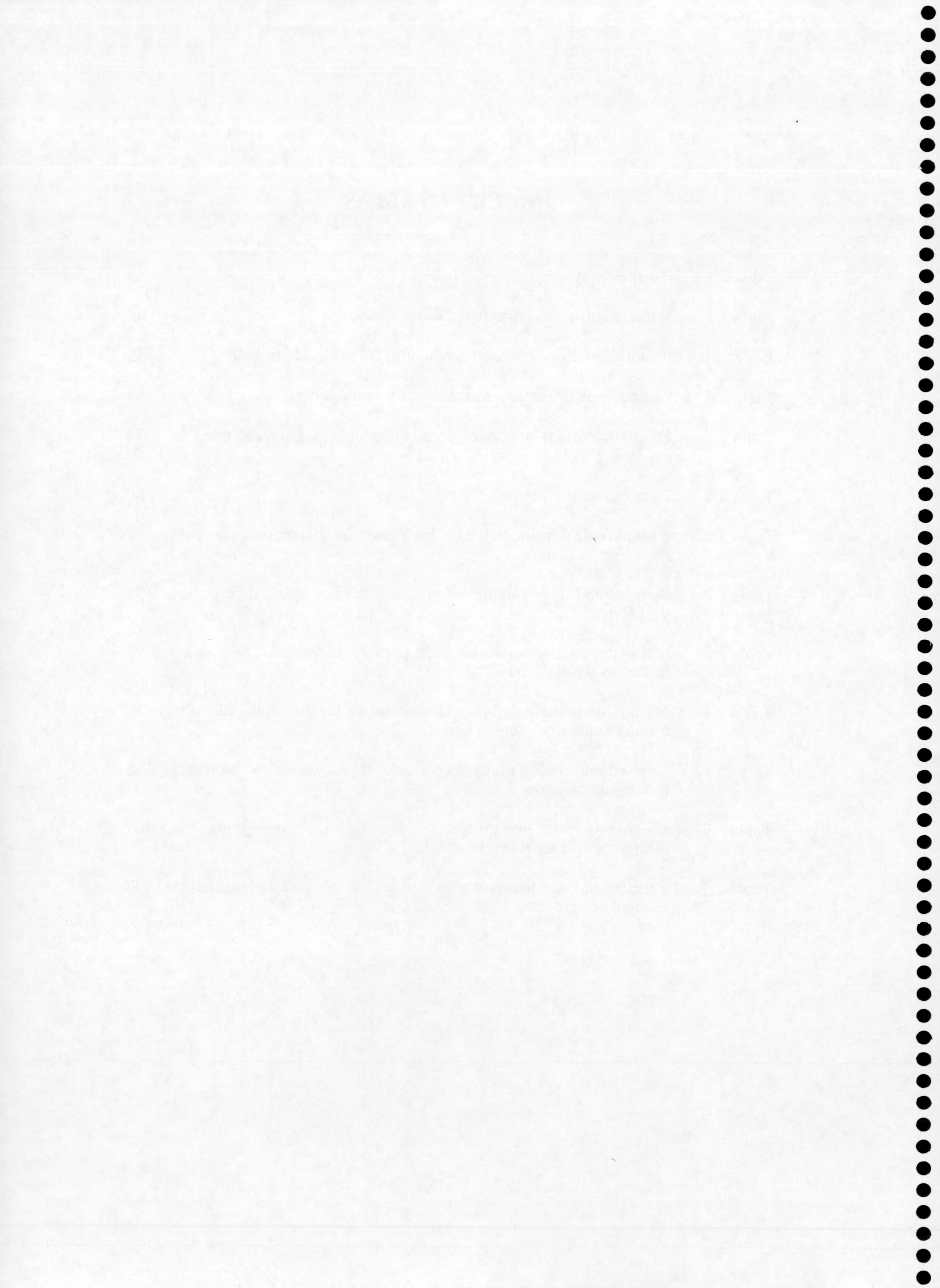
Figura 3.3	Estrategia seguida para la construcción del mutante <i>P. putida</i> QΩ y análisis mediante hibridación de ADN de la región donde se encuentra el gen <i>tolQ</i>	89
Figura 3.4	Microscopía electrónica de barrido de células de <i>P. putida</i> KT2440 y de algunos de los mutantes <i>tol-oprL</i>	94
Figura 3.5	Microscopía electrónica de transmisión de <i>P. putida</i> KT2440 y de algunos de los mutantes <i>tol-oprL::xylE</i>	95
Figura 3.6	Liberación de β-lactamasa periplásmica en los mutantes <i>P. putida tol-oprL::xylE</i>	97
Figura 4.1	Inmunodetección de OprL en extractos de proteína celular total de <i>P. putida</i> KT2440 y de diferentes mutantes <i>tol-oprL</i>	101
Figura 4.2	Inmunodetección de TolA en extractos de proteína celular total de <i>P. putida</i> KT2440 y de los mutantes <i>tol-oprL</i> polares y no polares	103
Figura 4.3	Determinación del punto de iniciación de la transcripción del gen <i>oprL</i> de <i>P. putida</i> KT2440	104
Figura 4.4	Determinación del punto de iniciación de la transcripción del gen <i>orf1</i> de <i>P. putida</i> KT2440	106
Figura 4.5	Organización de los genes <i>tol-oprL</i> en <i>P. putida</i> KT2440	108
Figura 4.6	Análisis de la expresión de <i>oprL</i> en distintas fases de crecimiento	109
Figura 4.7	Mapa de la agrupación génica <i>tol-oprL</i> de <i>P. putida</i> KT2440 y de la posición de las fusiones transcripcionales y traduccionales al gen <i>lacZ</i>	111
Figura 4.8	Efecto de la fase de crecimiento (A) y de la concentración de hierro (B) en la expresión de los genes <i>oprL</i> y <i>orf1</i> de <i>P. putida</i> KT2440	112
Figura 4.9	Esquema de las estructuras secundarias potenciales predichas en el ARNm de las regiones intergénicas <i>tolR-tolA</i> (A) y <i>oprL-orf2</i> (B)	114
Figura 5.1	Estrategia seguida para la construcción del mutante <i>P. putida oprB</i> y análisis mediante hibridación de ADN y por PCR de la región donde se encuentra el gen <i>oprB</i>	121
Figura 5.2	Crecimiento de la cepa silvestre <i>P. putida</i> KT2440 y de su mutante isogénico <i>P. putida oprB</i> en medio mínimo con distintas fuentes de carbono (A), así como de los mutantes <i>P. putida tol-oprL</i> no polares de <i>P. putida</i> en glucosa (B) y glicerol (C)	123

Figura 5.3	Análisis de las proteínas de la membrana externa de los mutantes <i>P. putida tol-oprL</i>	124
Figura 5.4	Análisis de la proteína OprF en la membrana externa de los mutantes <i>P. putida tol-oprL</i>	126
Figura 5.5	Análisis de la proteína OprD en la membrana externa de los mutantes <i>P. putida tol-oprL</i>	128
Figura 5.6	Análisis de la proteína OprB en la membrana externa de los mutantes <i>tol-oprL</i> no polares de <i>P. putida</i>	128
Figura 5.7	Análisis de la fracción de LPS de los mutantes <i>tol-oprL</i> no polares de <i>P. putida</i>	129
Figura 5.8	Liberación de la proteína periplásmica de unión a glucosa (GBP) en los mutantes no polares en los genes <i>tol-oprL</i> de <i>P.</i> <i>putida</i>	130
Figura 5.9	Transporte de ¹⁴ C-glucosa en <i>P. putida</i> KT2440 y en los mutantes <i>P. putida oprB</i> , QX y BX	132
Figura 5.10	Transporte de ¹⁴ C-glicerol en <i>P. putida</i> KT2440 y en los mutantes <i>P. putida oprB</i> , QX y BX	133
Figura 5.11	Medida de la fuerza protón-motriz ($\Delta\Psi$) en los mutantes <i>P. putida tol-oprL</i>	135
Figura 6.1	Esquema de la organización génica y transcripcional de los distintos sistemas <i>tol</i> estudiados hasta el momento	151
Figura 6.2	Alineamiento de la región de ADN donde se encuentra el promotor del gen <i>oprL</i> de <i>P. putida</i> con las regiones homólogas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. syringae</i>	153
Figura 6.3	Alineamiento de las regiones de ADN situadas corriente arriba de <i>orf1</i> de <i>P. putida</i> y <i>P. aeruginosa</i>	154

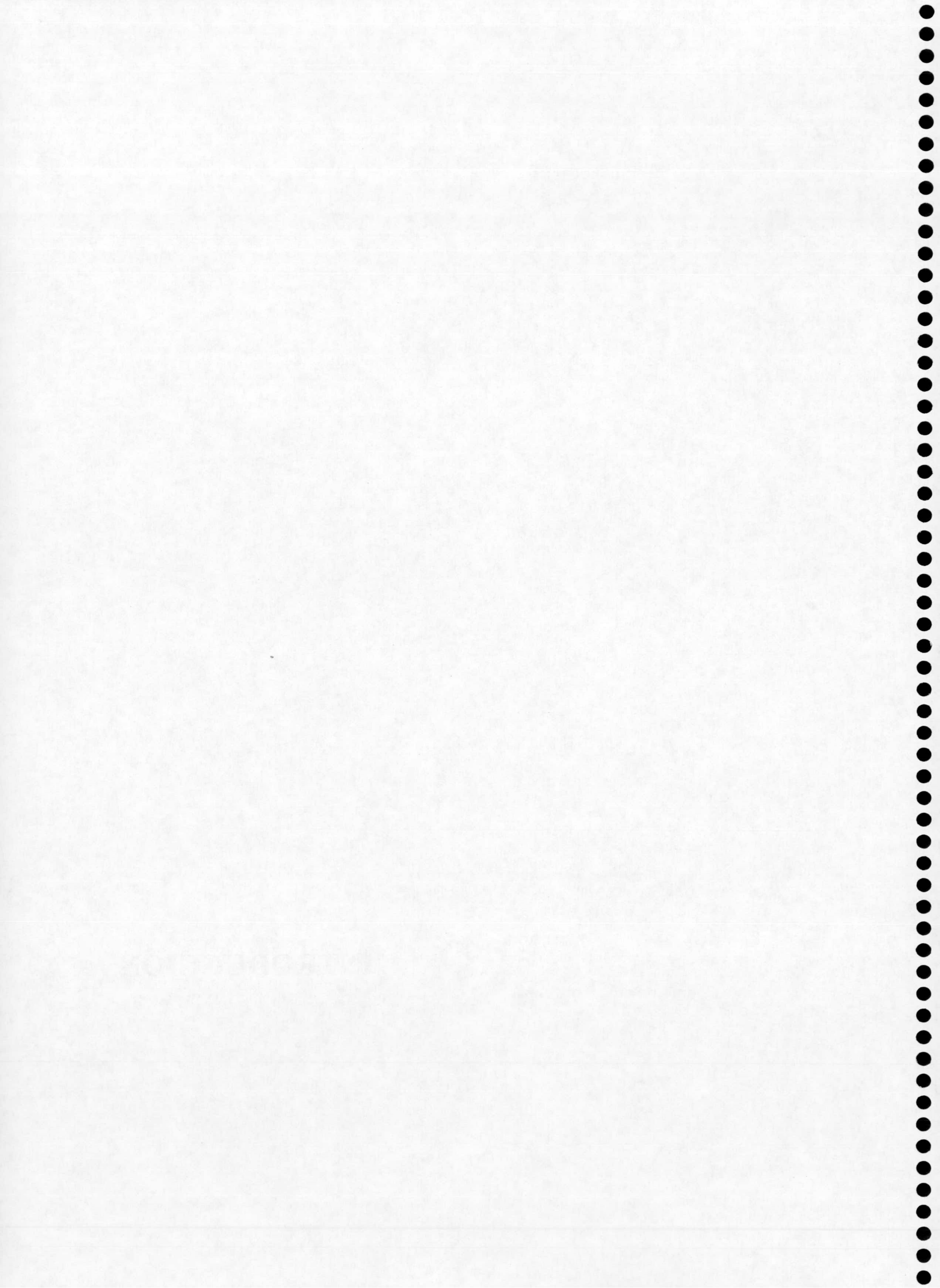


ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Estirpes bacterianas	43
Tabla 2.2	Vectores utilizados en este trabajo	46
Tabla 2.3	Plásmidos de nueva construcción utilizados en este trabajo	55
Tabla 2.4	Anticuerpos primarios utilizados en este trabajo	68
Tabla 2.5	Oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de extensión	74
Tabla 2.6	Direcciones de Internet	80
Tabla 3.1	Características principales de los genes del sistema <i>tol-oprL</i> de <i>P. putida</i>	87
Tabla 3.2	Sensibilidad de los mutantes <i>tol-oprL</i> de <i>P. putida</i> a detergentes y EDTA	91
Tabla 3.3	MICs de diferentes antibióticos para <i>P. putida</i> KT2440 y los mutantes <i>tol-oprL::xylE</i>	92
Tabla 4.1	Medida de la actividad β -galactosidasa de las diferentes fusiones traduccionales <i>tol-oprL::lacZ</i>	115
Tabla 5.1	Crecimiento de los mutantes <i>tol-oprL</i> de <i>P. putida</i> en diferentes fuentes de carbono	118
Tabla 5.2	Crecimiento de los mutantes <i>tol-oprL</i> de <i>P. aeruginosa</i> en diferentes fuentes de carbono	137
Tabla 5.3	Crecimiento de los mutantes <i>tol-pal</i> de <i>E. coli</i> en diferentes fuentes de carbono	137



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

La envoltura celular que rodea al citoplasma de las células bacterianas está formada por la membrana interna o citoplásmica y por la pared celular. Las bacterias gram positivas y gram negativas difieren considerablemente en la estructura y composición de dicha pared. Así, en las bacterias gram negativas la pared celular se compone de una membrana externa que rodea a una monocapa de peptidoglicano (Fig. 1. 1). De esta forma, la membrana externa de las bacterias gram negativas constituye la interfase entre el medio ambiente y el interior celular, y como tal, juega un papel crucial al determinar que sustancias penetran en la célula y cuales se exportan al exterior celular, además de ser la superficie a través de la cual se produce la interacción con las moléculas, superficies u otras células del medio circundante, por ejemplo durante los procesos de simbiosis o patogénesis (Hancock, 1997; Moran, 1996; Nikaido, 1999). En las tres últimas décadas la membrana externa bacteriana se ha estudiado con bastante profundidad, y en consecuencia, su visión ha variado considerablemente desde el primitivo modelo de cubierta tipo cápsula, hasta su imagen actual de membrana dinámica y multifuncional implicada en muchos procesos celulares importantes. *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sv. Typhimurium y *Pseudomonas aeruginosa* constituyen tres de las especies bacterianas más estudiadas a nivel de membrana externa.

1. LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

1.1. Estructura y composición de la membrana externa

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

1.1.1. Fosfolípidos

Los fosfolípidos de la membrana externa se localizan únicamente en su monocapa interna y son similares a los de la membrana interna, con un ligero predominio de fosfatidiletanolamina con respecto a esta última (Lugtenberg y van Alphen, 1983).

1.1.2. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es un glicolípido anfipático, componente esencial de las bacterias gram negativas, que se localiza exclusivamente en la monocapa externa de la membrana

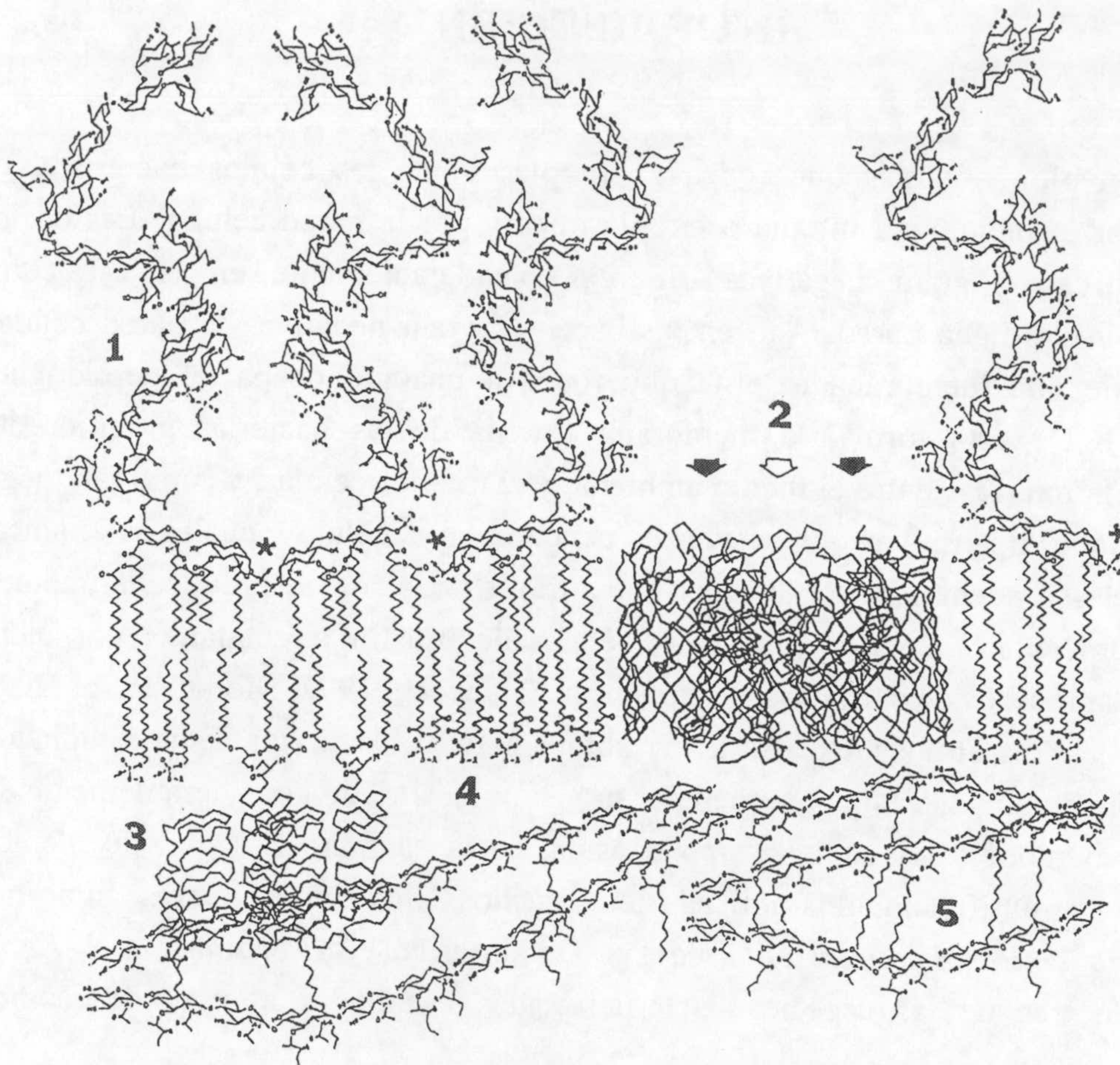


Figura 1.1. Membrana externa. Vista lateral de un modelo químico de una sección de la membrana externa de *E. coli*. Se indican las moléculas de LPS (1), un trímero de la porina OmpF (2), varias moléculas de lipoproteína (3), los fosfolípidos (4), el peptidoglicano (5) y los sitios de unión para cationes divalentes propuestos como estabilizadores de la membrana (*). Para simplificar, el antígeno O del LPS se muestra con sólo dos unidades de oligosacárido (aunque puede contener más de 40 unidades). En el esquema de la sección del trímero de OmpF se indica la posición de los canales hidrofílicos, dos de ellos en el frente (flechas negras) y un tercero en la parte posterior (flecha blanca). El extremo C-terminal de las lipoproteínas está unido (covalente o no covalentemente) a la capa de peptidoglicano. Para mayor claridad, en el caso de OmpF, de las lipoproteínas y de las cadenas peptídicas del peptidoglicano, sólo se indica el esqueleto principal de los aminoácidos. (Obtenido de Hancock *et al.*, 1994).

externa. El LPS consta de una región hidrofóbica de anclaje a la membrana, el lípido A, altamente conservada (incluso a nivel de género); de una región central de oligosacárido denominada núcleo (*core*, en inglés) que se divide a su vez en dos partes, el núcleo interno (que se une al lípido A) y el núcleo externo; y de una región hidrofílica altamente variable de naturaleza polisacáridica, denominada antígeno O, cadena lateral O, o polisacárido O (Fig. 1.2). Ésta última es la fracción inmunodominante de la

1. Introducción

molécula y, basándose en ella, una especie bacteriana dada se puede clasificar en distintos serotipos (por ej., en *Salmonella enterica* existen más de 600 serotipos agrupados de acuerdo a las reacciones serológicas cruzadas) o en distintos tipos

A: *S. enterica* sv. Typhimurium LT2

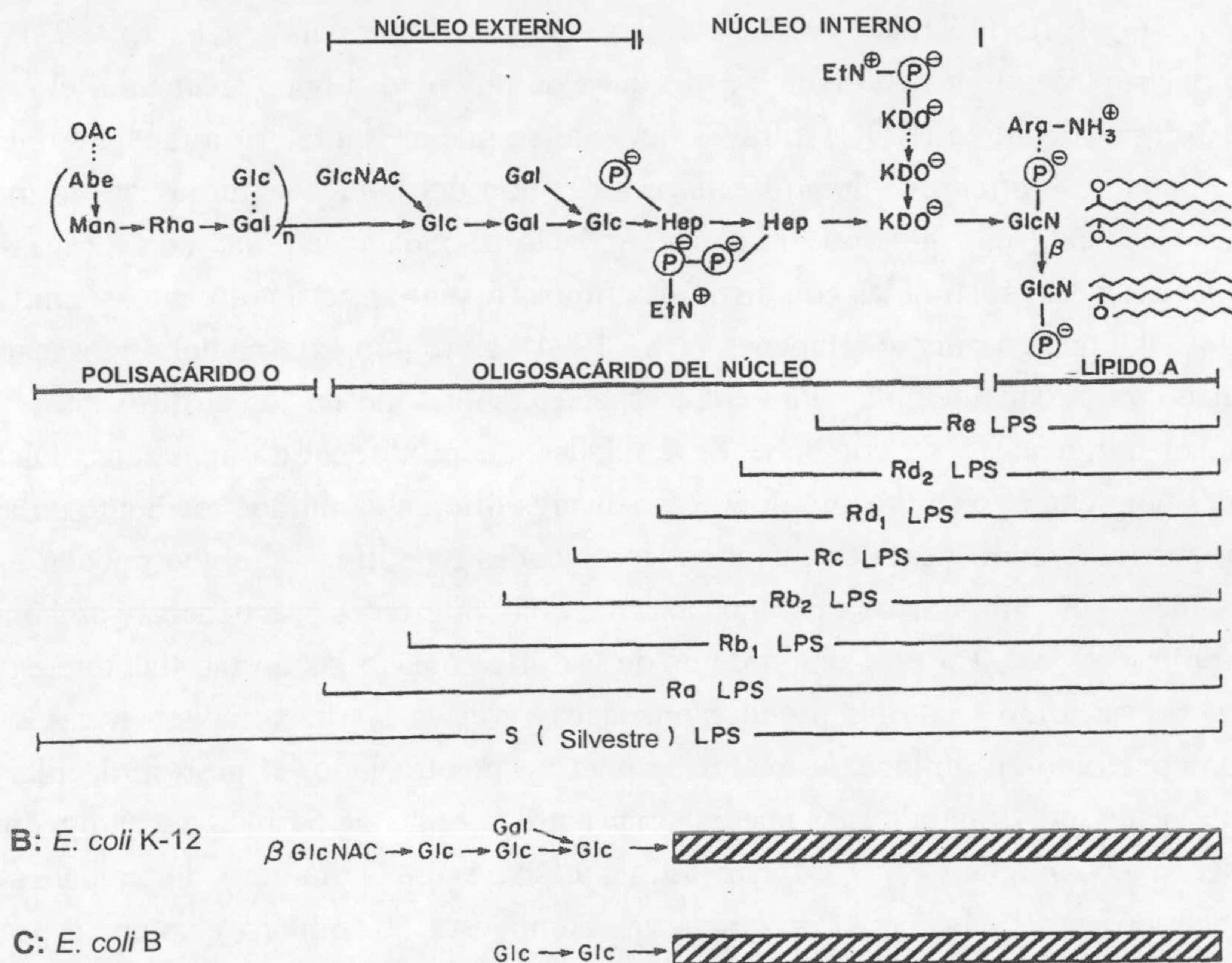


Figura 1.2. Estructura de una molécula de LPS. (A) LPS de *S. enterica* sv. Typhimurium LT2. Ra, Rb₁, etc. representan los distintos tipos químicos de los LPS mutantes producidos. (B) LPS de *E. coli* K-12. Las cepas de laboratorio derivadas de *E. coli* K-12 carecen del antígeno O, debido a una mutación por inserción en el último gen del operón *rfb*, que codifica una ramnosiltransferasa (Stevenson *et al.*, 1994). (C) LPS de *E. coli* B. Esta cepa y sus derivadas tampoco poseen antígeno O y carecen además de parte del núcleo del LPS. En B y C, las regiones representadas por los rectángulos rallados poseen una estructura prácticamente idéntica a la región correspondiente del LPS de *S. enterica* sv. Typhimurium (si bien existen pequeñas diferencias). Abreviaturas: Abe, abecucosa; Man, D-manosa; Rha, L-ramnosa; Gal, D-galactosa; OAc, O-acetilo; GlcNAc, N-acetil-D-glucosamina; Hep, L-glicero-D-mano-heptosa; KDO, ácido 2-ceto-3-desoxioctónico; EtN, etanolamina; P, fosfato; Glc, D-glucosa; GlcN, D-glucosamina; Ara-NH₃⁺, 4-aminoarabinosa. Todos los residuos de heptosa y hexosa de la región del núcleo están unidos a través de enlaces α, a menos que se indique de otro modo. Las líneas onduladas representan los residuos de ácidos grasos. (Obtenido de Nikaido, 1996a).

químicos (según su composición de azúcares). Por su parte, la región correspondiente al lípido A posee propiedades de endotoxina (siendo la responsable del choque séptico en el hombre y otros animales).

En enterobacterias, el lípido A está constituido por un esqueleto de dos glucosaminas unidas por un enlace $\beta(1\rightarrow6)$, al cual se unen 6 ó 7 residuos de ácidos grasos poco usuales, todos saturados, y con una longitud que varía entre 10 y 21 carbonos (Fig.1.2) (Nikaido, 1996a; Reeves, 1994; Schnaitman y Klena, 1993). La región del núcleo interno contiene 2-3 residuos de una octosa poco frecuente, el ácido 2-ceto-3-desoxioctónico (KDO) a través del cual se une al lípido A, unidos a su vez a dos residuos de *L-glicero-D-mano*-heptosa. La región del núcleo externo está formada por hexosas (por ej., glucosa, ramnosa, galactosa, galactosamina, son típicas en enterobacteriáceas) sustituidas con distintos grupos (fosfato, pirofosfato, etc.) y unidas a la heptosa del núcleo interno (Hancock *et al.*, 1994). La región externa del oligosacárido del núcleo varía considerablemente entre especies, sobretodo en los sustituyentes. Por último, el antígeno O se compone de unidades de oligosacárido repetidas. Dichas unidades contienen generalmente de 3 a 5 azúcares diferentes unidos mediante enlaces específicos (heteropolisacáridos), aunque las unidades repetitivas también pueden estar constituidas por un único tipo de azúcar con diferentes secuencias de unión (homopolisacáridos). En este sentido, una de las diferencias más destacadas que existe entre el polisacárido O de las pseudomonadáceas y el de las bacterias entéricas es el elevado contenido en aminoazúcares del primero. Por otro lado, el peso molecular de cada molécula individual de LPS puede variar entre 8 y más de 54 kDa dependiendo de si posee o no antígeno O, y en este último caso según el número de unidades de oligosacárido repetidas por las que esté compuesto. También existen especies bacterianas (como *Neisseria* sp., *Haemophilus influenzae* o *Bordetella pertussis*) que no producen polisacáridos O largos, poseyendo en su lugar una corta región de oligosacárido (de unos 10 monosacáridos) unida al lípido A. Dichas moléculas se denominan lipooligosacáridos (LOS). Incluso en una misma célula bacteriana, las moléculas de LPS muestran una gran heterogeneidad: la mayoría carecen de la cadena lateral O, denominándose R-LPS (del inglés *rough* LPS), estando el resto sustituidas por un número variable de unidades de oligosacárido, responsables del típico patrón de bandas escalonado que se observa al separar una preparación de LPS mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Se sabe por ejemplo, que en una célula dada de *P. aeruginosa*, las moléculas de LPS que poseen antígeno O, denominadas S-LPS (del inglés *smooth* LPS), constituyen menos del 10% del LPS total, pero aún así son suficientes para crear una cubierta de polisacárido que se extiende a más de 40 nm de la superficie celular. Además, una misma especie puede poseer más de un tipo de LPS, como ocurre en el caso de *Klebsiella*, *P. aeruginosa* y *Bordetella pertussis*.

P. aeruginosa, por ejemplo, expresa simultáneamente dos formas distintas de LPS: un homopolímero neutro conservado antigénicamente, conocido como banda A, cuyo polisacárido O está formado por repeticiones de un trisacárido compuesto por unidades de D-ramnosa unidas por enlaces $\alpha 1\rightarrow 2$, $\alpha 1\rightarrow 3$ y $\alpha 1\rightarrow 3$, y un heteropolímero conocido como banda B según el cual *P. aeruginosa* se clasifica en 20 serotipos diferentes.

Entre sus diversas funciones, las moléculas de LPS estabilizan, anclan y/o orientan las proteínas de la membrana externa. De hecho, se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que el ensamblaje de las proteínas de la membrana externa en forma de trímeros es dependiente del LPS (Laird *et al.*, 1994; Ried *et al.*, 1990; Sen y Nikaido, 1991).

1.1.3. Proteínas

Aproximadamente un 50% del total de los componentes que forma de la membrana externa está constituido por proteínas. La membrana externa contiene un número limitado (generalmente de 3 a 8) proteínas mayoritarias, presentes en cantidades muy elevadas (de 50.000 a 200.000 copias por célula) lo que las sitúa entre las proteínas más abundantes de la célula. Además de éstas proteínas principales, también existen un gran número de proteínas minoritarias (entre 50 y 100). En general, las proteínas de la membrana externa suelen presentar una estructura de barril β (Koebnik *et al.*, 2000). A continuación se describen los principales grupos de proteínas de la membrana externa:

(i) Porinas de difusión general o canales no específicos: son proteínas que forman canales inespecíficos llenos de agua (aunque algunas son ligeramente selectivas a iones), que permiten la penetración pasiva a través de la membrana externa de moléculas hidrofílicas menores de 600 Da. El límite de exclusión de estas proteínas viene determinado por el tamaño mínimo del poro que forman. Además, el tamaño de los solutos que penetran por estos poros, aún estando por debajo de dicho límite, también ejerce gran influencia sobre su tasa de difusión a través de los mismos (por ejemplo, la velocidad de difusión de una pentosa de 150 Da a través de OmpF de *E. coli* es unas 100 veces superior a la de un disacárido de 342 Da) (Nikaido y Rosenberg, 1983). Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las denominadas porinas triméricas "clásicas" (como OmpF, OmpC o PhoE de *E. coli* y *S. enterica* sv. Typhimurium) y las porinas monoméricas, que confieren menor permeabilidad que las primeras (como OmpA de *E. coli* u OprF de *P. aeruginosa*) y que se tratarán en otro apartado de esta *Introducción*. Convendría destacar que se ha propuesto la nomenclatura "Opr" (del inglés *outer membrane protein*) para designar a las proteínas de la membrana externa de *Pseudomonas*, para evitar así posibles confusiones con las de *E. coli*, designadas

"Omp" (del inglés *outer membrane protein*) (Hancock *et al.*, 1990). El peso molecular de la forma monomérica de este tipo de proteínas oscila generalmente entre 28 y 48 kDa. Las porinas no son proteínas hidrofóbicas en lo que a composición de aminoácidos se refiere y no poseen los largos segmentos de aminoácidos hidrofóbicos característicos de las proteínas integrales de la membrana interna. Además, para disociar por completo los trímeros de proteína en sus subunidades monoméricas correspondientes y lograr su desnaturalización, es preciso calentarlas en presencia de SDS a temperaturas superiores a los 70°C (Nikaido y Vaara, 1985). Estas propiedades se explicaron cuando se determinó la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X de algunas de estas proteínas, como la porina trimérica de *Rhodobacter capsulatus* (Weiss y Schulz, 1992), OmpF y PhoE de *E. coli* (Cowan *et al.*, 1992) o una porina de *Rhodopseudomonas blastica* (Kreusch *et al.*, 1994). Todas estas proteínas forman homomultímeros en la membrana externa. Aunque las porinas de *E. coli* y *R. capsulatus* se pliegan formando estructuras muy similares, presentan poca similitud en su estructura primaria. Se ha determinado que cada monómero de OmpF atraviesa la membrana 16 veces a través de cadenas β antiparalelas que forman la denominada estructura en barril β , en cuyo interior se sitúa el canal hidrofílico (Fig. 1.3A). Estas cadenas β poseen carácter anfipático, con residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en posiciones alternadas, de manera que los primeros se sitúan en contacto con el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica y los segundos entran a formar parte del canal hidrofílico (Gromiha *et al.*, 1997). El trímero, por tanto, está formado por tres canales (Fig. 1.3B). Los segmentos en forma de lazo que conectan los distintos segmentos β transmembrana son bastante cortos (de 1 a 4 aminoácidos) en el lado periplásmico de la proteína y considerablemente mayores en la cara externa. Estos últimos, aunque muestran mucha variabilidad en su secuencia, suelen ser ricos en aminoácidos con carga negativa que se supuestamente interaccionan con los grupos cargados negativamente de los LPS, a través de puentes de cationes divalentes. El tercer "lazo" externo (L3) de estas proteínas posee una especial relevancia ya que se pliega hacia el interior del canal, dentro del barril β , produciendo un poro cuyas entrada y salida son "amplias" pero que posee un estrechamiento central responsable último del límite de exclusión de cada canal (Koebnik *et al.*, 2000) (Fig. 1.3). Este diseño es muy efectivo para la exclusión de solutos de gran tamaño, a la vez que minimiza posibles fricciones entre los solutos y las paredes del poro, lo que implica que las moléculas pequeñas puedan atravesar la membrana a velocidades cercanas a la máxima. Además, la zona del

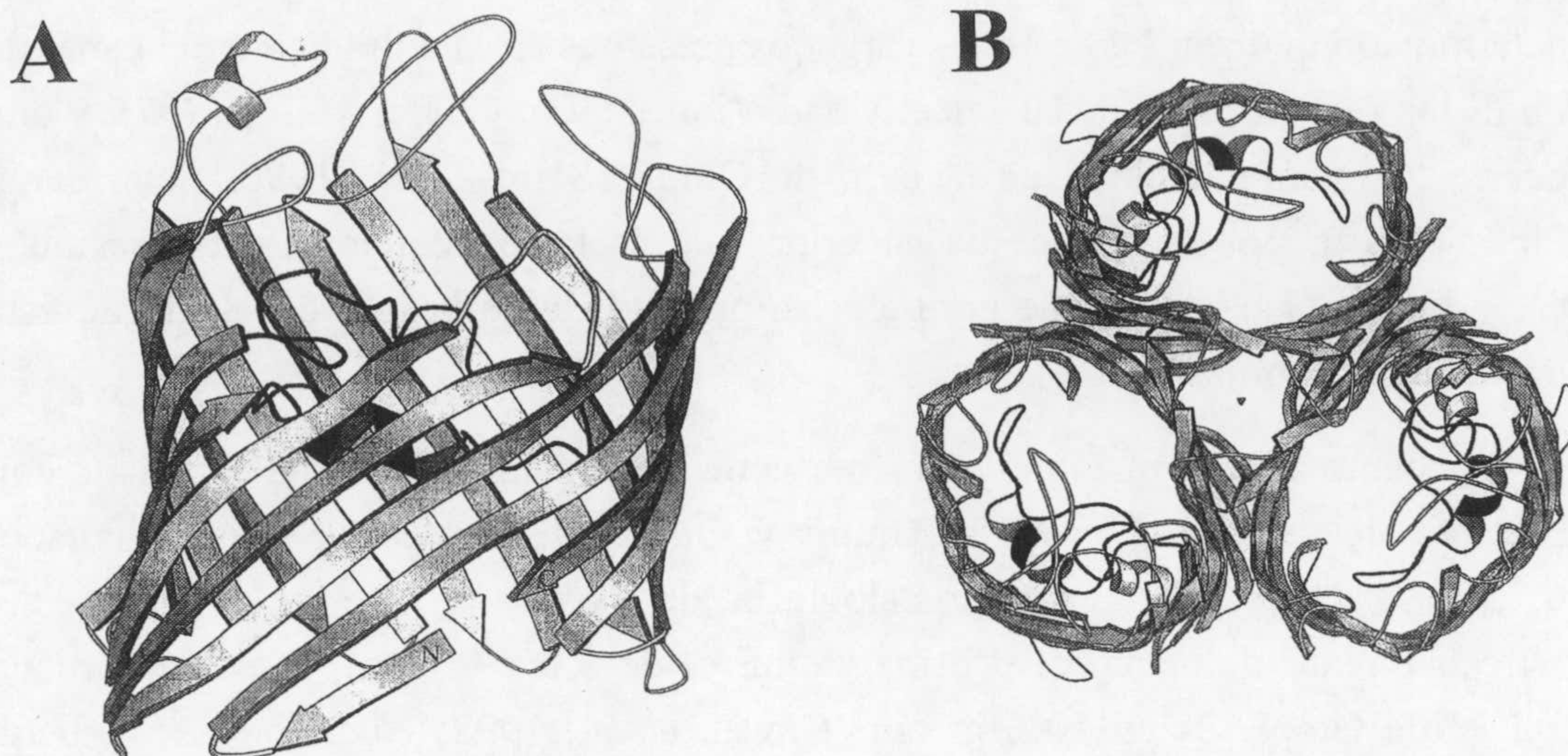


Figura 1.3. Patrón de plegamiento de la porina OmpF. (A) Esquema de un monómero de OmpF. Las 16 cadenas β transmembrana se representan mediante flechas y las 2 hélices α mediante "rizos". También se indican los extremos N- y C-. El "lazo" (L3) que se extiende hacia el interior del canal hidrofílico se indica en color negro. En este esquema el espacio periplásmico estaría situado en la parte inferior de la figura. (B) Esquema de un trímero de OmpF visto desde la parte superior del eje de simetría trigonal (indicado por un triángulo). Los tres canales se estrechan debido a la presencia del "lazo" L3 (indicado en negro). (Obtenido de Cowan y Schirmer, 1994).

estrechamiento del canal contiene en una de sus caras una serie de residuos cargados positivamente y en la cara opuesta varios residuos con carga negativa. Esta disposición de cargas provocaría un estiramiento de las cadenas laterales de dichos aminoácidos que tendría como consecuencia la formación de una estructura rígida bien definida, necesaria para la exclusión eficiente de solutos grandes. Además, el elevado campo eléctrico así formado, explicaría la capacidad de las porinas para excluir solutos hidrofóbicos. La entrada de los mismos estaría energéticamente desfavorecida, debido probablemente a que para tal fin, éstos tendrían que desplazar a las moléculas de agua que estarían situadas siguiendo un supuesto ordenamiento dipolar (Schulz, 1993). Por otra parte, la porina PhoE de *E. coli*, que se sintetiza en respuesta a condiciones de hambre de fosfato, muestra cierta preferencia por los aniones, en contraste con la preferencia por los cationes de las porinas OmpF y OmpC. Mediante mutagénesis dirigida se determinó que la lisina 125 de PhoE, que reemplaza a la glicina 131 de OmpF, era el residuo responsable de dicha preferencia de cargas (Bauer *et al.*, 1989). Posteriormente, al resolverse la estructura tridimensional de ambas porinas se obtendría la explicación para esta propiedad, al localizarse los residuos mencionados en la

región donde se estrechaba el poro (Cowan *et al.*, 1992). Además, se ha determinado que son los residuos cargados presentes en la entrada y en el canal de PhoE los responsables de su selectividad a iones (Van Gelder *et al.*, 1997), y que ocurre lo mismo también en el caso de OmpF (Saint *et al.*, 1996; Schirmer y Phale, 1999), por lo que se ha sugerido que es la disposición de los residuos cargados en el canal lo que confiere las propiedades únicas a cada una de estas proteínas (Koebnik, 2000).

En cuanto a la regulación de la síntesis de las porinas, ésta se ha estudiado con bastante detalle en el caso de OmpF y OmpC de *E. coli*. Se ha calculado, basándose en estudios por cristalografía de rayos X, que el diámetro del estrechamiento del canal que forma OmpF es de 1,1 x 0,7 nm, y se ha estimado que el de OmpC es un 10% menor (Cowan *et al.*, 1992; Nikaido y Rosenberg, 1983). Esta variación aparentemente pequeña tiene importantes consecuencias sobre la tasa de difusión de determinadas sustancias inhibitoras como los ácidos grasos libres o detergentes como las sales biliares, presentes normalmente en el hábitat natural de las enterobacterias. De esta forma, la síntesis de OmpF, que posee el poro de mayor tamaño, se reprime en condiciones de osmolaridad alta o de temperatura elevada (por ej., 150 mM de NaCl o 37°C) además de a pH ácido, en condiciones de alta concentración de oxígeno o en presencia de ciertos antibióticos, en este último caso a través del regulador global MarA (Ariza *et al.*, 1994; Nikaido, 1996b). Así, mediante la expresión únicamente del canal más estrecho, OmpC, la bacteria sólo pierde un 50% de permeabilidad frente a nutrientes pequeños como la glucosa, a la vez que reduce drásticamente el paso de muchos compuestos inhibidores, generalmente de mayor peso molecular, más hidrofóbicos o cargados negativamente (o con una combinación de estas propiedades, como en el caso de las sales biliares) (Nikaido y Vaara, 1985). Por otro lado, la síntesis de OmpF se desreprime cuando la bacteria se encuentra fuera del cuerpo animal (en aguas naturales, etc.) donde las condiciones de temperatura y concentración de sales son mucho más bajas. Esta estrategia le permite a la bacteria conseguir nutrientes en un ambiente muy diluído de manera más eficiente. Otras señales que desreprimen la síntesis de OmpF son las condiciones de hambre de ciertos nutrientes como la glucosa. Con respecto a la base molecular de la regulación osmótica, mencionar solamente que es bastante compleja, y que en ella intervienen desde mecanismos generales cuyas bases moleculares aún se conocen poco, como por ejemplo, el superenrollamiento local del ADN, la proteína H-NS, etc. (Graeme-Cook *et al.*, 1989; Pratt *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996), hasta mecanismos más específicos como el sistema regulador de dos componentes EnvZ/OmpR (Pratt y Silhavy, 1995; Pratt *et al.*, 1996).

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

Basándose en el conjunto de características mencionadas anteriormente, podría explicarse la razón del elevado número de moléculas de porina existentes en la membrana externa (más de 10^5 copias/célula). La penetración de solutos a través de las porinas ocurre por procesos de difusión simple según describe la ley de Fick, y por tanto, es proporcional a la diferencia de concentración existente entre el medio externo y el periplasma. Aunque dicha tasa sea alta en medios de laboratorio (que a menudo contienen fuentes de carbono a concentraciones de 5-10 mM), ésta disminuye más de 3 órdenes de magnitud cuando la concentración de nutrientes se sitúa en el intervalo micromolar (que es el tipo de ambiente para el cual la mayoría de los sistemas de transporte activo de *E. coli* parecen haber sido diseñados). Se ha calculado que en tales condiciones, realmente sería necesaria esa enorme cantidad de porinas para que una fuente de carbono de tamaño medio (por ej., glucosa), entrase en la célula a una tasa suficiente como para permitir un crecimiento rápido. Si se trata de nutrientes de mayor peso molecular (como disacáridos), ni siquiera tal cantidad de porinas es suficiente para mantener dicho crecimiento, por lo que se necesitan otros sistemas de difusión más específicos.

(ii) Canales de difusión específicos: son proteínas que también forman canales llenos de agua, y que contienen sitios de unión saturables específicos de sustrato. También se denominan porinas específicas o proteínas tipo porinas, aunque se ha recomendado la restricción del uso del término "porina" únicamente para aquellas proteínas que forman canales inespecíficos (Nikaido, 1992). La difusión facilitada de solutos a través de este tipo de proteínas sigue una cinética de saturación muy similar a la cinética enzimática de Michaelis-Menten. Dentro de este tipo de proteínas las mejor estudiadas, en relación a su estructura, son LamB de *E. coli* (el receptor del fago λ) que facilita el paso de maltosa, glucosa y maltodextrinas, y la proteína de codificación plasmídica ScrY de *Salmonella enterica* sv Thyphimurium que facilita el paso de sacarosa. La determinación de la estructura tridimensional de estas proteínas (Forst *et al.*, 1993; Schirmer *et al.*, 1995) reveló que ambas forman trímeros y se pliegan en una estructura en barril β (formada por 18 cadenas β) (Fig. 1.4). Por otro lado, se ha demostrado que, aunque la síntesis

de LamB se induce en presencia de maltosa, también su expresión se desreprime en condiciones de hambre de carbono, en las cuales se convierte en la principal ruta de entrada de glucosa, que también es capaz de unirse a LamB aunque con menor afinidad que la maltosa (Death *et al.*, 1993). También se han encontrado otras proteínas que forman canales específicos en *E. coli*, como la proteína Tsx implicada en la difusión facilitada de nucleósidos (Bremer *et al.*, 1990). *P. aeruginosa* carece de las porinas triméricas "clásicas" presentes en otras bacterias gram negativas, por lo que la tasa de difusión inespecífica a través de su membrana externa es muy baja, lo cual confiere una especial significación a los canales específicos en este organismo. Por ejemplo, la proteína OprD (proteína D2) de *P. aeruginosa* forma un canal específico para la entrada de aminoácidos y péptidos básicos a través del cual puede penetrar también el antibiótico β -lactámico imipenem (Trias y Nikaido, 1990). De hecho, la selección de cepas resistentes a dicho antibiótico resulta en la aparición de mutantes deficientes en esta proteína (Quinn *et al.*, 1986; Yoneyama y Nakae, 1993). Recientemente, Ochs y colaboradores (1999) han descubierto que el regulador MexT y el salicilato reprimen, a nivel transcripcional y de manera independiente, la síntesis de OprD. Otro de los canales específicos en *P. aeruginosa* es OprB (proteína D1), que también se encuentra en *P. putida* y otras pseudomonádaceas (Wylie y Worobec, 1994), y cuya síntesis se induce en presencia de glucosa. Esta proteína muestra preferencia por glucosa y xilosa sobre otros azúcares de tamaño similar, y se ha demostrado la presencia de un sitio de unión específico para glucosa y otros carbohidratos (Trias *et al.*, 1988; Wylie *et al.*, 1993). OprP (proteína P) de *P. aeruginosa* es otra proteína que forma un canal específico, que se induce en condiciones de hambre de fosfato (Hancock *et al.*, 1982b), y que también parece estar presente en otros miembros de las pseudomonádaceas, incluyendo *P. putida* (Hancock *et al.*, 1990). Esta proteína es bastante diferente de la porina inespecífica PhoE de *E. coli* que se induce en condiciones similares. OprP es una proteína específica de aniones pero con una preferencia 100 veces mayor hacia aniones fosfato, debido a que posee un sitio de unión específico para el mismo (Hancock y Benz, 1986). También se ha identificado un canal específico de pirofosfato, OprO, en *P. aeruginosa* (Hancock *et al.*, 1992). En la membrana externa de *P. aeruginosa* también se encuentran otras proteínas, como OprC y OprE, aunque no han sido muy estudiadas. OprC es una proteína minoritaria de aproximadamente 70 kDa que forma pequeños canales en la membrana externa y que parece presentar especificidad por Cu^{2+} . Además, su expresión se reprime en presencia de Cu^{2+} exógeno (Yoneyama y Nakae, 1996). OprE es una proteína de aproximadamente 43 kDa que se induce en condiciones de anaerobiosis y que

presenta cierta similitud con OprD en su estructura primaria (Yamano *et al.*, 1993).

(iii) Receptores de alta afinidad: son proteínas de alto peso molecular que median el transporte de determinadas moléculas a través de la membrana externa con mucha mayor afinidad que en el caso de los canales específicos, y se suelen denominar "receptores". Así, sus constantes de disociación (K_d) se suelen situar en el intervalo μM e incluso nM (frente a las K_d de orden mM de los canales específicos). Además, para poder transportar sus ligandos, los receptores requieren la intervención de TonB, una proteína que se ancla a la membrana interna y se supone que interacciona físicamente con dichos receptores para transmitirles la energía almacenada en la membrana interna, fundamental para el proceso de translocación (la proteína TonB se tratará específicamente en un apartado posterior [ver Fig. 1.9] de esta *Introducción*). Este proceso conlleva la acumulación de los ligandos transportados en el periplasma (mientras que en el caso de los canales específicos sólo se podría conseguir un equilibrio pasivo de los solutos a través de la membrana). Esta vía de entrada específica también se conoce como ruta dependiente de TonB (Nikaido, 1994a), y está diseñada para la toma de nutrientes, generalmente de gran tamaño, que se encuentran en el medio ambiente extracelular a concentraciones muy bajas, como es el caso de la vitamina B₁₂ o de los complejos quelantes de Fe^{3+} . Así, por ejemplo, el sistema BtuB-TonB es capaz de acumular su ligando (la vitamina B₁₂) en el periplasma a concentraciones 1.000 veces superiores a las del medio externo, usando como fuente de energía la fuerza protón-motriz acumulada a través de la membrana citoplásmica (Bradbeer, 1993). Muchos de los receptores estudiados están implicados en la entrada de complejos de alto peso molecular del tipo Fe^{3+} -sideróforo (moléculas quelantes de hierro producidas generalmente por los microorganismos, para capturar el Fe^{3+} ambiental), FhuA, por ejemplo, una ferricromo, FepA una enterobactina, FecA una un complejo de citrato férrico, etc. (Nikaido, 1996a). Recientemente se ha determinado que dichos receptores de membrana externa no sólo son necesarios para el transporte de su correspondiente ligando, sino que también regulan su propia expresión mediante un sistema de regulación en el que están implicados tres componentes: el propio receptor de la membrana externa del complejo sideróforo- Fe^{3+} , una proteína de membrana interna y un factor citoplásmico alternativo a los factores sigma (Braun, 1997; Koster *et al.*, 1994). El receptor sensa la presencia del sideróforo específico en el medio extracelular y transduce esta señal a la proteína de membrana interna. Esta proteína actúa como un factor anti-sigma inhibiendo la actividad del factor sigma en ausencia de la señal extracelular. Tras la inducción, el factor sigma es activado

y se une, junto a la ARN polimerasa, a la zona promotora del gen que codifica el receptor de membrana externa activando así su expresión. Los factores sigma y anti-sigma de este sistema están organizados en un operón y su expresión está regulada por la proteína Fur (proteína reguladora del transporte de hierro), lo que significa que sólo se transcriben en condiciones en las que el hierro es limitante. La presencia de un exceso de Fe^{3+} en el medio reprime la producción de estos receptores. *Pseudomonas* spp. puede producir al menos dos clases de sideróforos, las piochelinas y las pioverdinas, así como varios supuestos receptores de membrana externa (Hancock *et al.*, 1990), algunos de los cuales se han identificado, como la proteína FBP de *P. aeruginosa* que une ferripiochelina (Sokol y Woods, 1986). Recientemente, se han determinado las estructuras tridimensionales de los receptores FepA (Buchanan *et al.*, 1999) y FhuA (Ferguson *et al.*, 1998; Locher *et al.*, 1998). Ambas proteínas contienen un dominio C-terminal que presenta una estructura en barril β formada por 22 cadenas β , y un dominio N-terminal que se localiza dentro del barril obstruyendo el canal. Tras la activación de la proteína TonB, se produce un cambio conformacional que permite la apertura del canal y la entrada del ligando.

(iv) Lipoproteínas: bajo esta denominación se agrupan un conjunto de proteínas con funciones muy diversas, caracterizadas por compartir la misma ruta biosintética y por poseer una región lipídica. La lipoproteína más estudiada de *E. coli* es la denominada lipoproteína de la mureína o de Braun (Braun y Rehn, 1969). Esta proteína codificada por el gen *lpp*, posee un peso molecular de 7,2 kDa y su número de copias es muy elevado, unas 7×10^5 /célula (Nakamura e Inoue, 1979). Un tercio de la misma está unida covalentemente al peptidoglicano (mediante un enlace peptídico entre el grupo carboxilo del ácido *m*-diaminopimélico del peptidoglicano y el grupo ϵ - NH_2 de la lisina carboxilo terminal de la proteína) (Fig. 1.4) mientras que los dos tercios restantes se encuentran en forma libre, aunque continúan interaccionando débilmente con el peptidoglicano (Choi *et al.*, 1987). Por otro lado, la parte lipídica de la lipoproteína está formada por una glicerilcisteína amino terminal a la cual se unen dos ácidos grasos mediante enlaces éster y un ácido graso (generalmente palmitato) mediante un enlace amida. Se piensa que la proteína se inserta en la cara interna de la membrana externa a través de esta región lipídica y que el resto de la proteína, hidrofílica y organizada en forma de hélice α se sitúa en el periplasma. Se ha demostrado que la parte proteica puede asociarse formando trímeros (Choi *et al.*, 1987). No es una proteína esencial, aunque se ha demostrado que es importante para mantener la integridad estructural de la pared celular, ya que los mutantes *lpp* liberan enzimas periplásmicos al medio externo, son más

sensibles a diversos detergentes y otros agentes, y muestran evaginaciones a modo de burbujas en su membrana externa, a nivel del tabique de división (Fung *et al.*, 1978). Se ha sugerido que podría actuar en el mantenimiento del espacio periplásmico, a través de la unión de la membrana externa con el peptidoglicano.

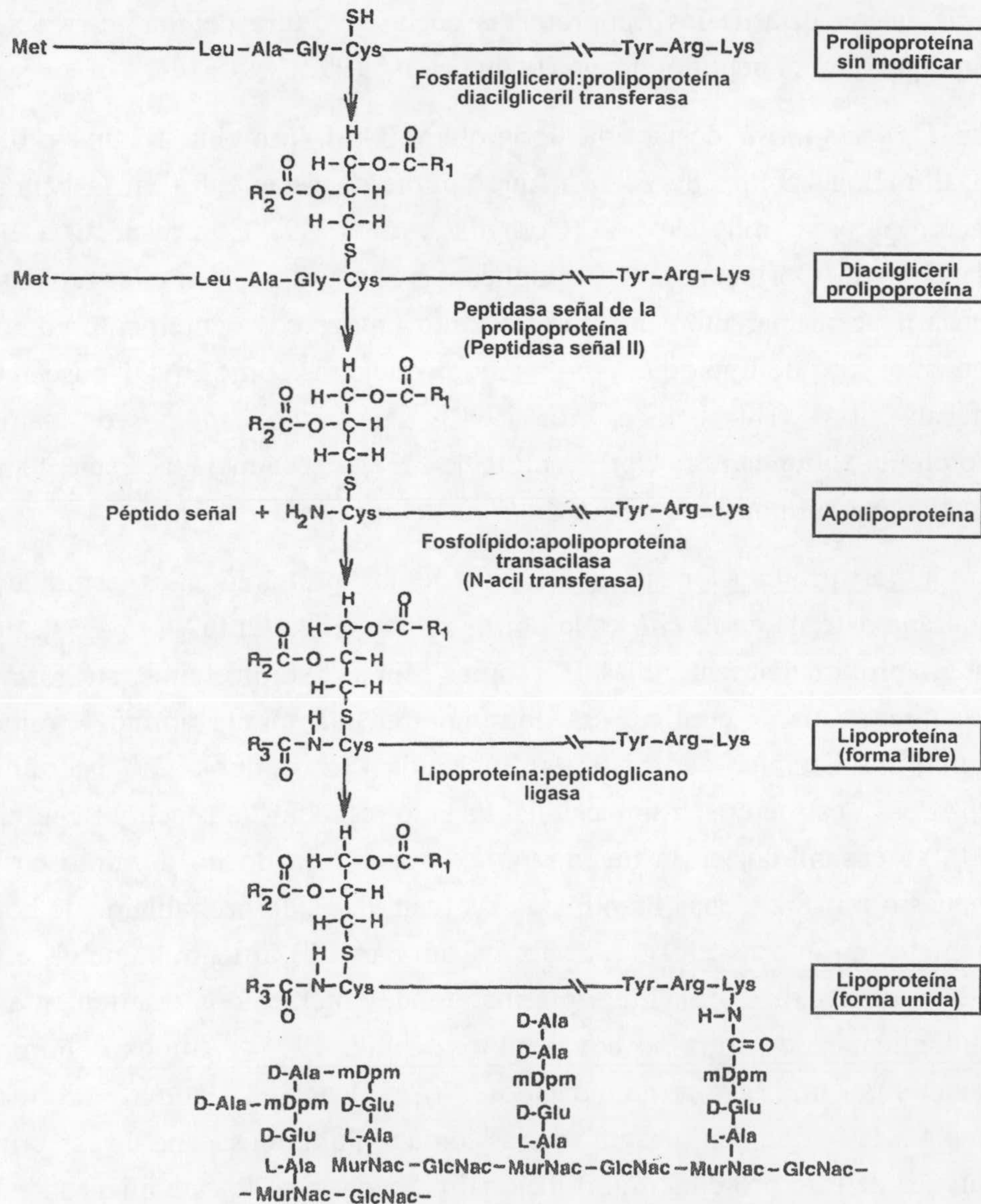


Figura 1.4. Ruta propuesta para la biosíntesis de la lipoproteína de Braun (Lpp). mDpm, ácido meso-diaminopimélico; MurNac, ácido N-acetilmurámico; GlcNac, N-acetilglucosamina. (Obtenido de Wu, 1996).

Además de Lpp se han encontrado otras cinco lipoproteínas en la membrana externa de *E. coli* (Wu, 1996; Matsuyama *et al.*, 1997), entre las que destaca la lipoproteína PAL, que se tratará más adelante. Además, existen otras de codificación plasmídica como, por ejemplo, TraT, codificada por el plásmido F e implicada en mecanismos de exclusión superficial en las células que portan dicho plásmido (Sukupolvi y O'Connor, 1990). Sorprendentemente, resultados obtenidos en experimentos de entrecruzamiento con reactivos bifuncionales sugieren que en *E. coli*, la mayoría de las lipoproteínas de la envoltura celular interactúan de algún modo con el peptidoglicano (Leduc *et al.*, 1992).

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

(v) Otras proteínas destacadas: una de las proteínas más estudiada de la membrana externa de *E. coli* es la porina monomérica OmpA (35 kDa), de la que existen aproximadamente unas 10^5 copias/célula. Esta proteína está formada por 325 aminoácidos, y contiene un dominio transmembrana amino terminal y un dominio periplásmico carboxilo terminal. Los 171 residuos amino terminales de OmpA, cuya estructura tridimensional ha sido resuelta (Paustsch y Schulz, 1998 y 2000), se ensamblan en la membrana externa formando un dominio en barril β compuesto por 8 cadenas β antiparalelas (cantidad que probablemente constituya el número mínimo necesario para formar un barril β), mientras que el resto de la proteína se localiza en el periplasma donde interactúa fuertemente con el peptidoglicano de forma no covalente (Koebnik, 1995). Ambos dominios están separados por una región (aminoácidos 176-187) rica en alanina y prolina que se asemeja a la región "en bisagra" de las inmunoglobulinas. Una de las principales funciones de esta proteína multifuncional parece ser la de estabilizar la estructura de la membrana externa (Nikaido y Vaara, 1985; Wang, 2002), proporcionando la unión de la membrana externa con el peptidoglicano (Koebnik, 2000). OmpA también está implicada en la estabilización de los agregados de conjugación con células donadoras F^+ (Koebnik, 1999b), además de servir de receptor para varios fagos y colicinas (Lugtenberg y van Alphen, 1983; Morona *et al.*, 1994). En

cuanto a su papel como porina, se ha visto que la proteína purificada forma canales de difusión inespecíficos con un tamaño similar a los de OmpF (Sugawara y Nikaido, 1992). Sin embargo, la tasa de penetración de solutos a través de este canal es aproximadamente dos órdenes de magnitud inferior que en el caso de OmpF, por lo que su contribución a la permeabilidad de la membrana no parece ser demasiado significativa.

P. aeruginosa produce también unas 2×10^5 copias/célula de una porina monomérica inespecífica de 35 kDa, denominada OprF (proteína F), similar a OmpA de *E. coli*. OprF posee, como OmpA, una importante función estructural, ya que su deficiencia produce células redondeadas, que crecen con dificultad en medio con baja osmolaridad, que presentan evaginaciones en su membrana externa y que además liberan de enzimas periplásmicos (Gotoh *et al.*, 1989). OprF también desempeña funciones en procesos de conjugación (Woodruff y Hancock, 1989). Su similitud con OmpA se demuestra por el hecho de que complementa en parte la falta de OmpA en mutantes *ompA lpp* de *E. coli* (Woodruff y Hancock, 1989). Se ha propuesto que OprF se estructura en tres dominios, un dominio N-terminal (primeros 160 aminoácidos), que formaría una estructura de barril β en la membrana de forma análoga a OmpA; una región central (161-209) rica en prolina y alanina que contiene dos puentes disulfuro; y un dominio C-terminal (210-326) muy conservado con respecto a otras proteínas de la familia OmpA, que también interacciona con el peptidoglicano (Rawling *et al.*, 1998). A pesar de estas similitudes, ha existido una gran controversia sobre la estructura del dominio C-terminal de esta proteína. En contra del modelo admitido para OmpA, que sugiere que este dominio globular es exclusivamente periplásmico, en el caso de OprF el grupo del Dr. Hancock había propuesto un modelo según el cual esta región estaría asociada a la membrana a través de una considerable proporción de hoja β antiparalela (Rawling *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1993). Sin embargo, Sugawara y colaboradores (1996) proponían una estructura para OprF similar a la de OmpA, en el que dicha proteína presentaría un dominio transmembrana N-terminal y un dominio periplásmico C-terminal. Recientemente, Brinkman y colaboradores (2000) también han propuesto un modelo para OprF similar al de OmpA (Fig. 1.5A y B).

El motivo por el cual las porinas monoméricas OmpA y OprF producen unas tasas de penetración tan bajas, aún está por resolver. En el caso de OmpA existen evidencias experimentales que indican que sólo una pequeña fracción (del 2 al 3%) de la población total de proteína, se pliega de manera que forma canales

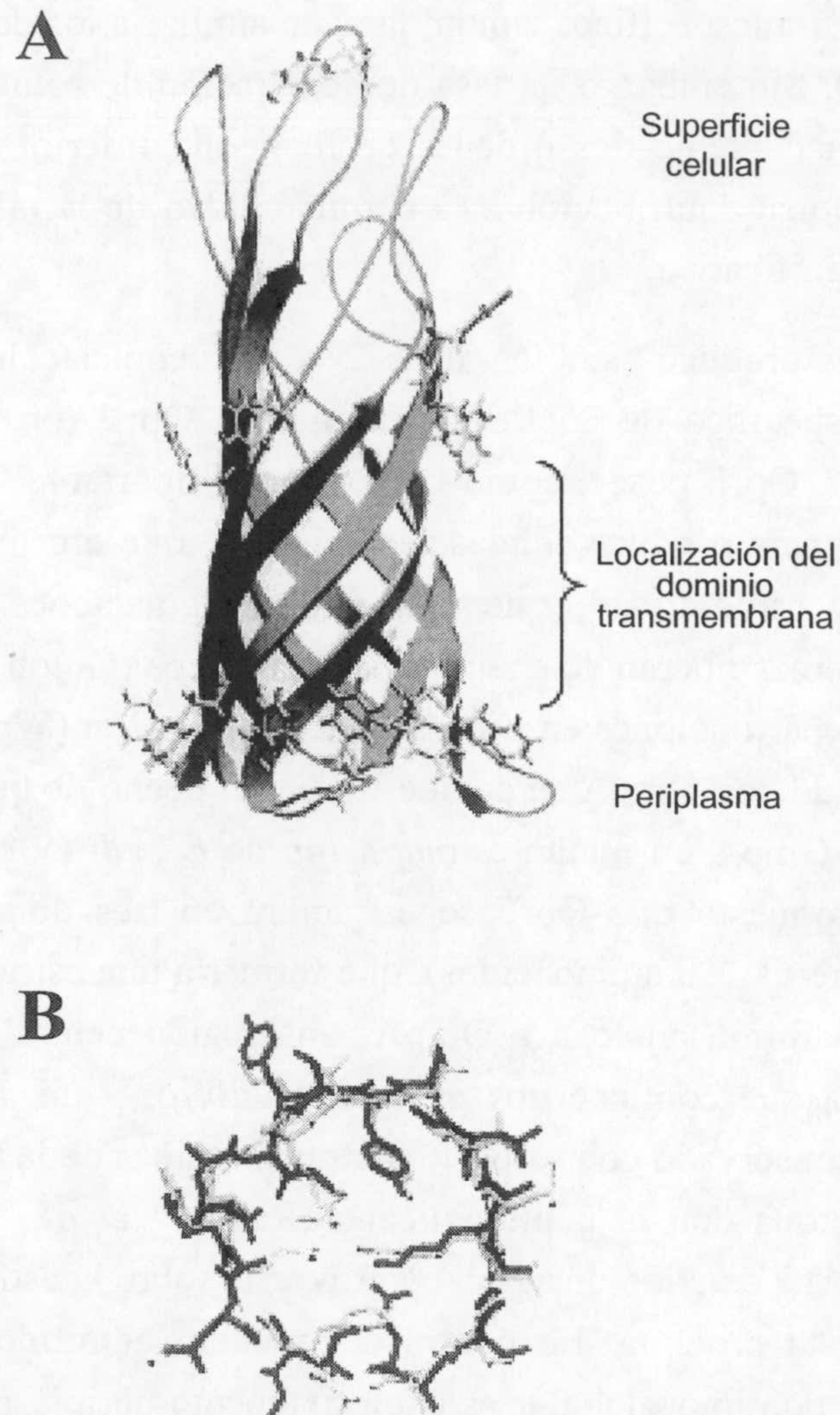


Fig. 1.5. Modelo tridimensional del dominio amino terminal de OprF. (A) Esquema de la molécula. Los residuos aromáticos (gris claro) están situados en la cara externa de la proteína formando la interfase agua-lípido. (B) Esquema horizontal del barril que formaría OprF (negro) solapando con la estructura de OmpA (gris claro), mostrando que los residuos que obstruyen el poro de OmpA no están conservados en OprF lo que permite un mayor tamaño de poro para este canal (Obtenido de Brinkman *et al.*, 2000).

funcionales (Sugawara y Nikaido, 1994). Con respecto a OprF, aunque su función como porina se ha llegado a poner en duda (ver Hancock *et al.*, 1990; Nikaido *et al.*, 1991), se ha estimado que una pequeña proporción de moléculas de OprF por célula (1-5%) estaría formando poros grandes (de unos 2 nm), mientras que el resto formarían poros considerablemente menores, lo que explicaría la baja permeabilidad que presenta la membrana externa de *P. aeruginosa* (Woodruff *et*

al., 1986; Brinkman *et al.*, 2000). Recientemente, se ha demostrado que el dominio N-terminal de OprF no está implicado en la formación de dichos poros de mayor tamaño, ya que estos no aparecen en ensayos de medida de la conductividad de los canales cuando se realizan con el extremo N-terminal de OprF purificado (Brinkman *et al.*, 2000), y se ha sugerido que dicho dominio por sí mismo sería capaz de formar un poro, pero el resto de la proteína sería necesaria para formar los canales de mayor tamaño. Por otro lado, se ha demostrado que la conductividad de este dominio N-terminal de OprF es mayor que la de OmpA, y se ha sugerido que esto sería debido al hecho de que los residuos posiblemente implicados en el bloqueo del canal de OmpA (Pautsch y Schulz 1998) no están conservados en OprF, y más aún, que los residuos que OprF presenta en esas posiciones si permitirían la formación de un posible canal (Brinkman *et al.*, 2000) (Fig. 1.5B).

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

1.2. Funciones de la membrana externa

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

posee incluso un cierto papel estructural, influyendo en la forma celular (por ej., a través de proteínas como OmpA o Lpp).

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

Puesto que la función de barrera selectiva de la membrana externa es una de sus propiedades más importantes, las bases moleculares de la misma se han estudiado con bastante profundidad. Aunque se considera que la membrana externa es "impermeable" a la mayoría de sustancias hidrofóbicas, incluyendo detergentes, antibióticos hidrofóbicos y numerosos enzimas, es importante destacar que este concepto de "exclusión" ha de ser entendido en términos fisiológicos, y que refleja la probabilidad de que dichos compuestos no atraviesen la membrana a una tasa lo suficientemente elevada como para producir efectos negativos sobre la célula (por ej., la solubilización, inhibición de la función o modificación de alguna macromolécula bacteriana). La propiedad de barrera de permeabilidad de una membrana dada está inversamente relacionada con su fluidez. La baja permeabilidad de la membrana externa se debe fundamentalmente a la estructura asimétrica de su bicapa lipídica, y en concreto a las características propias de las moléculas de LPS, localizadas en su monocapa externa. Los LPS contienen 6 ó 7 moléculas de ácidos grasos, todos saturados, unidas a un único grupo de cabeza, en contraste con los dos ácidos grasos que posee cada molécula de fosfoglicérido. Esto hace que el interior lipídico de la monocapa de LPS sea muy poco fluído, lo que disminuye la permeabilidad de la membrana externa a moléculas hidrofóbicas entre 50 y 100 veces, con respecto a las clásicas membranas formadas por fosfoglicéridos (como la membrana citoplásmica) (Nikaido, 1994b). Recientemente, Vaara y Nurminen (1999) han sugerido, basándose en el estudio de un mutante de *E. coli* cuyo lípido A estaba pentaacetilado, que la presencia de 6 ácidos grasos en el lípido A del LPS no es un requisito previo para el funcionamiento correcto de la membrana externa como barrera de permeabilidad. Por otro lado, las moléculas de LPS también interaccionan entre sí a través de cationes divalentes, generalmente Mg^{2+} y Ca^{2+} , que neutralizan parcialmente la carga negativa de las mismas (debida a la presencia de numerosos grupos cargados en la región del lípido A y del núcleo interno) (Nikaido, 1996a). Estas fuertes asociaciones de los LPS entre sí y con moléculas de proteína vecinas son de gran importancia para el mantenimiento de una barrera de permeabilidad eficaz. De hecho, la presencia de cationes divalentes es esencial para la existencia de la membrana, ya que disminuyen la fuerte repulsión electrostática existente entre las moléculas de LPS adyacentes. Habría que resaltar que a pH neutro, la carga neta de la superficie celular de un gran número de bacterias es negativa (Bayer y Sloyer, 1990). En especies que poseen cápsula aniónica, ésta es la principal

contribuyente a la carga final, pero en especies sin cápsula, el LPS es el contribuyente más importante. Este hecho indica que la neutralización de los LPS es incompleta con lo que la superficie de las células bacterianas se podría describir como una capa con un potencial electrostático altamente negativo con cationes divalentes y monovalentes fluyendo rápidamente a través de su superficie (Hancock *et al.*, 1994). De esta manera, la baja permeabilidad que presenta la membrana externa hacia las moléculas hidrofóbicas refleja la dificultad de las mismas para atravesar dicho área de potencial electrostático negativo.

El importante papel que desempeñan los LPS en la membrana se pone de manifiesto cuando se estudian mutantes alterados en los mismos. La permeabilidad de la membrana externa no varía demasiado cuando falta la cadena lateral O o incluso la porción distal del núcleo, sin embargo, los mutantes que pierden los azúcares de la región proximal del núcleo, el núcleo interno ("quimiotipos" Rd₁, Rd₂ y Re [Fig. 1.2], denominados *deep rough*), se vuelven enormemente sensibles a compuestos como detergentes, ácidos grasos, fenol, hidrocarburos policíclicos, colorantes y antibióticos hidrofóbicos, etc. (Nikaido y Vaara, 1985). La razón de este aumento de permeabilidad parece deberse a que la membrana de dichos mutantes contiene un número reducido de porinas (que además tienen problemas para ensamblarse en forma de trímeros [Sen y Nikaido, 1991]), lo que conlleva un aumento compensatorio en la cantidad de fosfolípidos, que se incorporan incluso en la monocapa externa, creando pequeñas zonas de bicapa fosfolipídica a través de las cuales se produce la rápida difusión de los compuestos hidrofóbicos (Kamio y Nikaido, 1976; Nikaido, 1996a).

Como se ha mencionado, la membrana externa es una barrera bastante efectiva contra una gran número de sustancias nocivas (antibióticos, detergentes aniónicos y neutros, etc.), que atraviesan la membrana con extrema dificultad debido a que suelen ser compuestos hidrofóbicos o compuestos hidrofílicos relativamente grandes (Nikaido y Vaara, 1985; Vaara, 1992). Sin embargo, la bicapa de la membrana externa no es una barrera perfecta para compuestos hidrofóbicos, sobretodo si éstos poseen una fracción significativa de formas no cargadas (como ocurre por ejemplo con algunas tetraciclinas hidrofóbicas) (Nikaido y Thanassi, 1993; Nikaido, 1994a). Es entonces cuando los procesos de inactivación o de extrusión activa juegan un papel esencial (Nikaido, 1994b). La membrana externa, en cambio, es una barrera casi perfecta contra moléculas anfipáticas, ya que a pH fisiológico, sólo una fracción insignificante de las mismas existe en forma protonada, sin carga, capaz de acceder al interior lipídico (Nikaido, 1994a; Plesiat y Nikaido, 1992). Aunque, como se mencionó anteriormente, los sitios de unión para cationes en los LPS son esenciales para mantener la integridad de la membrana, éstos también son al mismo tiempo su "talón de Aquiles". Así, existen una

serie de moléculas que, mediante interacciones con los mencionados sitios de unión para cationes, permeabilizan la membrana promoviendo su propia entrada y la de otros compuestos. Entre dichas sustancias destacan agentes quelantes como el EDTA, y compuestos catiónicos como las polimixinas, los polímeros de lisina, ciertos péptidos catiónicos, algunos detergentes catiónicos, Tris e incluso cationes (Mg^{++} , Ca^{++} y Na^+) (Hancock y Chapple, 1999; Vaara, 1992). El mecanismo de acción del agente quelante EDTA se basa en la eliminación de los cationes divalentes que estabilizan los LPS, lo que provoca la extracción de cantidades considerables de LPS de la membrana externa (Marvin *et al.*, 1989), y supuestamente conduce a una situación análoga a la de los mutantes *deep rough*. El EDTA y el Tris actúan de forma sinérgica sobre la liberación de LPS (Vaara, 1992). En el caso de los agentes catiónicos, entre los que las polimixinas constituyen los compuestos más estudiados, el mecanismo molecular de permeabilización no está claro, aunque se sabe que algunos de estos compuestos desplazan competitivamente a los cationes divalentes de los LPS, y que su interacción con los LPS es cooperativa, de manera que la unión de una molécula de policación a la membrana externa facilita la interacción de posteriores moléculas (Hancock *et al.*, 1994; Vaara, 1992).

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

Finalmente, conviene destacar que en conjunción con la barrera de permeabilidad que representa la membrana externa, los microorganismos han desarrollado a lo largo de la evolución estrategias adicionales para protegerse de los compuestos inhibidores del medio circundante, como los mecanismos de resistencia activa (por ej., degradando el inhibidor o inactivándolo por modificación enzimática) o más importantes aún los sistemas de extrusión activa de drogas. Entre estos últimos, destacan los que actúan sobre una amplia gama de compuestos (por ej., AcrAB-TolC de *E. coli*, MexAB-OprM de *P. aeruginosa*, etc.) y que se dividen en cuatro familias básicas (Nikaido, 1994b; Segura *et al.*, 1999). Los sistemas de extrusión suelen constar de tres componentes: un transportador de membrana interna, un canal de membrana externa y una proteína accesoria que conecta ambas estructuras a través del periplasma, posibilitando así la

salida del compuesto tóxico directamente al exterior celular (Nikaido, 1996b). Entre las proteínas canal destaca TolC (Wandersman y Delepelaire, 1990; Aono *et al.*, 1998), lo que podría explicar el fenotipo de hipersensibilidad a detergentes y antibióticos hidrofóbicos que muestran los mutantes *tolC* en función a posibles defectos en los sistemas de extrusión activa, más que a causa de alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa (Nikaido, 1996a).

Todos los mecanismos hasta ahora mencionados actúan de forma sinérgica confiriendo en muchas ocasiones unos niveles de resistencia muy significativos (Hancock, 1997; Nakae *et al.*, 1999; Nikaido, 1994b).

1.3. Ensamblaje de los componentes de la membrana externa

1.3.1. Fosfolípidos

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

1.3.2. LPS

El LPS se sintetiza en la membrana citoplásmica. La biosíntesis de la región del lípido A-oligosacárido del núcleo tiene lugar en la cara interna de la membrana citoplásmica a través de una serie de reacciones en las que se transfieren sucesivamente los distintos azúcares que componen esta parte de la molécula (Heinrichs *et al.*, 1998; Raetz, 1996; Reeves, 1994; Schnaitman y Klena, 1993). El polisacárido O se sintetiza de manera independiente sobre un lípido transportador anclado a la membrana, el undecaprenol pirofosfato. Hasta la fecha se conocen tres posibles rutas para el ensamblaje del antígeno O. Los homopolímeros (por ej., el LPS de la banda A de *P. aeruginosa*) siguen una ruta independiente de la proteína Wzy (Rfc), ensamblándose de forma procesiva en la cara interna de la membrana citoplásmica gracias a la actividad de glicosiltransferasas específicas. Después, un sistema de transporte tipo ABC facilita la transferencia de la cadena O polimerizada desde la cara citoplásmica a la periplásmica, donde se une a la región del lípido A-núcleo (Whitfield *et al.*, 1997). Otra ruta independiente de Wzy pero distinta a la anterior es la usada para el ensamblaje del antígeno O (factor 54) de *S. enterica* sv. Borreze, en la que el polisacárido es polimerizado y translocado a través de la membrana interna por medio de una única glicosiltransferasa (sintasa), WbbF (RfbB) (Whitfield *et al.*, 1997). Por último, los heteropolímeros (por ej., el LPS de la banda B de *P. aeruginosa*) siguen la ruta clásica dependiente de Wzy, en la cual las unidades de oligosacárido repetidas se sintetizan en la cara interna de la membrana citoplásmica y posteriormente son translocadas al periplasma de forma individual por

Wzx (RfbX), donde son polimerizadas por Wzy (Rfc) a la vez que la proteína Wzz (Rol) controla la longitud de la cadena polimerizada (Fig. 1.6) (Burrows y Lam, 1999; Raetz, 1996; Whitfield *et al.*, 1997). Independientemente de la ruta seguida, el polisacárido O se une a la región del lípido A-núcleo por la acción de la ligasa WaaL (RfaL) (Whitfield *et al.*, 1997). Los pasos posteriores en la exportación de LPS (a través del periplasma y hacia la cara externa de la membrana externa) se desconocen por completo (Reeves, 1994; Raetz, 1996). Las moléculas de LPS recién sintetizadas parecen emerger sobre las regiones de membrana correspondientes a las supuestas uniones de Bayer (Mühlradt *et al.*, 1973).

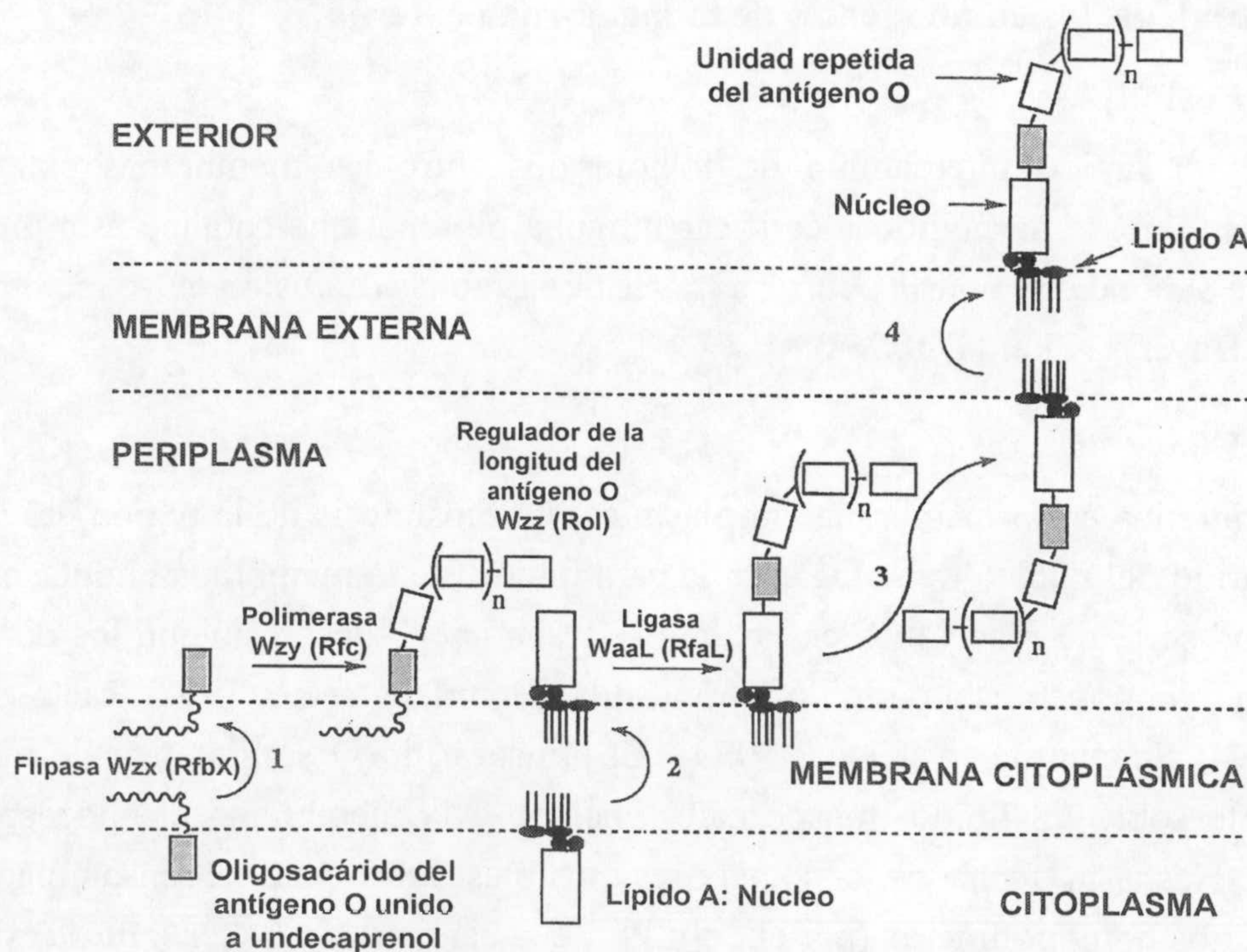


Figura 1.6. Posible esquema de ensamblaje y secreción de LPS. Los pasos 1-4 representan los eventos de translocación que podrían requerir la participación de proteínas específicas y/o suministro de energía. (Adaptado de Raetz, 1996).

1.3.3. Proteínas

Las proteínas de la membrana externa se suelen sintetizar como precursores provistos de un péptido señal y se exportan a través de la ruta de secreción dependiente de las proteínas Sec (Pugsley, 1993). Aunque el mecanismo de ensamblaje de estas proteínas en la membrana externa apenas se conoce, diversas evidencias experimentales,

obtenidas en su mayoría con estudios de la proteína OmpA de *E. coli*, apoyan la idea de que las proteínas de membrana externa se exportan transitoriamente al periplasma donde parecen existir en forma soluble gracias a sus propiedades hidrofílicas (Nikaido, 1996a; Phoenix, 1996). Dada la naturaleza anfipática de las cadenas β de dichas proteínas, éstas no pueden penetrar en el interior de la membrana externa hasta haberse ensamblado en forma de barril β . De hecho, se han llegado a detectar en el periplasma intermediarios de OmpA plegados en una conformación inmadura, menos estable (Freudl *et al.*, 1986). Se supone que éstos adquieren su conformación madura al entrar en la membrana externa, a menudo gracias a interacciones con las moléculas de LPS. Esta forma de ensamblaje contrasta con la de las proteínas integrales de la membrana interna, cuyas hélices α transmembrana se insertan en la misma una por una (Pugsley, 1993). Se cree que la diferencia estructural existente entre ambos tipos de proteínas (estructura α frente a β), es un requerimiento necesario para que las proteínas de membrana externa puedan atravesar la membrana interna, donde un segmento demasiado hidrófobo podría actuar como una señal de parada de la transferencia inhibiendo así el proceso de translocación (Henning y Koebnik, 1994). En apoyo de la hipótesis de ensamblaje a través de intermediarios periplásmicos solubles, recientemente se han encontrado en *E. coli* varias proteínas que parecen funcionar como catalizadoras del plegamiento de proteínas localizadas en el periplasma o en tránsito hacia la membrana externa (aceleran sólo un paso específico y limitante del plegamiento, de manera no dependiente de ATP). Entre dichas proteínas auxiliares destacan, además de las conocidas proteínas Dsb (disulfuro isomerasas o PDI), algunas peptidil prolil *cis-trans* isomerasas (PPI), como por ejemplo, FkpA y SurA (Missiakas *et al.*, 1996; Missiakas y Raina, 1997). Esta última proteína, que podría funcionar como un chaperón periplásmico, está implicada en la maduración y el ensamblaje de LamB (Rouvière y Gross, 1996). También se ha encontrado en *E. coli* otra proteína catalizadora de plegamiento con posible función de chaperón, la proteína Skp (OmpH). Se ha propuesto que esta proteína, que se une *in vitro* de manera específica a las formas no plegadas de las proteínas OmpA, OmpC, OmpF y LamB, y es capaz de insertarse en monocapas fosfolipídicas, podría intervenir en la biogénesis de las proteínas de la membrana externa (Chen y Henning, 1996; de Cock *et al.*, 1999). Por otra parte, también existe la teoría, poco secundada, de que la translocación de las proteínas de la membrana externa a través de la membrana interna y su posterior ensamblaje tiene lugar en las denominadas uniones de Bayer (Bayer, 1968). Así, estudios en *S. enterica* sv. Typhimurium, utilizando técnicas de microscopía electrónica, han mostrado que las porinas triméricas recién sintetizadas aparecen en zonas discretas de la membrana que se corresponden con los supuestos sitios de fusión entre membranas (Smit y Nikaido, 1978). Cabría mencionar, sin embargo, que la existencia de estas zonas de adhesión es,

aún hoy día, una materia de controversia (Bayer, 1991; Kellenberger, 1990; Oliver, 1996).

En lo que se refiere a los elementos responsables de la topología final de las proteínas de membrana, no se conoce mucho. Se sabe que dentro de una familia de proteínas dada, los segmentos transmembrana representan las regiones más conservadas, en particular la cadena β C-terminal, cuyo último residuo, a menudo aromático, posee una gran relevancia (Jeanteur *et al.*, 1991). Dicho residuo, generalmente una fenilalanina, no parece influir en la formación del monómero o del trímero de proteína, pero es esencial para el ensamblaje de la misma en la membrana por lo que se ha postulado que podría formar parte de una señal para la localización y asociación con la membrana externa de este tipo de proteínas (Struyvé *et al.*, 1991). Por otro lado, también se sabe que las regiones, tanto periplásmicas como expuestas en la superficie, que conectan las cadenas β no parecen contener información topogénica y son bastante permisivas en lo que a inserciones o deleciones se refiere (Koebnik, 1999b). Además, se ha determinado mediante estudios con OmpA, que las cadenas β toleran mal los residuos de prolina y las cadenas laterales demasiado voluminosas (cuando estas últimas coinciden con residuos orientados hacia el interior del barril β) (Koebnik, 1999a).

Con respecto a las lipoproteínas, al igual que el resto de las proteínas de la membrana externa también se sintetizan como precursores provistos de un péptido señal y se exportan a través de la ruta Sec (Pugsley, 1993). La ruta biosintética de las lipoproteínas se ha establecido basándose en los estudios realizados con la proteína Lpp de *E. coli* (Wu, 1996). De manera resumida, las modificaciones lipídicas y el procesamiento hasta su forma madura ocurren en la membrana interna. En esta membrana, una peptidasa específica para lipoproteínas (la peptidasa señal II), que se inhibe específicamente por globomicina, corta el péptido señal después de que el residuo de cisteína (conservado en todas las lipoproteínas) haya sido modificado con un diglicérido, donado por una molécula de fosfatidilglicerol. Posteriormente, el procesamiento se completa con la adición de un ácido graso (generalmente palmitato) al residuo de cisteína (Fig. 1.4) (Braun y Wu, 1994; Hayashi y Wu, 1990; Wu, 1996). Se ha demostrado que, al menos en Lpp de *E. coli*, los nueve primeros aminoácidos de la proteína madura contienen toda la información necesaria para su correcto procesamiento y localización (Ghrayeb e Inoue, 1984). Además, se ha propuesto que el segundo aminoácido de la proteína madura juega un papel decisivo en la localización final de la misma. Así, una serina en esta posición conlleva una localización en la membrana externa y un aspártico (carga negativa) en la interna (Yamaguchi *et al.*, 1988). También se ha comprobado que aún inhibiendo el corte del péptido señal de las proteínas PAL y

Lpp de *E. coli*, el resto de la cadena es capaz de atravesar la membrana interna e incluso de interactuar con el peptidoglicano, aunque permanece retenida en dicha membrana (Ichihara *et al.*, 1982; Yakushi *et al.*, 1997). Recientemente se han descubierto dos proteínas, LolA y LolB implicadas en la localización de las lipoproteínas de membrana externa. LolA es un transportador periplásmico capaz de reconocer la señal de localización para membrana externa de las lipoproteínas, las cuales son liberadas de la membrana interna mediante la formación un complejo soluble con dicha proteína, aparentemente en proporción 1:1 (Matsuyama *et al.*, 1995; Tajima *et al.*, 1998). LolB es una lipoproteína esencial, de la membrana externa, que funciona como receptora del complejo LolA-lipoproteína e interviene en la incorporación de la lipoproteína en dicha membrana (Matsuyama *et al.*, 1997).

2. EL SISTEMA Tol-PAL

Como se ha mencionado anteriormente, la membrana externa de las bacterias gram negativas constituye una eficiente barrera de permeabilidad contra un gran número de sustancias tóxicas. También se ha mencionado la importancia de algunas proteínas estructurales como OmpA o Lpp en *E. coli* y OprF en *P. aeruginosa*, en el mantenimiento de dicha barrera. En *E. coli*, en el minuto 16,8 de su mapa genético, se han localizado también otra serie de genes de gran importancia para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la membrana externa, los genes del denominado sistema Tol-PAL (*orf1*, *tolQ*, *tolR*, *tolA*, *tolB*, *pal* y *orf2*). La mutación de cualquiera de estos genes (exceptuando *orf1* y *orf2*) convierte a la bacteria en sensible a detergentes y otros compuestos inhibidores, además de provocar la liberación de enzimas periplásmicos al medio extracelular, y la formación de vesículas de membrana externa (Bernadac *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1989; Webster, 1991).

El sistema Tol-PAL de *E. coli* es un complejo multiproteico localizado en la envoltura celular y formado por tres proteínas de membrana interna (TolQ, TolR y TolA), dos proteínas periplásmicas (TolB y Orf2) y una lipoproteína de membrana externa (PAL), además de una proteína citoplásmica (Orf1). Los genes que codifican estas proteínas se agrupan formando dos operones. El primer operón está formado por los genes *orf1*, *tolQ*, *tolR* y *tolA*, y el segundo por los genes *tolB*, *pal* y *orf2* (en el orden indicado) (Vianney *et al.*, 1996). Una serie de experimentos, que incluyen entrecruzamientos con formaldehído, co-inmunoprecipitaciones y análisis de supresión de mutantes, han demostrado que el sistema Tol-PAL está organizado en dos complejos proteicos. Un complejo de membrana interna, formado por las proteínas TolQ, TolR y TolA, que interactúan entre sí a través de sus dominios transmembrana (Derouiche *et al.*, 1995; Germon *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1995); y un complejo asociado a la

membrana externa, formado por TolB, PAL y otras dos proteínas de la membrana externa, Lpp y OmpA (Fig. 1.7A) (Bouveret *et al.*, 1995; Clavel *et al.*, 1998; Derouiche *et al.*, 1999). Recientemente, Cascales y colaboradores (2000) han demostrado que estos dos complejos interactúan.

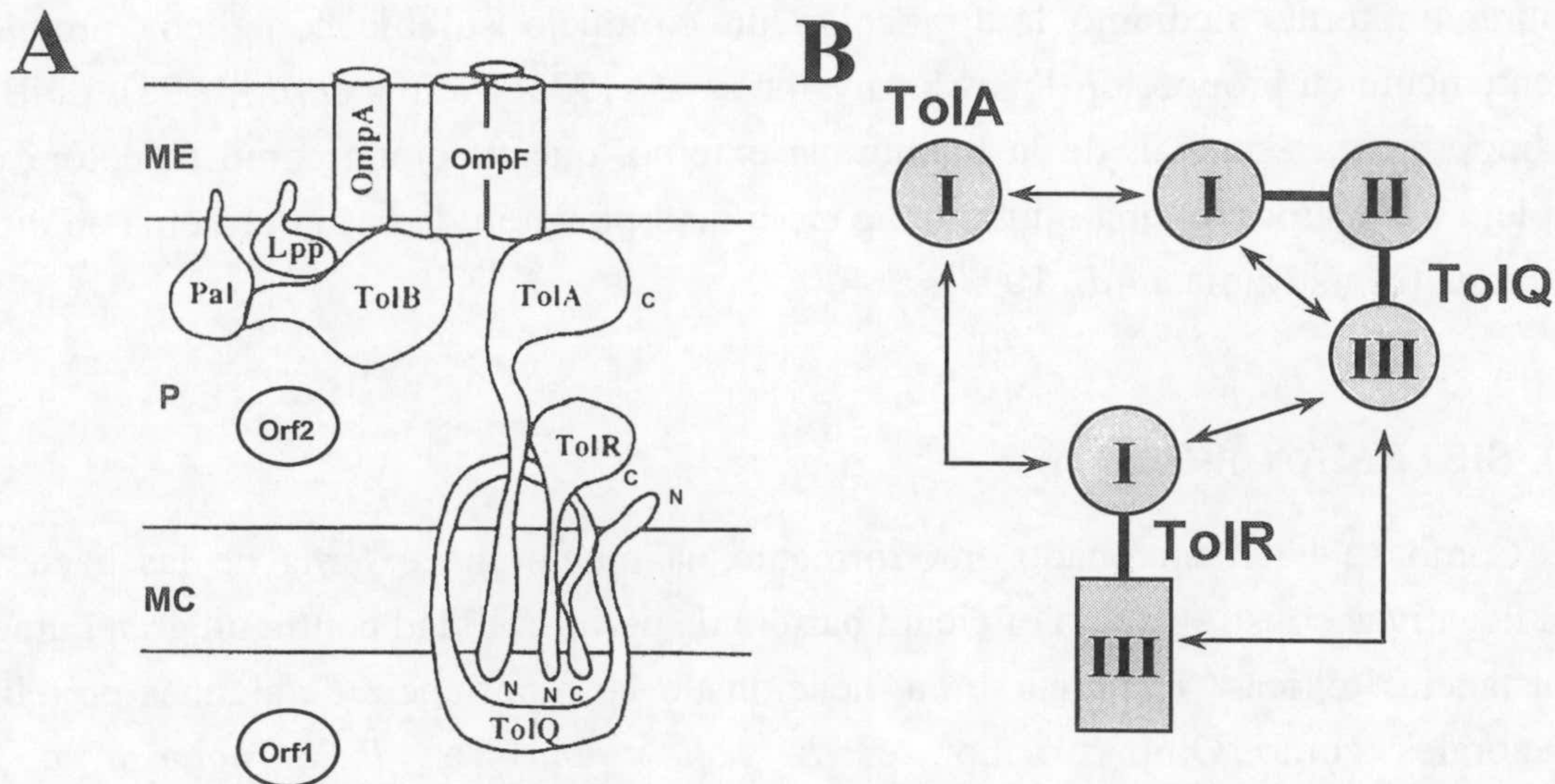


Figura 1.7. Sistema Tol-PAL. (A) Localización en la envoltura celular de las distintas proteínas del sistema Tol-PAL y de algunas de las proteínas con las que interactúan. ME, membrana externa; MC, membrana citoplásmica; P, periplasma; N, extremo amino; C, extremo carboxilo. (Adaptado de Lazdunski *et al.*, 1998). (B) Esquema de las interacciones demostradas hasta la fecha de los dominios transmembrana de las proteínas TolQ, TolR y TolA (círculos), y del dominio C-terminal de TolR (rectángulo). (Adaptado de Llobès *et al.*, 2001)

Las proteínas TolA y TolR constan de tres dominios. Ambas se anclan a la membrana interna a través de un dominio transmembrana amino terminal, localizándose el resto de la proteína en el periplasma (Levengood *et al.*, 1991; Levengood y Webster, 1989; Müller *et al.*, 1993). TolA posee un dominio central largo que atraviesa el periplasma en forma de hélice α (Levengood *et al.*, 1991) y que interactúa con ciertas porinas triméricas de la membrana externa (OmpF, OmpC, PhoE y LamB) pero no con la porina monomérica OmpA (Derouiche *et al.*, 1996). Este dominio está separado del segmento transmembrana N-terminal por cinco glicinas y del segmento globular C-terminal por otras tres (Webster, 1991; Derouiche *et al.*, 1999). La región periplásmica de TolR se divide a su vez en dos dominios, un dominio central de unos 100 aminoácidos implicado en la dimerización de la proteína (Journet *et al.*, 1999) y un corto dominio C-terminal de unos 24 aminoácidos que supuestamente se pliega

formando una hélice α anfipática capaz de asociarse con la membrana interna (Lazzaroni *et al.*, 1995). TolQ, por su parte, es una proteína integral de membrana con tres segmentos transmembrana (Vianney *et al.*, 1994). Se sabe que el segmento transmembrana de TolA (I) interacciona con el dominio transmembrana amino terminal de TolQ (I) (Derouiche *et al.*, 1995; Germon *et al.*, 1998) y con el segmento transmembrana de TolR (I) (Derouiche *et al.*, 1995), mientras que el tercer dominio transmembrana de TolQ (III) interacciona con el segmento transmembrana de TolR (I) (Lazzaroni *et al.*, 1995) (Fig. 1.7B). Supuestamente, el dominio C-terminal de TolR (III) también intervendría en la interacción entre TolQ y TolR (Lazzaroni *et al.*, 1995). Además, el primer y el tercer dominio de TolQ (I y III) también parecen estar en contacto (Fig.1.7B) (Lazzaroni *et al.*, 1995). También se han encontrado, por experimentos de entrecruzamiento con formaldehído, complejos TolR-TolR y TolR-TolR-TolQ, lo que sugiere que TolR podría formar dímeros *in vivo* (Germon *et al.*, 1998; Journet *et al.*, 1999). Sin embargo, nunca se han podido detectar mediante esta técnica ningún complejo TolQ-TolR-TolA, lo que podría indicar que estas tres proteínas no forman un complejo estable sino que más bien podrían interaccionar entre sí de forma secuencial (Journet *et al.*, 1999). Por otra parte, la proteína PAL interacciona *in vivo* con OmpA, y su presencia es requerida para que se produzca la interacción de TolB con Lpp y OmpA (Bouveret *et al.*, 1995; Clavel *et al.*, 1998). Además, la proteína TolB, de manera análoga a TolA, también interacciona con OmpF, OmpC, PhoE y LamB (Rigal *et al.*, 1997). Se han realizado también algunos análisis biofísicos de las proteínas de este sistema con el fin de determinar su estructura tridimensional. Hasta el momento, se han cristalizado las proteínas TolB (Abergel *et al.*, 1999; Carr *et al.*, 2000), el dominio periplásmico de TolR (Abergel *et al.*, 2001a) y la parte proteica de la lipoproteína PAL (Abergel *et al.*, 2001b). Además, el dominio C-terminal de la proteína TolA se ha co-cristalizado junto a la proteína g3p de la cápsida de los fagos (Lubkowski *et al.*, 1999), y su espectro de resonancia magnética nuclear también se ha resuelto (Deprez *et al.*, 2000).

Recientemente, se ha demostrado la interacción entre el complejo de membrana interna TolQ-TolR-TolA y el de membrana externa TolB-PAL-Lpp-OmpA, a través de la interacción del dominio C-terminal de TolA con PAL (Cascales *et al.*, 2000) y, probablemente, con TolB (Lloubès *et al.*, 2001). Así mismo, se ha demostrado que TolA experimenta cambios conformacionales que dependen tanto de la fuerza motriz (pmf) como de las proteínas TolQ y TolR, y de su propio segmento transmembrana (Cascales *et al.*, 2001; Germon *et al.*, 2001) y que tanto la pmf como TolQ y TolR son fundamentales para que se produzca la interacción entre PAL y TolA (Cascales *et al.*, 2000; 2001). Esta interacción demuestra claramente la existencia de un complejo que une las dos membranas de la envuelta celular, como ya se había sugerido

previamente al comprobar que las proteínas Tol se localizaban mayoritariamente en los sitios de contacto entre las membranas interna y externa (Guihard *et al.*, 1994). Además, el hecho de que el sistema Tol fuese utilizado por diversas colicinas como vía de entrada en la célula y dado que muchas de ellas requerían la presencia de las proteínas TolQ, TolR, TolA y TolB, también había favorecido esta idea (Lazdunski *et al.*, 1998 y 2000). Las colicinas son proteínas antibacterianas codificadas por plásmidos (que simultáneamente codifican una proteína de inmunidad), secretadas al medio por *E. coli* y activas contra cepas sensibles de *E. coli* y bacterias relacionadas (James *et al.*, 1996; Kleanthous *et al.*, 1998; Lazdunski, 1995; Lazdunski *et al.*, 1998 y 2000). Estas proteínas, cuya estructura tridimensional se ha determinado en algunos casos (Elkins *et al.*, 1997; Parker *et al.*, 1992; Wiener *et al.*, 1997), constan de tres dominios: un dominio central implicado en el reconocimiento de un receptor de membrana específico, un dominio N-terminal necesario para la translocación y un tercer dominio C-terminal responsable de la actividad letal (ADNasa, ARNasa, "porina", etc.). Las colicinas se dividen en dos grupos según su ruta de entrada en la célula: las colicinas del grupo A (A, E1-E9, K, L, N, S4, bacteriocina 28b y cloacina DF13) usan el sistema Tol y las del grupo B (B, D, G, H, Ia, Ib, M, Q, V, 5 y 10) usan el sistema TonB (Lazdunski *et al.*, 2000). Existen células mutantes, insensibles a la acción de las colicinas debido a la pérdida del receptor de membrana (denominadas "resistentes") o bien debido a mutaciones en el sistema de translocación (denominadas "tolerantes"). Entre estas últimas se encuentran las diversas mutaciones en los genes *tol*. El mecanismo de entrada de las colicinas se ha propuesto como sistema modelo para el estudio del transporte de proteínas a través de las membranas (Lazdunski, 1995), y se ha analizado en profundidad, particularmente en el caso de la colicina A (Journet *et al.*, 2001; Lazdunski *et al.*, 1998 y 2000). De esta forma, se sabe que el dominio C-terminal de TolA interacciona *in vitro* con las colicinas A, N y E1, concretamente con su dominio N-terminal (de translocación) (Bénédicti *et al.*, 1991; Derouiche *et al.*, 1997; Gokce *et al.*, 2000; Ragget *et al.* 1998), y se ha demostrado la interacción de TolB con el dominio N-terminal de las colicinas A, E3 y E9 (Bouveret *et al.*, 1997 y 1998; Carr *et al.*, 2000). En el caso de la colicina A, en estas dos interacciones están implicadas dos regiones distintas de la colicina mapeadas entre los residuos 7 y 20 para la interacción con TolB, y entre los residuos 52 y 97 para la interacción con TolA (Bouveret *et al.*, 1998; Journet *et al.*, 2001). En las colicinas E2 y E9 existe una región homóloga a la secuencia entre los residuos 11-18 de la colicina A, y en el caso de la colicina E9 se ha visto que esa secuencia también es la responsable de su interacción con TolB (Carr *et al.*, 2000). A esta secuencia consenso de estas colicinas se la llamado "caja TolB" (Bouveret *et al.*, 1998), y se ha visto que esta conservada en las colicinas que necesitan TolB para su translocación (colicinas A, E2 a E9, K, U y bacteriocina 28b) (Bouveret *et al.*, 1997;

Carr *et al.*, 2000). Sin embargo, la región responsable de la interacción con TolA parece ser más variable. Además, recientemente se ha demostrado que las colicinas A y E3 también interacciona con el dominio central de la proteína TolR durante el proceso de translocación (Journet *et al.*, 2001). La región comprendida entre los residuos 7 y 14 de la colicina A está implicada en esta interacción con TolR (Journet *et al.*, 2001), pero esta región no está demasiado conservada en las colicinas del grupo A y se ha sugerido que la interacción de la colicina con TolB, mediante la “caja TolB” que aparece altamente conservada en estas colicinas, podría conducir la interacción de esa secuencia menos conservada de la colicina con TolR (Journet *et al.*, 2001). Esto concuerda con el hecho de que todas las colicinas que necesitan TolB para su translocación, también necesitan la proteína TolR. En cuanto al proceso de translocación de la colicina A (que precisa de las proteínas OmpF, TolA, TolB, TolQ y TolR) se ha propuesto el siguiente modelo basado en todos los datos experimentales disponibles (Lazdunski *et al.*, 1998 y 2000) (Fig.1.8): Pasos 1 y 2, la colicina se “despliega” tan pronto como se une a su receptor (BtuB) lo que permitiría el acceso de su dominio N-terminal (T) al canal de OmpF (Duché *et al.*, 1994; Jeanteur *et al.*, 1994). Nada más acceder a la cara interna de la membrana externa, el dominio T interaccionaría con TolB que estaría unida a PAL, y eventualmente desplazaría a TolB de PAL, lo cual permitiría a esta última interaccionar mejor con el peptidoglicano, dado que las regiones de PAL que interaccionan con TolB y con el peptidoglicano solapan (Bouveret *et al.*, 1999; Clavel *et al.*, 1998). Corriente abajo y corriente arriba de la “caja TolB” presente en el dominio T de la colicina, se encuentran las denominadas “caja TolA” y “caja TolR” (Bouveret *et al.*, 1998; Journet *et al.*, 1999), respectivamente, que permiten la interacción de estas proteínas con el dominio T (paso 3). Recientemente, Deprez y colaboradores (2002) han determinado *in vitro* que la interacción con la colicina A provoca un cambio conformacional en el dominio C-terminal de TolA. Durante esta secuencia de interacciones, y de un modo aún por dilucidar, el dominio C-terminal se translocaría a través de la membrana externa hasta alcanzar la membrana interna donde formaría un poro. Se sabe que la colicina A continúa interaccionado con su receptor y con el sistema de translocación una vez ha formado el poro, con lo que adoptaría una conformación extendida a través de la envoltura celular (Bénédicti *et al.*, 1992; Duché *et al.*, 1994).

De forma análoga a las colicinas, ciertos bacteriófagos filamentosos (f1, fd y M13) también usan el sistema Tol como vía de entrada para su genoma de ADN monocatenario (Click y Webster, 1997 y 1998), requiriendo concretamente la presencia de las proteínas TolQ, TolR y TolA durante la infección (Sun y Webster, 1986 y 1987). En el caso de TolA, se ha determinado que su dominio C-terminal es esencial para que se produzca infección porque interacciona con la proteína g3p de la cápsida del fago. De

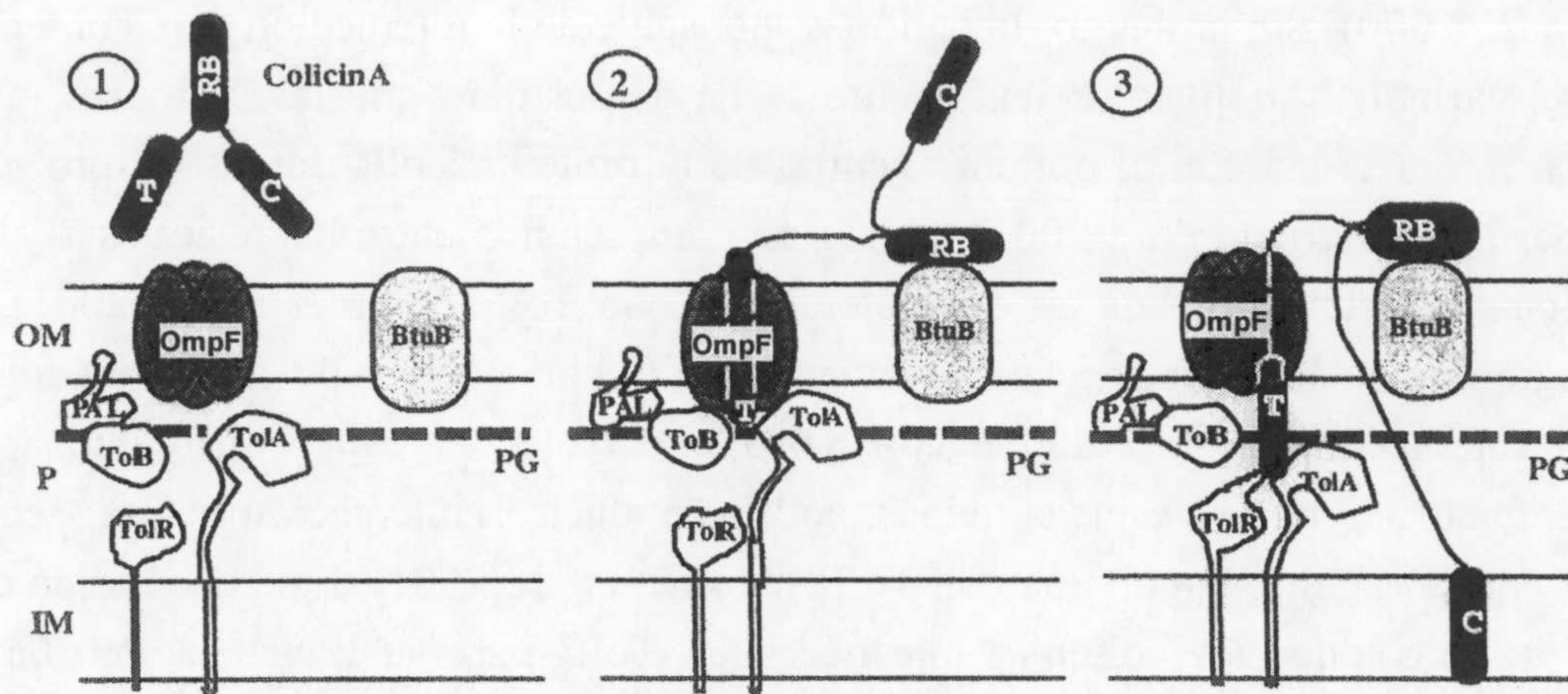


Figura 1.8. Modelo propuesto para la translocación de la colicina A. ME, membrana externa; MC, membrana citoplásmica; P, periplasma; PG, peptidoglicano; C, región carboxilo terminal (dominio formador del poro); T, región amino terminal (dominio implicado en la translocación); RB, región central (dominio de unión al receptor). (Obtenido de Lazdunski *et al.*, 2000 y basado en datos de Journet *et al.*, 2001).

hecho, este dominio se ha designado como el co-receptor para la infección de este tipo de fagos (Riechmann y Holliger, 1997; Lubkowshi *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha sugerido que, a pesar de la similitud que pueda existir entre ambos procesos, las colicinas y los bacteriófagos filamentosos interaccionarían de forma distinta con TolA durante su translocación, ya que la interacción de la proteína g3p con el dominio C-terminal de TolA no parece provocar un cambio conformacional en este último (Deprez *et al.*, 2002).

Como se mencionó anteriormente, el sistema TonB (Fig. 1.9) también es parasitado por las colicinas del grupo B además de por los fagos T1 y $\phi 80$. Este sistema está compuesto por las proteínas TonB, ExbB y ExbD. Las dos últimas guardan una similitud significativa con TolQ y TolR, (del 79,1% y 70% en *E. coli*), respectivamente, e incluso se complementan parcialmente (Braun, 1989; Braun y Herrmann, 1993; Eick-Helmerich y Braun, 1989). TolA y TonB sólo presentan similitud de secuencia en su segmento transmembrana y, aunque ambos poseen conformaciones alargadas, sus estructuras son diferentes. Mientras que el dominio central de TolA posee estructura de α -hélice (Derouiche *et al.*, 1999; Levengood *et al.*, 1991), el dominio equivalente de TonB presenta un secuencia rica en residuos de prolina (Evans *et al.*, 1986; Postle y Good, 1983). Como las proteínas del complejo Tol de membrana interna, las proteínas del sistema TonB también interaccionan entre sí de manera muy similar y se ha encontrado que forman homomultímeros (dímeros y trímeros) (Higgs *et al.*, 1998).

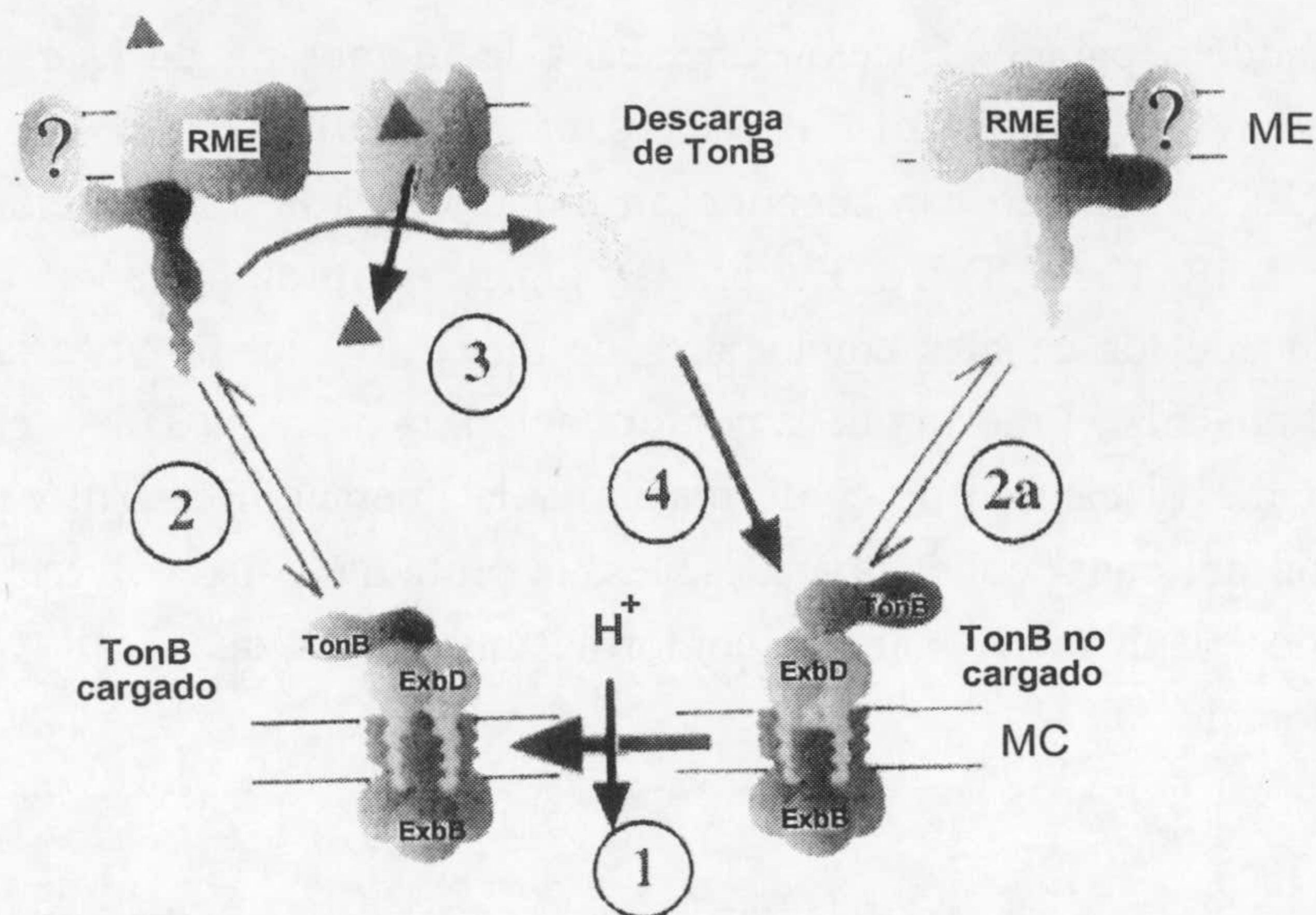


Figura 1.9. Modelo de transducción de energía dependiente de TonB. 1, Transición de TonB desde la conformación "no cargada" hasta la conformación "cargada" (energetizada) acoplada al gradiente de protones. Aunque se desconoce el mecanismo, ExbB parece estar directamente implicada en dicho proceso. El complejo proteico de membrana interna ExbB/ExbD se representa como un heterohexámero basándose en los datos de Higgs *et al.* (1998). 2, TonB en su conformación "cargada" interacciona con componentes de la membrana externa (RME, receptor de membrana externa; ?, proteínas de la membrana externa aún sin identificar). Estas interacciones ocurren independientemente del estado energético de TonB (2a). En este modelo, se asume que TonB no permanece asociada a la membrana citoplásmica mientras interacciona con los componentes de la membrana externa, según se deduce de datos obtenidos a partir de experimentos de fraccionamiento subcelular (aunque se desconoce lo que sucede *in vivo*). La presencia de ligando unido al RME potencia su interacción con TonB. 3, La liberación de la energía almacenada por TonB provoca un cambio conformacional del RME que conduce a la entrada del ligando unido. El mecanismo de transporte del ligando aún no se ha dilucidado. 4, Tras la transferencia de energía al RME, TonB se recicla interaccionando nuevamente con el complejo ExbB/ExbD. MC, membrana citoplásmica; ME, membrana externa. (Obtenido de Larsen *et al.*, 1999).

Las proteínas TolQ y TolR parecen transducir la pmf a TolA mediante un mecanismo probablemente homólogo a la transducción de la pmf a TonB por parte de ExbB y ExbD (Cascales *et al.*, 2001). La homología funcional y estructural de estos sistemas, con el sistema Mot que forma el motor del flagelo (Braun *et al.*, 1999; van Way *et al.*, 2000), y los estudios mediante supresiones génicas (Lazzaroni *et al.*, 1995; Garza *et al.*, 1996), sugieren la posible existencia de un poro iónico formado por los dos últimos segmentos transmembrana de TolQ (II y III), el segmento transmembrana de TolR y posiblemente también por el dominio C-terminal de TolR (Cascales *et al.*, 2001). En base a esto y a las predicciones realizadas sobre la posible estequiometría del complejo Tol-PAL, en las que la relación entre TolQ:TolR sería de aproximadamente

2,7-3:1 (Guihard *et al.*, 1994) y entre TolR:TolA de 2:1 (Cascales *et al.*, 2001), se ha propuesto un modelo para la fracción anclada a la membrana de este complejo de membrana interna TolQ-TolR-TolA (Cascales *et al.*, 2001) (Fig. 1.10). Cascales y colaboradores (2001) también han sugerido un modelo para la transducción de energía desde TolQ y TolR hasta TolA. En primer lugar, un protón penetraría desde el periplasma a uno de los canales conductores de iones, lo cual provocaría un cambio conformacional en TolA. En esta nueva conformación, la proteína TolA “energetizada” podría ser liberada. El cambio de conformación y la liberación de TolA permitiría la salida del protón del canal conductor. Después, la proteína TolA volvería a su estado “no energetizado” y un nuevo cambio conformacional haría que TolR volviera a su entorno no protonado.

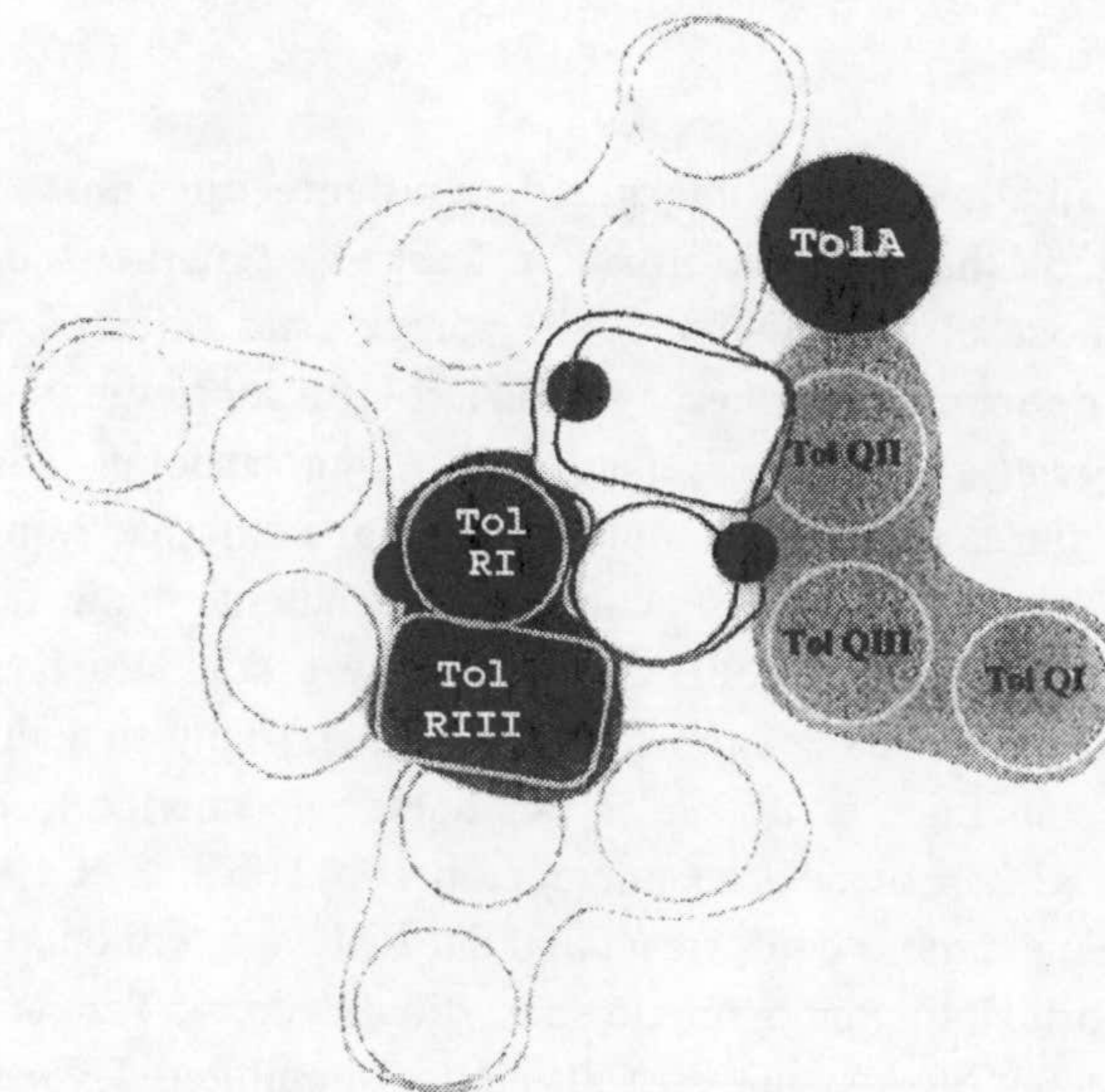
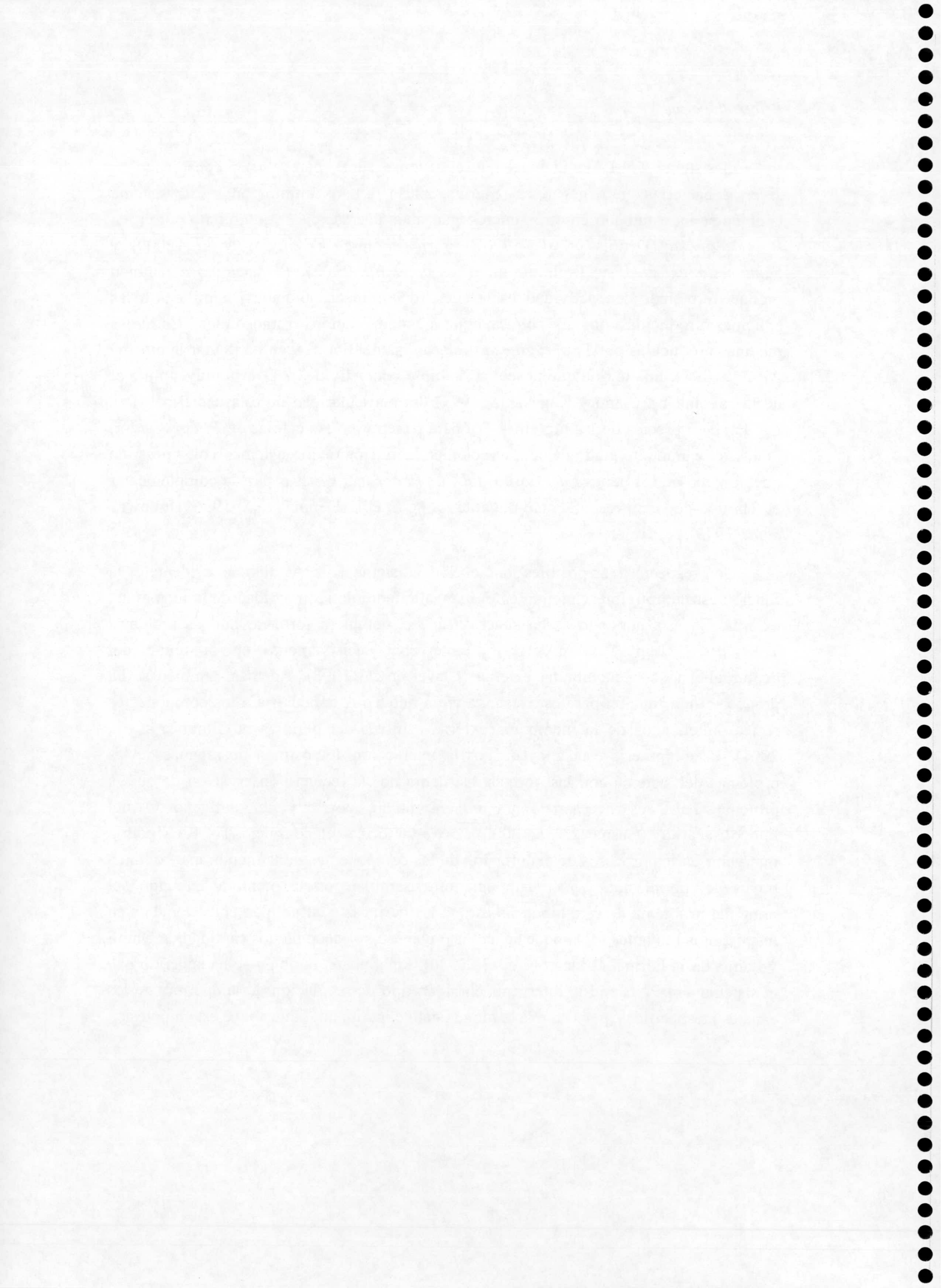


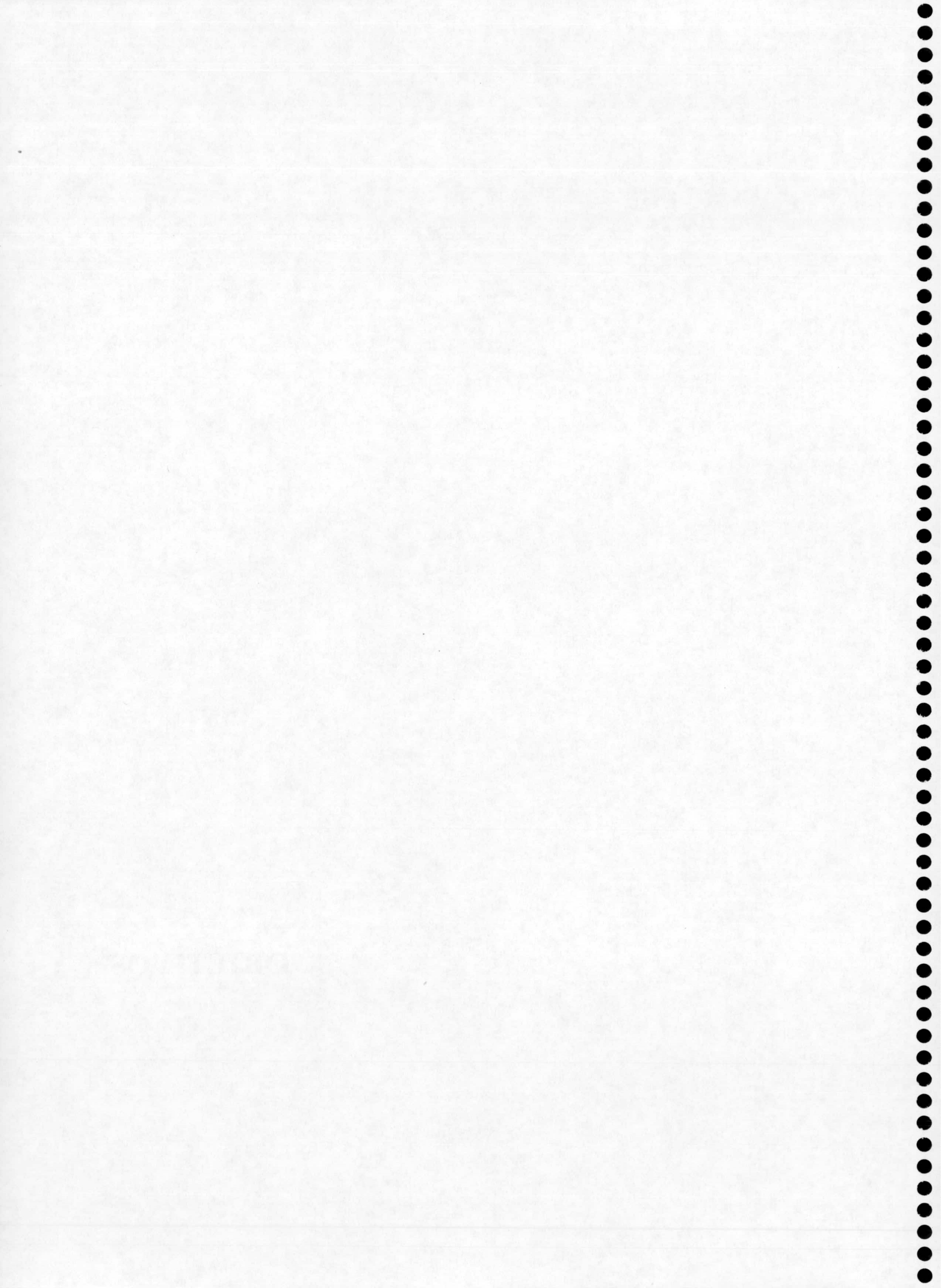
Figura 1.10. Visión periplásmica del modelo de ensamblaje propuesto para los segmentos transmembrana del complejo de membrana interna TolQ-R-A. En el diagrama, cuatro proteínas TolQ (gris claro) aparecen formando un anillo con simetría C_4 que rodearía un dímero de la proteína TolR (gris oscuro) con simetría C_2 . La interacción TolQ-TolR rompe la simetría del anillo externo dando lugar a dos entornos de TolQ diferentes. Por otra parte, la simetría C_2 de TolR también se rompería por su interacción con el dominio transmembrana de TolA (negro), que a su vez también interacciona con el dominio I de TolQ. Los círculos pequeños negros representan los posibles canales conductores de protones propuestos en TolQ y TolR. (Obtenido de Cascales *et al.*, 2001).

El sistema Tol-PAL, al igual que el sistema TonB, parece estar conservado en diversas bacterias gram negativas (Sturgis, 2001). En los últimos años este sistema también se ha estudiado en otros microorganismos además de *E. coli*, como por ej. en *P. aeruginosa* (Dennis *et al.*, 1996), *Vibrio cholerae* (Heilpern *et al.*, 2000) y *Salmonella enterica* sv Typhimurium (Prouty *et al.*, 2002). *P. aeruginosa* también produce proteínas con actividad bactericida (denominadas piocinas), similares a las colicinas producidas por *E. coli*, aunque de codificación cromosómica. Entre las piocinas producidas por *P. aeruginosa* destacan las del tipo S y en particular la piocina AP41 (AR41), una toxina que posee un dominio con actividad ADNasa muy similar al de la colicina E2 (Sano y Kageyama, 1993). La particularidad de esta bacteriocina es que también precisa de las proteínas Tol para penetrar en las células de *P. aeruginosa*, lo que refleja un alto grado de conservación en la función de los sistemas Tol, a pesar de que ninguno de los genes *tolQ*, *tolR* o *tolA* de *P. aeruginosa* es capaz de complementar el fenotipo de su correspondiente mutante *tol* de *E. coli* (Dennis *et al.*, 1996; Holloway *et al.*, 1973).

Con respecto a las posibles funciones del sistema Tol-PAL, la más evidente es la función estructural, interviniendo en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa. En este contexto se ha sugerido que el complejo formado por las proteínas TolB, PAL, Lpp y OmpA, podría intervenir decisivamente en la unión del peptidoglicano a la membrana externa (Clavel *et al.*, 1998). Además, también se ha propuesto una función para este sistema en la que TolA conduciría a los componentes recién sintetizados de la membrana externa a través del periplasma (Lloubès *et al.*, 2001). Esta hipótesis está apoyada por la interacción demostrada de algunas de las proteínas del sistema con las porinas, así como por la reciente observación de que la proteína TolA es necesaria para el ensamblaje correcto del antígeno O del lipopolisacárido (Gaspar *et al.*, 2000). De esta forma, el complejo Tol-PAL podría intervenir en los procesos de exportación de los componentes de la membrana externa a través del periplasma y/o en su posterior ensamblaje en la membrana, aunque el principal problema de esta hipótesis es que las porinas se ensamblan correctamente en los distintos mutantes *tol* aunque se ha visto que éstos poseen menos cantidad de OmpF y LamB de la normal (Lazzaroni *et al.*, 1986). Finalmente, también se ha sugerido que el sistema Tol-PAL podría intervenir en algún tipo de regulación de la apertura de los canales inespecíficos, pero no existe ningún dato experimental que apoye esta hipótesis.



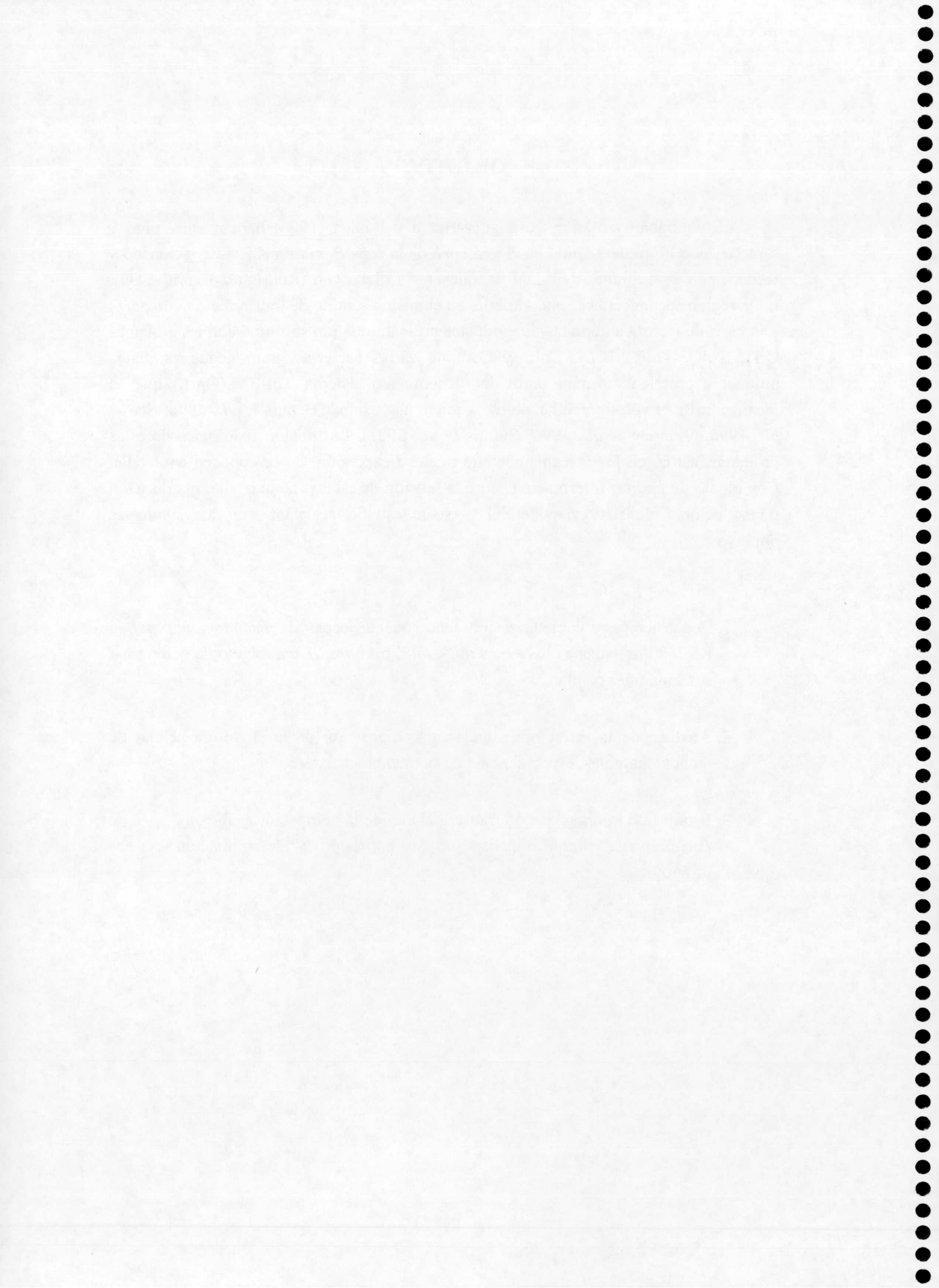
OBJETIVOS



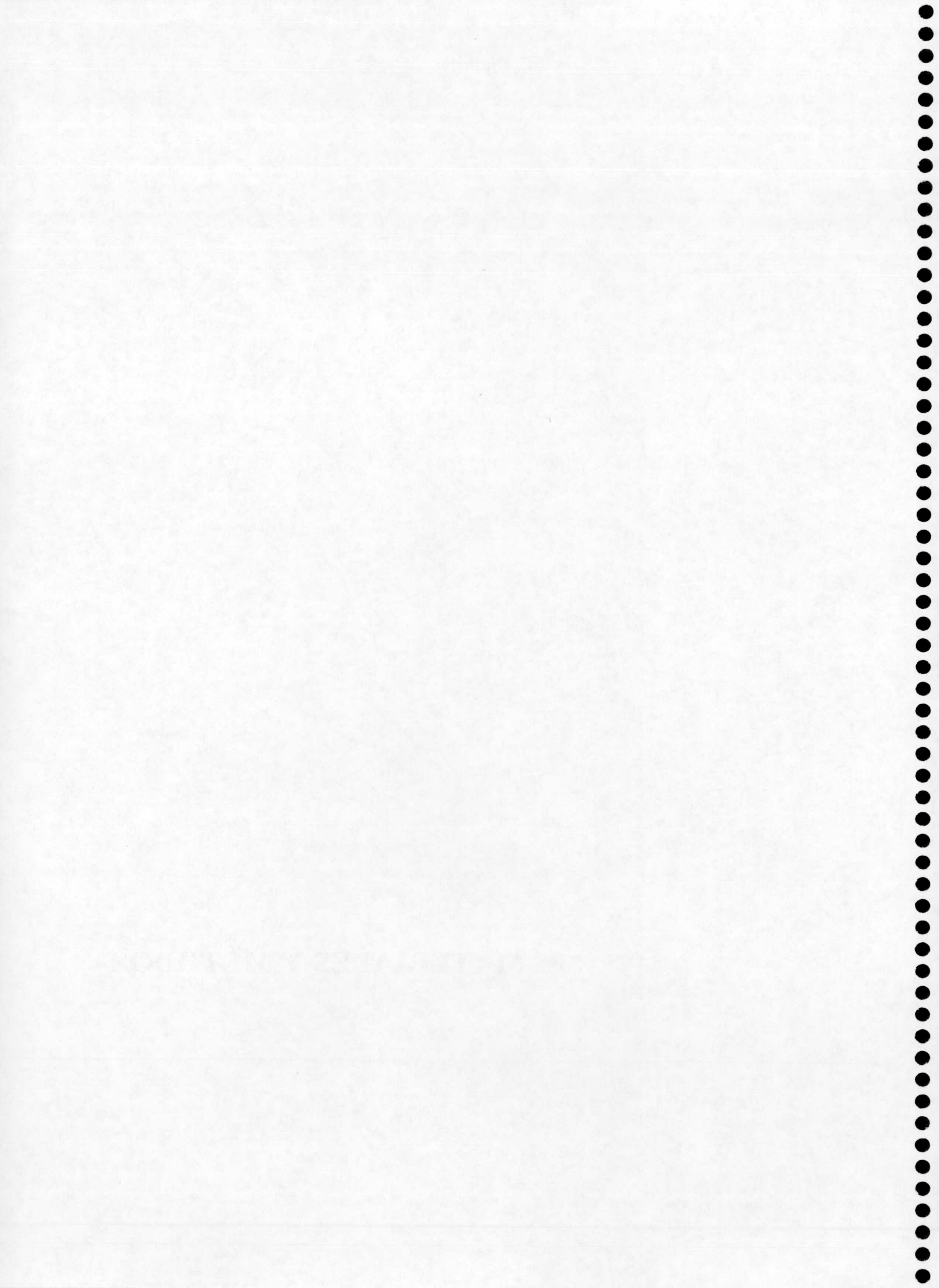
OBJETIVOS

En un trabajo anterior, Rodríguez-Herva y Ramos (1996) habían construido y caracterizado un mutante nulo en el gen *oprL* de la cepa *P. putida* KT2440, y clonado y secuenciado las regiones de ADN flanqueantes a dicho gen (Rodríguez-Herva, 1999). En la región secuenciada se encontraron, en el mismo sentido de transcripción que *oprL*, seis fases de lectura abierta cuyos productos presentaron gran similitud con las proteínas Orf1, TolQ, TolR, TolA, TolB y Orf2 de varias bacterias gram negativas. Estos productos proteicos forman parte del denominado sistema Tol-PAL(OprL) que se localiza en la envoltura celular de estos microorganismos (Dennis *et al.*, 1996; Sen *et al.*, 1996; Vianney *et al.*, 1996; Sturgis *et al.*, 2001). La función fisiológica de estas proteínas, así como los mecanismos que rigen su expresión, no se conocen en detalle. Con objeto de aportar información sobre la función de estas proteínas y la organización transcripcional de sus genes, en el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Construcción y caracterización fenotípica de cepas de *Pseudomonas putida* KT2440 mutadas en los genes *tolQ*, *tolR*, *tolA* y *tolB*, con objeto de determinar sus funciones celulares.
2. Análisis de la estructura, función y composición de la envoltura celular de dichos mutantes, especialmente de su membrana externa.
3. Estudio de la organización transcripcional de la agrupación génica *tol-oprL* de *Pseudomonas putida*, análisis de su expresión y determinación de sus promotores.



MATERIALES Y MÉTODOS



1. CEPAS BACTERIANAS Y SU CONSERVACIÓN

Las estirpes utilizadas en este trabajo, junto con su genotipo o sus características fenotípicas más relevantes, se recogen en la Tabla 2.1. Las cepas se conservaron a corto plazo a 4°C, en cultivos en estría sobre placas de medio sólido, y a largo plazo a -80°C, en cultivos líquidos mezclados en proporción 1:1 con glicerol al 80% (v/v).

TABLA 2.1. Estirpes bacterianas

Estirpe	Genotipo/Características	Referencia/Fuente
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>gyrA96</i> (Nal ^R) <i>relA1 thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F' [<i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^a <i>lacZ</i> Δ M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal ^R) <i>thi-1 relA1</i>	Hanahan (1983)
CC118	Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE</i> (Sp ^R) <i>rpoB</i> (Rif ^R) <i>argE recA1</i>	Manoil y Beckwith (1985)
CC118 λ pir	CC118 lisogenizada con el fago λ pir	Herrero <i>et al.</i> (1990)
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>xyl-5 mtl-1</i>	Boyer y Roulland-Dussoix (1969)
1292	<i>supE hsdS met gal lacY fhuA</i>	W. Wood (donación)
JC7782	1292 <i>tolA</i> (parada después del codón 40)	J. C. Lazzaroni (donación)
JC7752	1292 <i>tolB</i> (parada después del codón 363) Δ <i>pal</i>	Bouveret <i>et al.</i> (1995)
JC3417	1292 <i>tolB</i> (parada después del codón 329)	Isnard <i>et al.</i> (1994) Lazzaroni <i>et al.</i> (1989)
JC8031	1292 Δ <i>tolRA</i>	Derouiche <i>et al.</i> (1995)
GM1	<i>ara</i> Δ (<i>lac-pro</i>) <i>thi</i> / F' [<i>lac-pro</i>]	D. Steege (donación)
TPS13	GM1 <i>tolQ</i> (parada después del codón 36)	Sun y Webster (1986, 1987)
TPS300	GM1 <i>tolR::Cm, Cm</i> ^R	Sun y Webster (1987)
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. putida</i> KT2440	<i>hsdR1</i>	Franklin <i>et al.</i> (1981)

(Continúa en la página siguiente)

2. Materiales y Métodos

(continuación)

Estirpe	Genotipo/Características	Referencia/Fuente
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. putida</i> QX	KT2440 <i>tolQ::xylE</i> (proteína TolQ acortada a 17 aminoácidos)	Este trabajo
<i>P. putida</i> RX	KT2440 <i>tolR::xylE</i> (proteína TolR completamente eliminada)	Este trabajo
<i>P. putida</i> AX	KT2440 <i>tolA::xylE</i> (proteína TolA acortada a 94 aminoácidos)	Este trabajo
<i>P. putida</i> BX	KT2440 <i>tolB::xylE</i> (proteína TolB acortada a 29 aminoácidos)	Este trabajo
<i>P. putida</i> PX	KT2440 <i>oprL::xylE</i> (proteína OprL acortada a 16 aminoácidos)	Rodríguez-Herva y Ramos (1996)
<i>P. putida</i> QΩ	KT2440 <i>tolQ::ΩKm</i> (inserción del interposón Ω-Km después del codón 129), Km ^R	Este trabajo
<i>P. putida</i> RΩ	KT2440 <i>tolR::ΩKm</i> (inserción del interposón Ω-Km después del codón 46), Km ^R	Este trabajo
<i>P. putida</i> AΩ	KT2440 <i>tolA::ΩKm</i> (inserción del interposón Ω-Km después del codón 180), Km ^R	Este trabajo
<i>P. putida</i> BΩ	KT2440 <i>tolB::ΩKm</i> (inserción del interposón Ω-Km después del codón 314), Km ^R	Este trabajo
<i>P. putida oprB</i>	KT2440 con plásmido pCHESI-B integrado en el cromosoma (inserción después del codón 112 de <i>oprB</i>), Km ^R	Este trabajo
<i>P. putida</i> KT2442	<i>P. putida</i> KT2440 Rif ^R	Franklin <i>et al.</i> (1981)
<i>P. putida</i> DOT-OX3	KT2442 <i>wzy::luxAB</i> , Rif ^R , Km ^R	Rodríguez-Herva <i>et al.</i> (1999)
<i>P. aeruginosa</i> H103	PAO1, protótrofa	Hancock y Carey (1979)
<i>P. aeruginosa</i> H636	PAO1 <i>oprF::ΩSm</i> , Sm ^R	Woodruff y Hancock (1988)
<i>P. aeruginosa</i> H729	PAO1 <i>oprD::Km</i> , Km ^R	Huang y Hancock (1993)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1403	PAO1 <i>tol-1</i>	Holloway <i>et al.</i> (1973)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1408	PAO1 <i>tol-2</i>	Holloway <i>et al.</i> (1973)

(Continúa en la página siguiente)

(continuación)

Estirpe	Genotipo/Características	Referencia/Fuente
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1419	PAO1 <i>tol-4</i>	Holloway <i>et al.</i> (1973)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1652	PAO1 <i>tol-5 (tolQ)</i>	Holloway <i>et al.</i> (1973), Dennis <i>et al.</i> (1996)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1654	PAO1 <i>tol-6</i>	Holloway <i>et al.</i> (1973)

2. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Medios de cultivo

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

Para el ensayo de crecimiento de los mutantes *tol-oprL* en medio mínimo con distintas fuentes de carbono, se usó medio M9 y como fuentes de carbono se usaron arginina 20 mM, benzoato 10 mM, fructosa 20 mM, glicerol 40 mM, glucosa 20 mM, prolina 20 mM o succinato 20 mM. Para el cultivo de *E. coli* en medio mínimo se usó medio M9 suplido con MgSO₄ y CaCl₂, y con 0,05 mM de tiamina y 0,0045% (p/v) de metionina cuando fue necesario. Las cepas de *P. aeruginosa* se cultivaron en el mismo medio mínimo que *P. putida* con 0,1 mM de triptofano y 0,045% (p/v) de metionina cuando se necesitó.

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

2. Materiales y Métodos

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

2.2. Condiciones de cultivo

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

2.3. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en agua desionizada (H₂O_d) concentrados 1.000 veces y se esterilizaron por filtración, excepto el cloramfenicol que se preparó en etanol absoluto, y la rifampicina y la tetraciclina que se disolvieron en metanol. Los antibióticos se usaron a las concentraciones finales siguientes (en µg/ml): ácido nalidíxico, 10; ampicilina, 100; cloramfenicol, 30; estreptomina, 50 ó 100; gentamicina, 10 (para *E. coli*) y 40 (para *P. putida*); kanamicina, 25 ó 50; rifampicina, 10 ó 20; y tetraciclina, 10 ó 20.

3. PLÁSMIDOS

En la Tabla 2.2 se muestran los vectores de clonación utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. A continuación se describen con más detalle las características de los plásmidos mencionados en dicha tabla. Los plásmidos de nueva construcción utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 2.3.

TABLA 2.2. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Características	Referencia/Fuente
pBBR1MCS-5	Gm ^R ; <i>oriTRK2</i> , α-complementación	Kovach <i>et al.</i> (1995) GenBank: U25061
pCHESIΩKm	Ap ^R , Km ^R ; pUNØ18 con fragmento <i>HindIII</i> de pHP45ΩKm (interposón Ω-Km), <i>oriTRP4</i>	Rodríguez-Herva <i>et al.</i> (sin publicar)
pHP45ΩKm	Ap ^R , Km ^R ; <i>oriColE1</i> , porta el interposón Ω-Km ^R	Fellay <i>et al.</i> (1987)
pJB3Km1	Ap ^R , Km ^R ; <i>oriVRK2</i> , <i>trfA</i> , <i>oriTRK2</i> , α-complementación	Blatny <i>et al.</i> (1997) GenBank: U75323
pJB3Tc19	Ap ^R , Tc ^R ; <i>oriVRK2</i> , <i>trfA</i> , <i>oriTRK2</i> , α-complementación	Blatny <i>et al.</i> (1997)

(Continúa en la página siguiente)

(continuación)

Plásmido	Características	Referencia/Fuente
pKNG101	Sm ^R ; <i>oriR6K</i> , <i>oriTRK2</i> , <i>sacB</i>	Kaniga <i>et al.</i> (1991)
pMLB1034	Ap ^R ; <i>oriColE1</i> , porta un gen ' <i>lacZ</i> sin promotor ni sitio de unión al ribosoma, y sin el codón de iniciación de la traducción.	Silhavy y Beckwith (1985)
pMP220	Tc ^R ; IncP, amplio espectro de huésped, porta un gen <i>lacZ</i> sin promotor	Spaink <i>et al.</i> (1987)
pRK600	Cm ^R ; <i>oriColE1</i> , <i>mobRK2</i> , <i>traRK2</i>	Kessler <i>et al.</i> (1992)
pUC18	Ap ^R ; <i>oriColE1</i> , <i>rop⁻</i> , α -complementación	Norlander <i>et al.</i> (1983) GenBank: L08752
pUC18Not	Ap ^R ; idéntico a pUC18 pero con sitios <i>NotI</i> flanqueando el MCS de pUC18	Herrero <i>et al.</i> (1990)
pUNØ18	Ap ^R , pUC18 con <i>oriTRP4</i> para permitir su replicación en <i>Pseudomonas</i>	Marqués <i>et al.</i> (1998)
pXYLE10	Km ^R ; porta un gen <i>xylE</i> sin promotor	Stein (1992)

pBBR1MCS-5: plásmido de 4.768 pb de medio número de copias (30-40 copias/célula en *E. coli*) y de amplio espectro de huésped (Fig. 2.1), derivado de pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994). Este último plásmido se construyó a su vez de un plásmido de *Bordetella bronchiseptica* (Antoine y Locht, 1992). El plásmido pBBR1MCS-5 posee el MCS y las regiones *lac* de pBluescript II KS (Stratagene, ref. 212207) que permiten la α -complementación. Flanqueando al MCS, el plásmido posee los promotores de los bacteriófagos T3 y T7. Este plásmido, que se replica en bacterias del género *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* entre otros, es compatible con otros plásmidos de amplio espectro de huésped pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncP, IncW e IncQ, y también con aquellos que poseen orígenes de replicación de ColE1 o de p15A. Además, se puede transferir por conjugación a otras bacterias cuando se aportan las funciones de movilización de RK2 en *trans*. El plásmido pBBR1MCS-5 confiere resistencia a gentamicina.

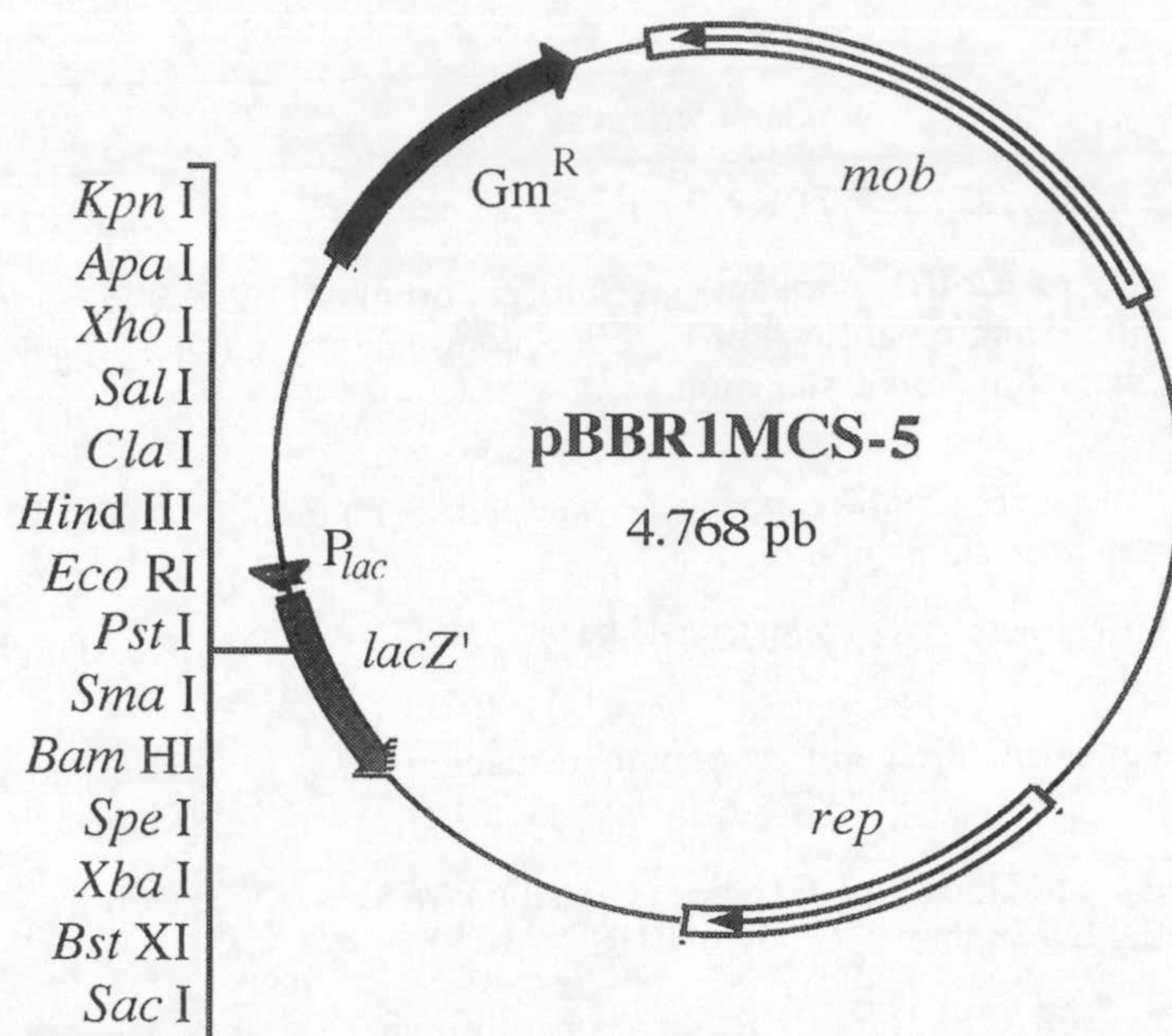


Figura 2.1. Plásmido pBBR1MCS-5. Los sitios de restricción indicados son únicos y están localizados en el MCS dentro del gen *lacZ'*. Se muestra la localización del gen *rep*, que codifica una proteína esencial para la replicación, del gen *mob*, que codifica una proteína esencial para la movilización por conjugación, y del gen de resistencia a gentamicina. Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes.

pCHESIΩKm: plásmido de 5.673 pb derivado de pUC18 que contiene el origen de replicación *oriT* de RP4 lo que permite transferirlo a otras bacterias cuando se aportan las funciones de movilización en *trans* (Fig. 2.2). Contiene el interposón Ω-Km del plásmido pHP45ΩKm insertado en el sitio *HindIII* del MCS. Permite la generación de mutantes en bacterias gram negativas en las que no se repliquen los plásmidos con origen *oriColE1* (por integración del plásmido en el cromosoma). Para ello un fragmento interno del gen a mutar se clonaría en uno de los sitios del MCS el plásmido. Tras transferirlo a la cepa huésped los mutantes se seleccionan y se mantienen gracias a la resistencia a kanamicina. Si el sentido de transcripción del fragmento clonado está a favor del P_{lac} , se generan mutantes no polares. En caso contrario se generarán mutantes polares. Confiere resistencia a ampicilina y a kanamicina.

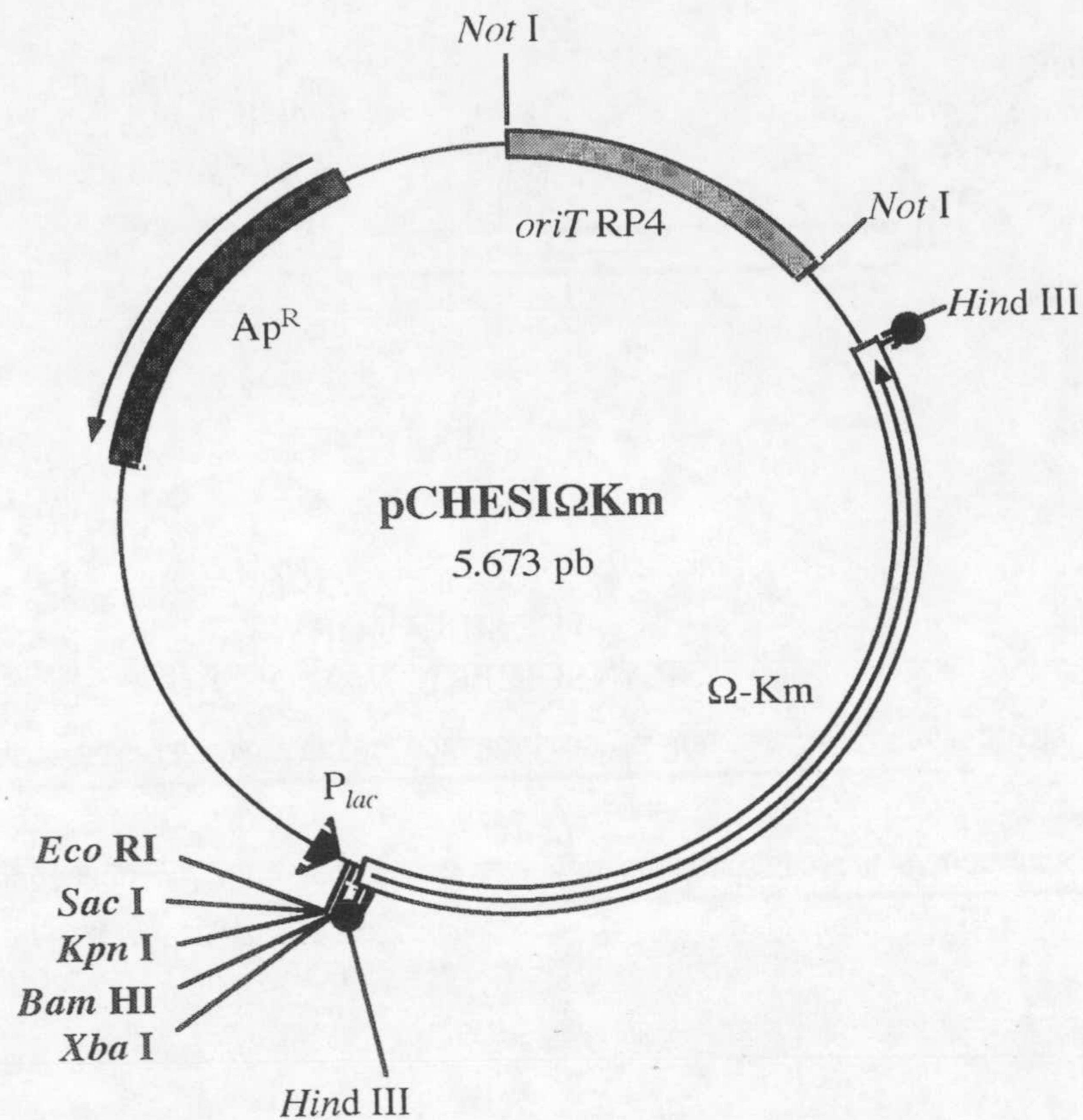


Figura 2.2. Plásmido pCHESIΩKm. Los sitios de restricción únicos se indican en negrita. Se muestra la localización del origen de transferencia (*oriTRP4*), del gen de resistencia a ampicilina y del interposón Ω -Km. Los círculos cerrados indican las señales de parada de la transcripción del fago T4. Las flechas indican el sentido de transcripción de los genes.

pHP45ΩKm: plásmido de aproximadamente 4,6 kb derivado de pBR322. Fuente del interposón Ω -Km, que se puede escindir como un fragmento de restricción *EcoRI*, *HindIII* o *BamHI* (Fellay *et al.*, 1987). El interposón Ω -Km posee un gen de resistencia a kanamicina flanqueado por el terminador transcripcional del *gen 32* del fago T4 obtenido del plásmido pMJK4-18 (Krisch y Selzer, 1981) y por codones de terminación de la traducción en las tres fases de lectura obtenidos del plásmido pKTH604 (Pettersson *et al.*, 1983) (Fig. 2.3). La eficiencia de esta secuencia como sitio de terminación de la transcripción para la ARN polimerasa se ha demostrado mediante experimentos *in vivo* (Prentki y Krisch, 1984). El plásmido pHP45ΩKm confiere resistencia a ampicilina y a kanamicina.

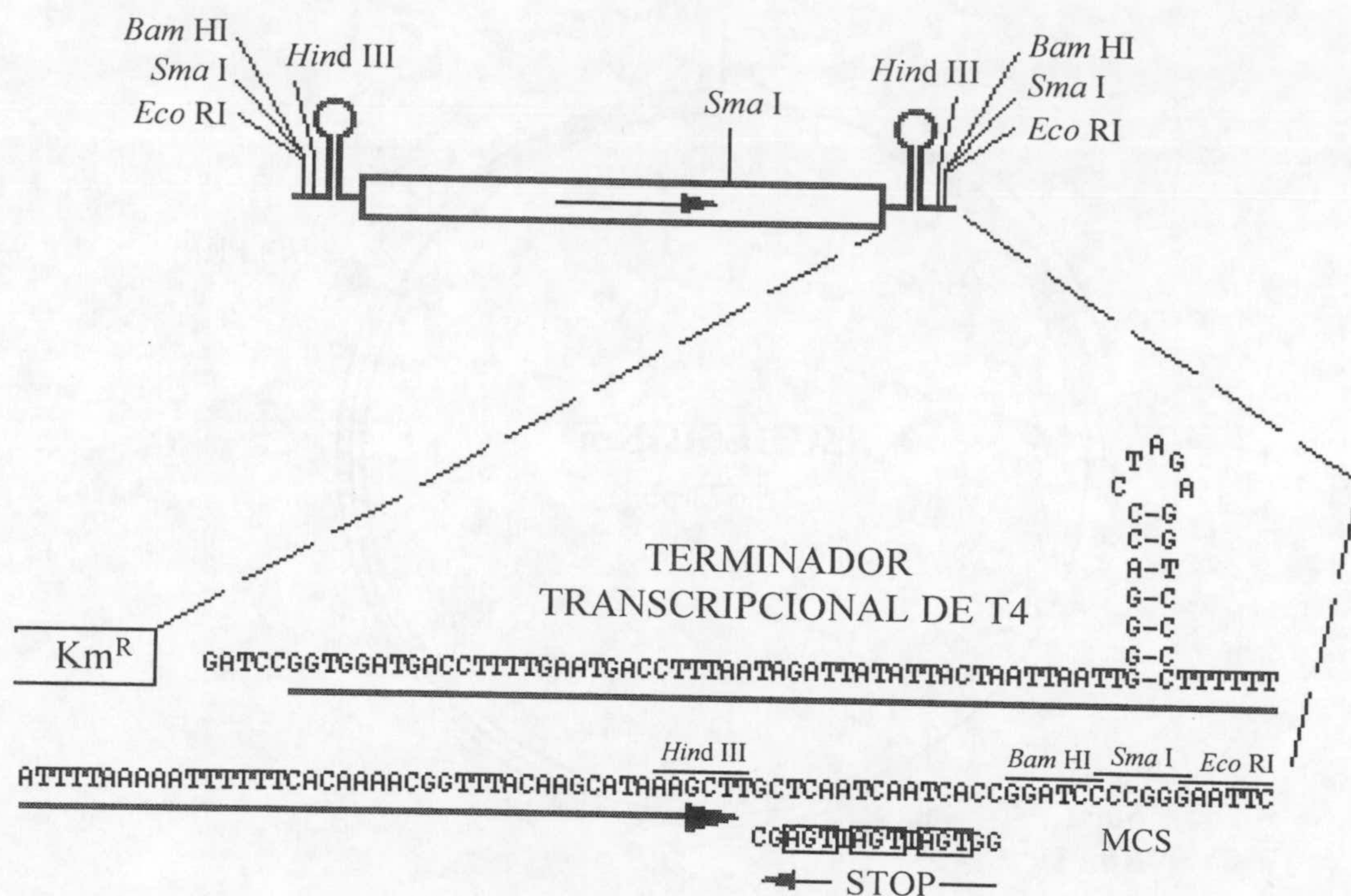


Figura 2.3. Interposón Ω -Km del plásmido pHP45 Ω Km. Sólo se indican los sitios de restricción relevantes. Las flechas negras indican el sentido de transcripción. Se muestra en detalle la secuencia del terminador transcripcional del fago T4, así como la de los codones de parada de la traducción en las tres fases de lectura. Los dos terminadores que flanquean al gen de resistencia a kanamicina son simétricos.

pJB3Km1: plásmido de 6.052 pb de amplio espectro de huésped, derivado de RK2 (Fig. 2.4). Posee el MCS y las regiones *lac* de pUC19 que permiten la α -complementación. Su número de copias en *E. coli* es de aproximadamente 5-7 por cromosoma. Además, posee el gen *trfA* que codifica una proteína esencial para la iniciación de la replicación a partir del *oriV* de RK2. Se sabe que ciertas mutaciones puntuales en este gen producen un aumento del número de copias del plásmido en la célula (hasta 24 veces). Este plásmido posee el origen de transferencia de RK2, lo cual permite su transferencia cuando se aportan las funciones de movilización en *trans*. pJB3Km1 confiere resistencia a ampicilina y a kanamicina.

pJB3Tc19: plásmido de 7.069 pb de amplio espectro de huésped, derivado de RK2. Es similar al plásmido pJB3Km1 pero en lugar del gen de resistencia a kanamicina porta un gen de resistencia a tetraciclina. Confiere resistencia a ampicilina y tetraciclina.

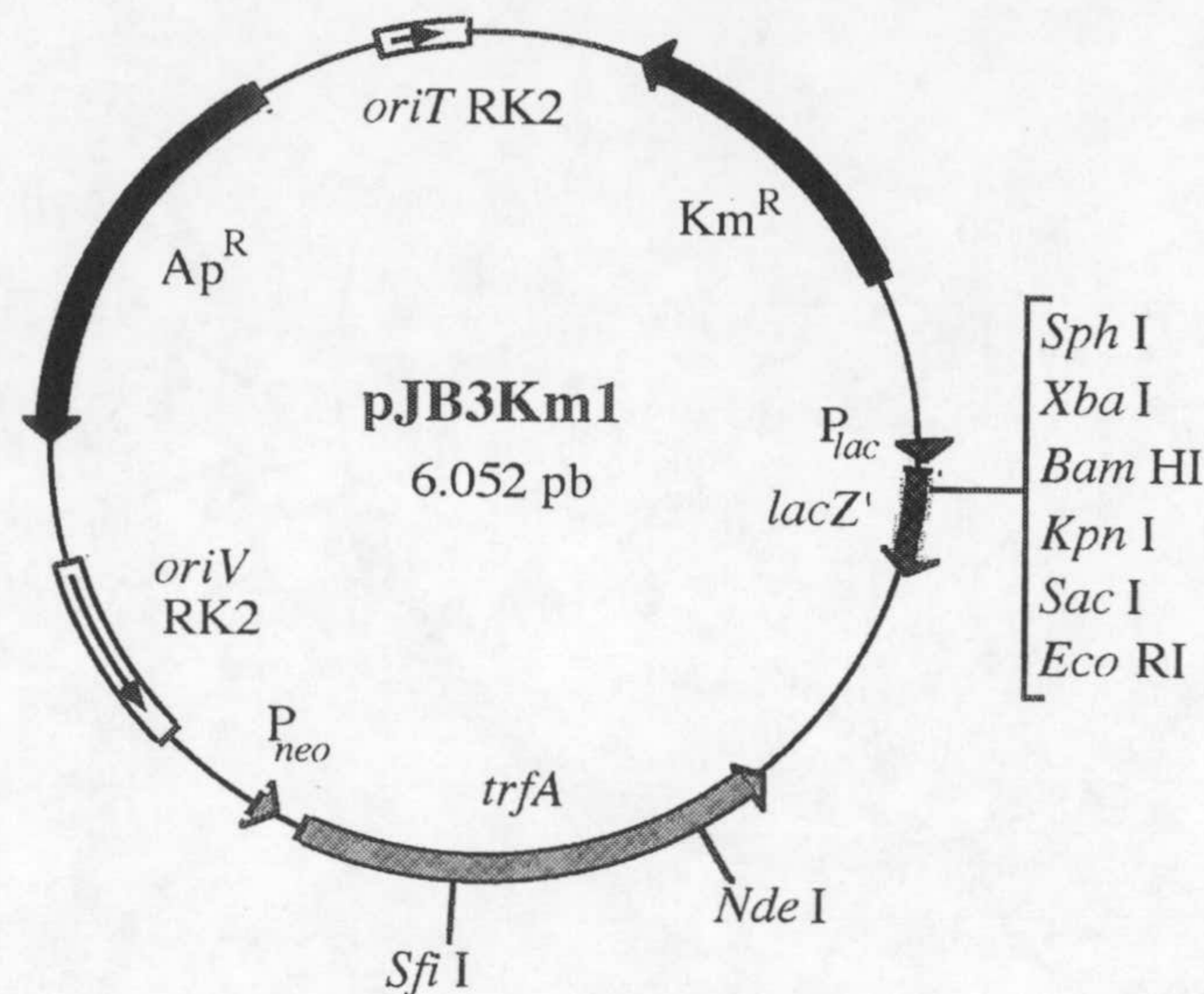


Figura 2.4. Plásmido pJB3Km1. Los sitios de restricción indicados son únicos y están localizados en el MCS dentro del gen *lacZ'*. También se muestra la localización del origen de replicación (*oriV*RK2), del origen de transferencia (*oriT*RK2), de los genes de resistencia a ampicilina y a kanamicina, y del gen *trfA* que se expresa desde el promotor constitutivo P_{neo} . Las flechas indican el sentido de la replicación, de la transferencia o de la transcripción de los genes.

pKNG101: plásmido suicida utilizado en experimentos de intercambio alélico que permite la selección positiva de eventos de doble recombinación en bacterias gram negativas. Posee el origen de replicación del plásmido R6K (Fig. 2.5), que es dependiente de la proteína π codificada por el gen *pir* y, por tanto, sólo se mantiene en bacterias que producen dicha proteína (por ejemplo, *E. coli* CC118 λ *pir*). Presenta el origen de transferencia de RK2, lo que permite transferirlo a otras bacterias si se aportan las funciones de movilización en *trans*. Posee los genes *strA* y *strB* de resistencia a estreptomicina, que sirven como marcador de selección de la integración del vector en el cromosoma de la bacteria huésped. Su característica más relevante es que porta el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* como marcador contraseleccionable, lo que permite seleccionar positivamente la escisión del vector del cromosoma. Este gen, codifica una levano-sacarasa que cataliza la hidrólisis de sacarosa así como la síntesis de levanos que, en bacterias gram negativas, se acumulan en el periplasma y producen la muerte celular cuando la concentración de sacarosa es mayor o igual al 5% (p/v).

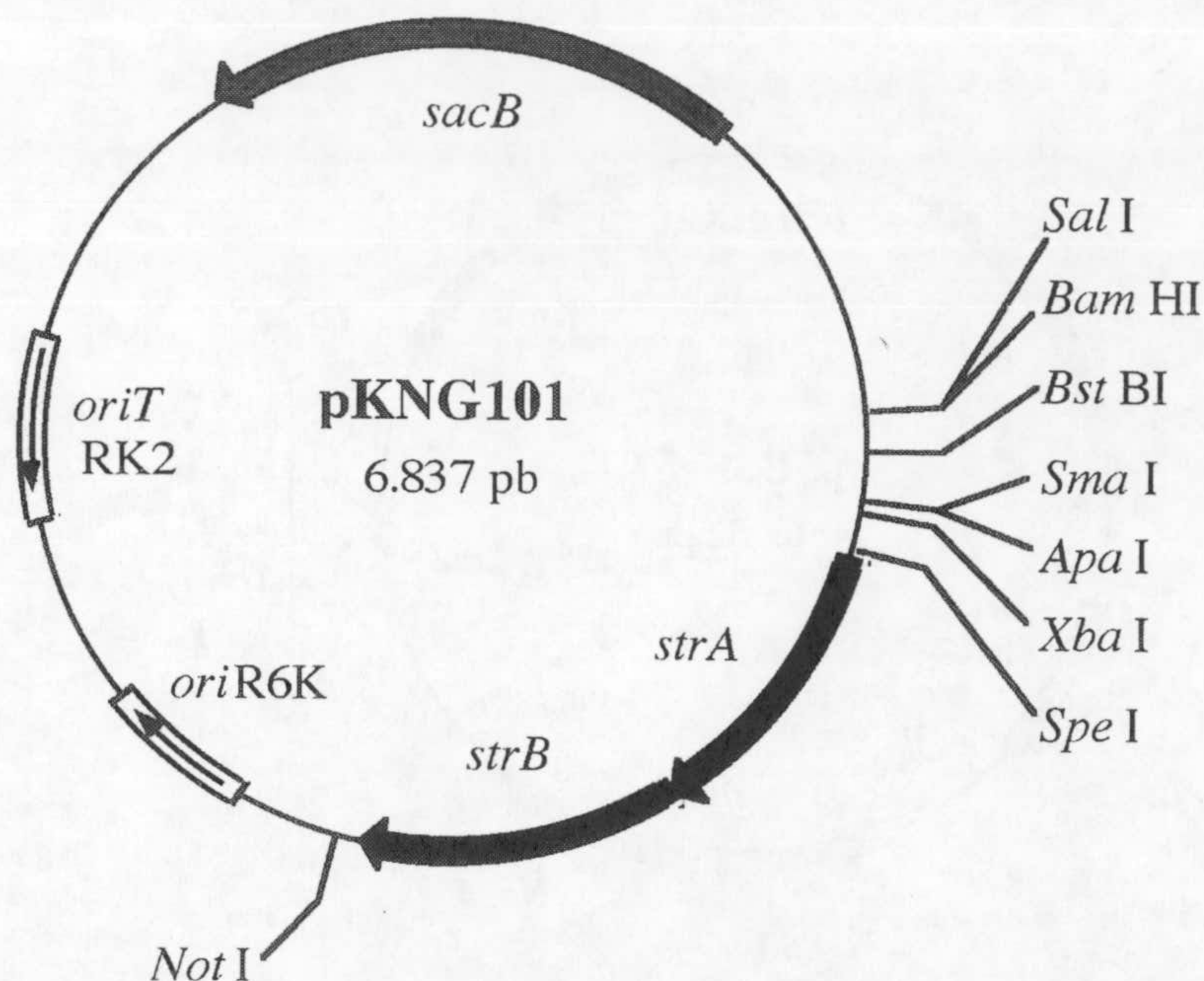


Figura 2.5. Plásmido pKNG101. Los sitios de restricción para las enzimas que se indican son únicos. Se muestra además la localización del origen de replicación (*oriR6K*), del origen de transferencia (*oriTRK2*), de los genes de resistencia a estreptomicina (*strA* y *strB*) y del gen que codifica la levano-sacarasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*. Las flechas indican el sentido de la replicación, de la transferencia o de la transcripción de los genes.

pMLB1034: plásmido de 6.189 pb derivado de pBR322. Contiene el gen '*lacZ*' sin promotor, sin sitio de unión al ribosoma y sin el codón de iniciación de la traducción (Fig. 2.6). Preparado para construir fusiones traduccionales mediante la unión del extremo 5' de un gen que contenga sus secuencias promotoras y su sitio de unión al ribosoma al gen '*lacZ*' en la fase de lectura adecuada. Esta fusión produce fenotipo *LacZ*⁺. Este plásmido confiere resistencia a ampicilina.

pMP220: plásmido de aproximadamente 10,5 kb derivado del vector pTJS75 (Schmidhauser y Helinski, 1985) perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP. Posee el MCS de pIC20H (Marsh *et al.* 1984) y contiene el gen *lacZ* de *E. coli* sin promotor y con el sitio de unión al ribosoma del gen *cat* (que codifica para la enzima cloramfenicol acetiltransferasa). La expresión del gen *lacZ* a partir de promotores clonados delante del gen, permite medir la expresión desde dichos promotores como actividad β -galactosidasa. Confiere resistencia a tetraciclina.

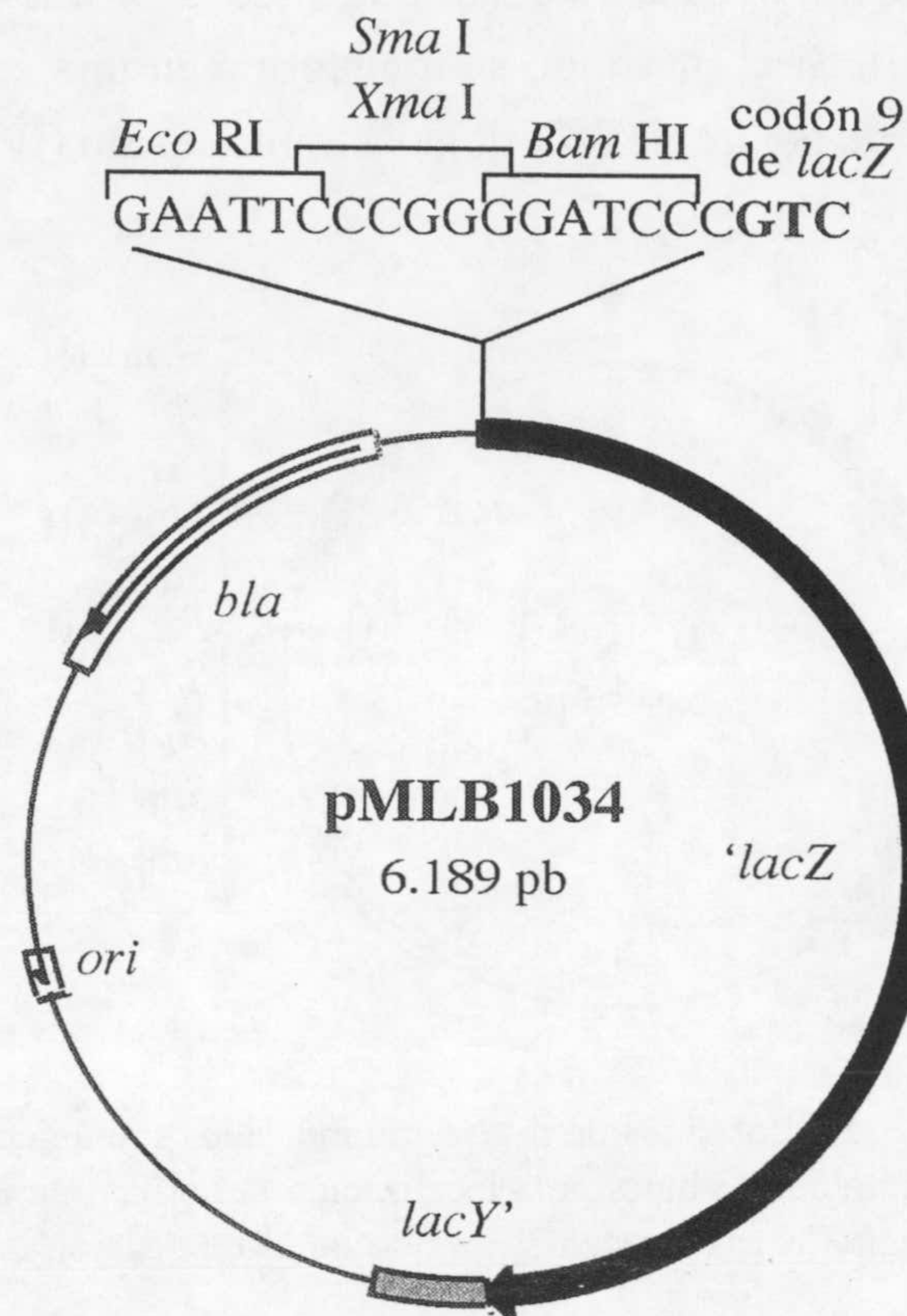


Figura 2.6. Plásmido pMLB1034. Los sitios de restricción que se indican son únicos. Se muestra la localización del origen de replicación (*ori*) y del gen de resistencia a ampicilina (*bla*). Las flechas indican el sentido de transcripción de los genes. En el MCS se indica la fase de lectura del gen '*lacZ*'.

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

pUC18: vector de clonación de 2.686 pb que combina fragmentos de pBR322 y de vectores de la serie M13mp (Fig. 2.7). Carece del gen *rop* implicado en el control del número de copias de plásmidos que contienen el origen de replicación de ColE1, y como consecuencia, presenta un alto número de copias (más de 700) por célula. Confiere resistencia a ampicilina, y posee un sitio de clonación múltiple (MCS) dentro de la región que codifica el péptido α de LacZ. Esto posibilita una fácil selección de los plásmidos recombinantes en cepas que permitan α -complementación, es decir, aquellas portadoras de la deleción *lacZ* Δ M15 (por ejemplo JM109, DH5 α , etc.). Aquellos clones que porten un plásmido con inserto, formarán colonias de color blanco (en contraposición al color azul de los clones sin inserto) en medio LB sólido suplido con

ampicilina y con 25 $\mu\text{g/ml}$ del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal). Si el plásmido se transforma en una cepa *lacI*⁺, es necesario añadir, además, 130 μM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

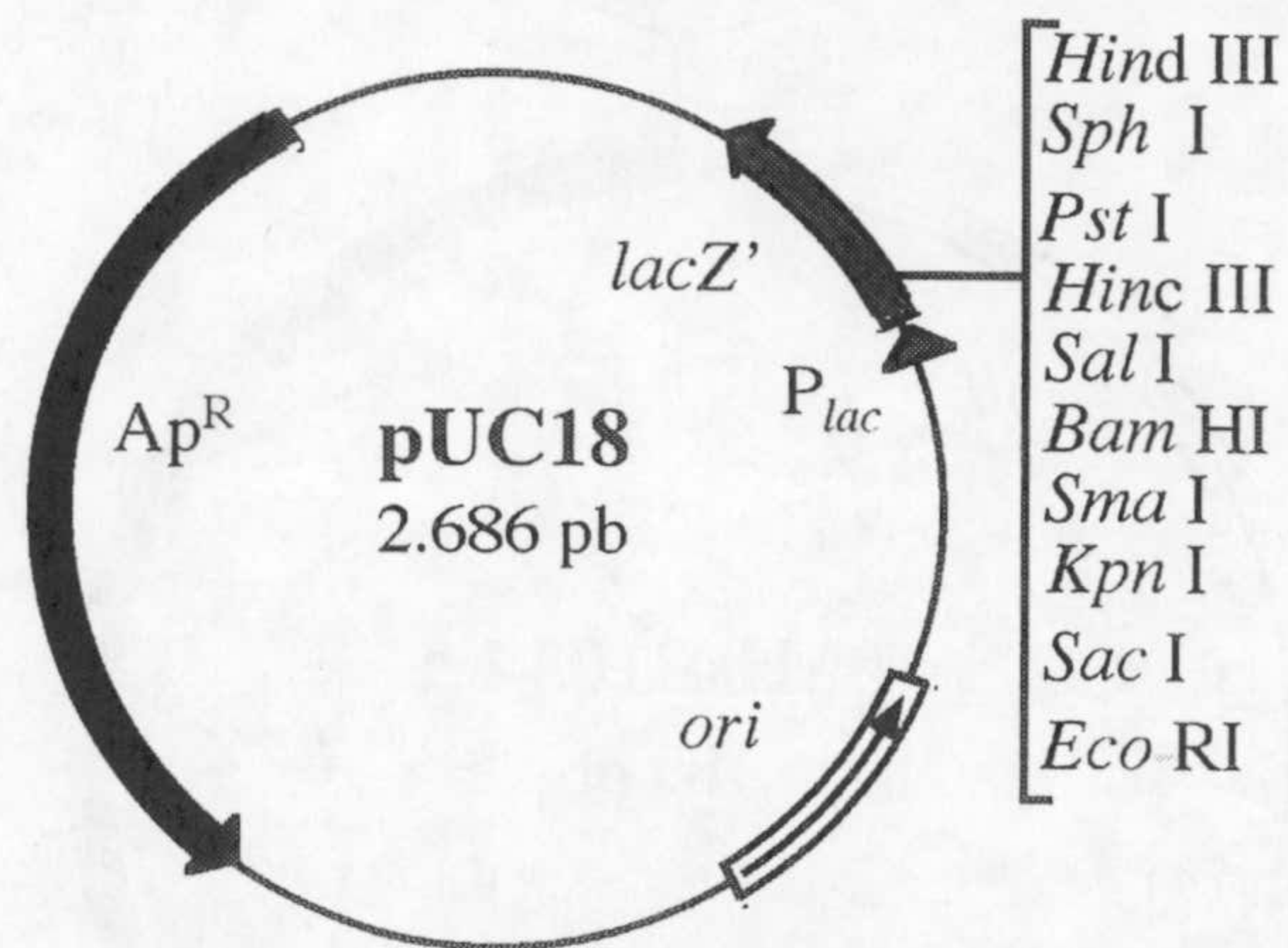


Figura 2.7. Plásmido pUC18. Los sitios de restricción indicados son únicos y están localizados en el MCS dentro del gen *lacZ'*. También se muestra la localización del origen de replicación (*ori*), y del gen de resistencia a ampicilina. Las flechas indican el sentido de la replicación o de la transcripción de los genes.

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

TABLA 2.3. Plásmidos de nueva construcción utilizados en este trabajo

Plásmido	Características	Referencia/Fuente
pCHESI-B	pCHESI Ω Km que porta en el sitio <i>EcoRI</i> un fragmento interno de <i>oprB</i> de <i>P. putida</i> KT2440 de 338 pb amplificado por PCR como un fragmento <i>EcoRI</i> - <i>EcoRI</i>	Este trabajo
pJBTOLi Ω Km	pJB3Tc19 portando fragmentos <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> de 5,7 kb de pTOL (<i>orf1 tolQ tolR tolA tolB oprL orf2</i>) y <i>EcoRI</i> de 2,2 kb de pHP45 Ω Km (interposón Ω -Km). El sentido de transcripción del interposón Ω -Km es divergente al de los genes <i>tol-oprL</i>	Este trabajo
pKA Ω Km	pKNG101 con el fragmento <i>NotI</i> de 2,6 kb de pNotA Ω Km clonado en el sitio <i>NotI</i>	Este trabajo
pKB Ω Km	pKNG101 que lleva clonado en <i>SmaI</i> un fragmento <i>KpnI</i> - <i>Asp700</i> de 2,5 kb de pTOL con un interposón Ω -Km insertado en el sitio <i>BglII</i> de <i>tolB</i>	Este trabajo
pKQ Ω Km	pKNG101 con el fragmento <i>NotI</i> de 2,7 kb de pNotQ Ω Km clonado en el sitio <i>NotI</i>	Este trabajo
pKR Ω Km	pKNG101 con el fragmento <i>NotI</i> de 2,7 kb de pNotR Ω Km clonado en el sitio <i>NotI</i>	Este trabajo
pKSmaIAxylE	pKNG101 que lleva clonado en el sitio <i>SmaI</i> un fragmento <i>XhoI</i> - <i>StuI</i> de 2,6 kb de pTOL con un casete <i>xylE</i> reemplazando a un fragmento <i>SfiI</i> de 45 pb interno a <i>tolA</i>	Este trabajo
pKSmaIBxylE	pKNG101 que lleva clonado en el sitio <i>SmaI</i> un fragmento <i>NcoI</i> de 2,6 kb de pTOL con un casete <i>xylE</i> reemplazando a un fragmento <i>BstEII</i> de 633 pb interno a <i>tolB</i>	Este trabajo
pKSmaIQxylE	pKNG101 que lleva clonado en el sitio <i>SmaI</i> un fragmento <i>SmaI</i> - <i>SfiI</i> de 2,1 kb de pTOL con un casete <i>xylE</i> reemplazando a un fragmento <i>BstXI</i> de 294 pb interno a <i>tolQ</i>	Este trabajo
pKSmaIRxylE	pKNG101 que lleva clonado en el sitio <i>SmaI</i> un fragmento <i>SmaI</i> de 3,8 kb de pTOL con un casete <i>xylE</i> reemplazando a un fragmento <i>NcoI</i> de 393 pb interno a <i>tolR</i>	Este trabajo
pMLA:: <i>lacZ</i>	pMLB1034 con un fragmento de ADN de <i>tolA</i> (nucleótidos 21 al 1887). Contiene una fusión traduccional <i>tolA</i> :: <i>lacZ</i>	Este trabajo
pMLA-R	pMLA:: <i>lacZ</i> digerido con <i>EcoNI</i> y religado tras ser rellenado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y los 4 dNTPs para cambiar la fase de lectura de <i>tolR</i>	Este trabajo
pMLA-Q	pMLA:: <i>lacZ</i> digerido con <i>XhoI</i> y religado tras ser rellenado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y los 4 dNTPs para cambiar la fase de lectura de <i>tolQ</i>	Este trabajo

(Continúa en la página siguiente)

2. Materiales y Métodos

(continuación)

Plásmido	Características	Referencia/Fuente
pMLB::lacZ	pMLB1034 con un fragmento de ADN de <i>tolB</i> (nucleótidos 21 al 2991). Contiene una fusión traduccional <i>tolB::lacZ</i>	Este trabajo
pMLB-A	pMLB::lacZ digerido con <i>NotI</i> y religado tras ser rellenado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y los 4 dNTPs para cambiar la fase de lectura de <i>tolA</i>	Este trabajo
pMLB-A Ω Km	pMLB::lacZ portando un interposón Ω -Km en el sitio <i>NotI</i> del gen <i>tolA</i>	Este trabajo
pMLO2::lacZ	pMLB1034 con un fragmento de ADN de <i>orf2</i> (nucleótidos 21 al 4866). Contiene una fusión traduccional <i>orf2::lacZ</i>	Este trabajo
pMLO2-P	pMLO2::lacZ digerido parcialmente con <i>NcoI</i> y religado tras ser tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y los 4 dNTPs para cambiar la fase de lectura de <i>oprL</i>	Este trabajo
pMLO2-P1 Ω Km	pMLO2::lacZ portando un interposón Ω -Km en el sitio <i>SphI</i> situado corriente arriba del gen <i>orf1</i>	Este trabajo
pMLP::lacZ	pMLB1034 con un fragmento de ADN de <i>oprL</i> (nucleótidos 21 al 4352). Contiene una fusión traduccional <i>oprL::lacZ</i>	Este trabajo
pMLP-P1 Ω Km	pMLP::lacZ portando un interposón Ω -Km en el sitio <i>SphI</i> situado corriente arriba del gen <i>orf1</i>	Este trabajo
pMLQ::lacZ	pMLB1034 con un fragmento de ADN de <i>tolQ</i> (nucleótidos 21 al 728). Contiene una fusión traduccional <i>tolQ::lacZ</i>	Este trabajo
pMLQ-1	pMLQ::lacZ digerido con <i>SgrAI</i> y religado tras ser rellenado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y los 4 dNTPs para cambiar la fase de lectura de <i>orf1</i>	Este trabajo
pMLR::lacZ	pMLB1034 con un fragmento de ADN de <i>tolR</i> (nucleótidos 21 al 1423). Contiene una fusión traduccional <i>tolR::lacZ</i>	Este trabajo
pMLR-Q	pMLR::lacZ digerido con <i>XhoI</i> y religado tras ser rellenado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y los 4 dNTPs para cambiar la fase de lectura de <i>tolQ</i>	Este trabajo
pMP1B	pMP220 con un fragmento de ADN situado corriente arriba de <i>orf1</i> (nucleótidos 25 al 248)	Este trabajo
pMPLB	pMP220 con un fragmento de ADN de la región <i>tolB-oprL</i> (nucleótidos 4085 al 4355)	Este trabajo
pNotA Ω Km	pUC18Not portando un fragmento <i>XhoI-StuI</i> de 2,6 kb de pTOL con un interposón Ω -Km insertado en el sitio <i>NotI</i> de <i>tolA</i>	Este trabajo

(Continúa en la página siguiente)

(continuación)

Plásmido	Características	Referencia/Fuente
pNotQ Ω Km	pUC18Not portando un fragmento <i>SmaI-KpnI</i> de 2,7 kb de pTOL con un interposón Ω -Km insertado en el sitio <i>XhoI</i> de <i>tolQ</i>	Este trabajo
pNotR Ω Km	pUC18Not portando un fragmento <i>SmaI-KpnI</i> de 2,7 kb de pTOL con un interposón Ω -Km insertado en el sitio <i>EcoNI</i> de <i>tolR</i>	Este trabajo
pTOL	pUC18 portando un fragmento <i>SmaI-SphI</i> de 5,7 kb de ADN cromosómico de <i>P. putida</i> KT2440 que contiene los genes <i>orf1 tolQ tolR tolA tolB oprL orf2</i>	Rodríguez-Herva (1999)
pTOLA Ω Km	pTOL portando un interposón Ω -Km insertado en el sitio <i>NotI</i> del gen <i>tolA</i>	Este trabajo

4. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

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

5. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL

Para la preparación de ADN total se utilizó una modificación del método descrito por Kado y Liu (1981). Brevemente, las células se cultivaron con agitación durante 10-14 horas en medio LB, tras lo cual se recogieron 0,5-1 ml del cultivo por centrifugación a 17.000 x g durante 1 min. Después de eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 400 μ l de una solución que contenía EDTA 25 mM, sacarosa 20% (p/v) y Tris-HCl 25 mM pH 8,0, y se incubaron a 4°C durante 5 min. A continuación, se añadieron 200 μ l de una solución con SDS 2% (p/v) y NaOH 0,3 N, y el tubo se mezcló por inversión hasta que la lisis fue total. Posteriormente, se añadieron 0,1 volúmenes de MgCl₂ 0,1 M y el tubo se volvió a mezclar. Tras centrifugar la mezcla a 17.000 x g durante 10 min, el ADN se extrajo con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La extracción se repitió tres veces. Finalmente, el ADN de la fase acuosa se precipitó añadiendo 2 volúmenes de etanol

absoluto frío y se concentró por centrifugación a 17.000 x g durante 15 min. El sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 17.000 x g durante 1 min. El precipitado de ADN se secó a 37°C y se resuspendió en 50 µl de H₂O_d.

6. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS

6.1. Por transformación mediante choque térmico

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

6.2 Por electroporación

La electroporación de plásmidos en células de *E. coli* y de *P. putida* se realizó mediante el método de Enderle y Farwell (1998). Para ello, se partió de un cultivo en medio LB sólido de células incubadas a 30 ó 37°C durante 10-14 horas y que no hubieran sido almacenadas a 4°C o a temperaturas inferiores. De este cultivo se recogieron 3 mg de células, evitando arrastrar el medio de cultivo, y se resuspendieron en 0,5 ml de H₂O_d estéril. Las células se lavaron 2 veces con 0,5 ml de H₂O_d estéril y se concentraron por centrifugación a 17.000 x g durante 1 min, tras lo que se resuspendieron en 40 µl de H₂O_d estéril. Las células se mantuvieron en hielo hasta el momento del pulso eléctrico. Entre 5 y 15 ng de ADN plasmídico sin sales, se mezclaron con las células preparadas según se ha descrito anteriormente. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm de distancia entre los electrodos (Bio-Rad, ref. 165-2086) y se sometió a un pulso eléctrico de 2,5 ó 3 kV en un electroporador (MicroPulser Electroporation Apparatus, Bio-Rad, 165-2100). Después del pulso eléctrico las células se recogieron inmediatamente añadiendo 1 ml de medio LB líquido y la mezcla se incubó durante 1 hora a 30 ó 37°C, tras lo cual se sembraron diluciones de la misma en medio sólido selectivo para obtener los transformantes.

6.3. Por conjugación

La movilización a *P. putida* de los plásmidos no autotransferibles con el origen de transferencia del plásmido RP4 (*oriTRP4*) o del plásmido RK2 (*oriTRK2*), se realizó mediante conjugación "tripartita" (de Lorenzo y Timmis, 1994) en la que participaron la cepa de *E. coli* donadora (portadora del plásmido a movilizar), la cepa de *P. putida* receptora y la cepa auxiliar *E. coli* HB101(pRK600). El plásmido pRK600, que determina las funciones de transferencia, no es capaz de replicarse en *Pseudomonas*. Los transconjugantes de *P. putida* se seleccionaron en medio mínimo con benzoato

suplido con los antibióticos adecuados para la selección del plásmido transferido. Simultáneamente, se sembraron diluciones seriadas de la mezcla de conjugación en el medio anterior pero sin antibiótico, para calcular el número de células receptoras de *P. putida* presentes en dicha mezcla. La frecuencia de transconjugantes se expresó como el número de transconjugantes en relación al número de receptores.

7. TÉCNICAS COMUNES DE MANIPULACIÓN DE ADN

7.1. Electroforesis de ADN

La electroforesis de ADN se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa preparados en tampón Tris/acetato/EDTA (TAE). Como patrones de peso molecular se usaron los fragmentos de ADN del fago lambda cortado con los enzimas *HindIII*, *BstEII*, o *HindIII* más *EcoRI*, y los marcadores comerciales VIII (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1336045) y X (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1498037).

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

Para la recuperación de fragmentos de ADN de la agarosa se utilizó el sistema comercial "QIAEX II Gel Extraction Kit" (QIAGEN, ref. 20021) o el sistema "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN, ref. 28704), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.3. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN plasmídico se realizó tanto de forma manual como automática. Para la secuenciación manual se siguieron las instrucciones del sistema comercial "T7 Sequencing Kit" (Amersham Pharmacia Biotech, ref. 27-1682-01) basado en el método de Sanger *et al.* (1977), usando la ADN polimerasa del fago T7. Como una variación a este sistema, en lugar de usar $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ para secuenciar, se utilizaron 5-10 pmoles de un cebador marcado en su extremo 5' con 10^5 cpm de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (el marcaje del oligonucleótido se describe en el apartado 16.1 de esta sección). La secuenciación automática se realizó en el servicio de secuenciación automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra del CSIC en Granada, utilizando un aparato de Applied Biosystems (modelo 373 STRECHT), así como en el servicio de secuenciación automática del Grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental de Zaidín del CSIC en Granada, utilizando un aparato ABI PRISMTM (modelo 310) de Perkin Elmer. 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 se sintetizaron en el servicio de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra del CSIC en Granada o en los laboratorios Roche Molecular Biochemicals.

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

Este método se empleó para la amplificación de fragmentos de ADN del cromosoma de *P. putida*, y en algunos análisis de colonias obtenidas tras la transformación de ligaciones, para encontrar de forma rápida el ADN recombinante de interés. La reacción de amplificación contenía: ADN molde (0,2 ng/μl para el ADN cromosómico o 10 pg/μl para el ADN plasmídico), cebadores (0,5 μM cada uno), tampón de reacción (KCl, 50 mM; MgCl₂, 1,5 mM; Tris-HCl, 10 mM pH 9,0), dNTPs (100 μM cada uno) y ADN polimerasa *Taq* (Amersham Pharmacia Biotech, ref. 27-0799-02) (0,025 U/μl). Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, se realizaron 33 ciclos en las siguientes condiciones: 94°C, 10 seg; 50°C, 10 seg; 72°C, 1 min, y finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 min. La temperatura de hibridación se varió en función de los cebadores utilizados. En el caso de utilizar cebadores que presentaban secuencias adyacentes con dianas de corte para enzimas de restricción y que no hibridaban con el ADN original, en lugar de 33 ciclos a una única temperatura de hibridación, se realizaron primero 3 ciclos en las condiciones descritas anteriormente a la temperatura de hibridación del oligonucleótido sin tener en cuenta esas secuencias adyacentes, y 30 ciclos a la temperatura de hibridación del oligonucleótido completo. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria se combinaron distintas modificaciones, 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.

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

El ADN previamente digerido y separado en gel de agarosa, se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1417240) siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989). La hibridación y la posterior detección se realizaron siguiendo las instrucciones indicadas por el sistema comercial "DIG DNA Labelling and Detection Kit" (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1093657). El marcaje con digoxigenina de la sonda se realizó por PCR usando DIG-11-dUTP (Roche Molecular

Biochemicals, ref. 1093088). La proporción dTTP:DIG-11-dUTP utilizada fue 9:1 (los dNTPs se usaron a 100 μ M cada uno como en la reacción normal de PCR). Las membranas se hibridaron y lavaron en condiciones estrictas.

7.6. Otras técnicas de manipulación de ADN

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

8. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES POR INTERCAMBIO ALÉLICO

Para la construcción de mutantes de *P. putida* por recombinación homóloga se utilizó el plásmido pKNG101 (ver apartado de plásmidos), en el cuál se clonó el gen a mutar interrumpido por un gen marcador (el gen indicador *xyIE* o el interposón Ω -Km) de manera que hubiese suficiente secuencia de ADN, preferiblemente 1 kb o más, a cada lado de dicho marcador. El plásmido se transfirió desde *E. coli* CC118 λ *pir* a *P. putida* por conjugación "tripartita". Se seleccionaron los transconjugantes resistentes a estreptomicina, surgidos como consecuencia de la integración del vector en el cromosoma del huésped por recombinación homóloga 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 (C230⁺ o resistencia a Km). De esta forma, se descartaron posibles mutantes espontáneos resistentes a estreptomicina. Los merodiploides que aparecieron fueron de dos tipos: aquellos en los que el hecho de recombinación se había producido antes del marcador, y aquellos en los que se había producido después del mismo. Las cepas merodiploides no deberían crecer en medio LB suplido con estreptomicina (100 μ g/ml) y sacarosa al 5% (p/v), pero en ocasiones, las condiciones del medio tuvieron que optimizarse (aumentando la concentración de sacarosa o bajando la de NaCl o la temperatura de crecimiento) para 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 líquido 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). Parte de este cultivo se utilizó para inocular medio LB

fresco, y se volvió a repetir todo el proceso. El crecimiento en ausencia de presión selectiva, permitió que pudiese ocurrir un segundo evento de recombinación que tuvo como consecuencia la pérdida de las secuencias del vector y de una de las copias del gen que se deseaba mutar (bien fuese la copia silvestre o la mutante). La posterior siembra en medio con sacarosa permitió seleccionar los clones en los que el cointegrado se había resuelto. La selección de los clones que portaban el gen marcador permitió distinguir inequívocamente los clones que poseían la copia mutada del gen, de aquellos que habían revertido al genotipo silvestre. Finalmente, la pérdida de las secuencias del vector y del gen silvestre se confirmó mediante PCR e hibridaciones de ADN.

9. ENSAYOS DE MOVILIDAD BACTERIANA

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

10. ENSAYOS DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD

10.1. Ensayos de resistencia/sensibilidad a antibióticos

Los estudios de resistencia/sensibilidad a antibióticos se realizaron determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) según el método descrito por Amsterdam (1991). Para ello se usaron placas de microtítulo de 96 pocillos con fondo en forma de U (Sarstedt, ref. 83.1837.500). Los antibióticos se prepararon concentrados 50 veces con respecto a la concentración inicial que se quería ensayar. Los antibióticos cefepine, gentamicina, imipenen y novobiocina se prepararon en H₂O_d estéril a 6,4 mg/ml los tres primeros y a 25,5 mg/ml el último; los antibióticos ácido fusídico, rifampicina, piperacilina y tetraciclina se prepararon en metanol a 132,4 mg/ml el primero, a 6,4 mg/ml el segundo y a 3,2 mg/ml los otros dos; el ácido nalidíxico se preparó en metanol a 51,2 mg/ml (se añadieron una gotas de una solución de NaOH concentrada hasta conseguir su disolución); el antibiótico estreptomycin se preparó en metanol 50% (v/v) a 12,8 mg/ml y el cloramfenicol en etanol 70% (v/v) a 25,6 mg/ml. Las soluciones de antibióticos concentrados se diluyeron 50 veces en medio LB líquido, y 200 µl de las mismas se depositaron en los pocillos de la primera columna de las placas

de cultivo. En el resto de los pocillos de la placa se añadieron 100 μ l de medio LB líquido. Con ayuda de una pipeta multicanal, se realizaron diluciones seriadas de los antibióticos, mezclando 100 μ l de la solución de antibiótico de la primera columna con los 100 μ l de LB líquido de la segunda columna, y así sucesivamente, cambiando las puntas de la pipeta en cada paso, hasta la última columna, desechando los 100 μ l finales. De esta manera en cada pocillo la concentración de antibiótico disminuye a la mitad con respecto al anterior. Tras preparar las placas de cultivo con los antibióticos, se añadieron en cada uno de los pocillos 10 μ l de un cultivo de células de *P. putida* en fase de crecimiento exponencial ($DO_{660} \sim 0,6-0,8$) diluido en LB líquido a 5×10^4 células/ μ l. Las placas se incubaron a 30°C durante 20 horas tras las cuales se determinó la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir en un 90% el crecimiento bacteriano. Para ello se analizó la turbidez en los pocillos de la placa de cultivo y se estimó la concentración de antibiótico en la que el crecimiento bacteriano era al menos un 90% inferior al del control sin antibiótico.

10.2. Ensayos de resistencia/sensibilidad a SDS, EDTA y deoxicolato

Para determinar la resistencia/sensibilidad a SDS, EDTA, y deoxicolato sódico (DOC), cultivos celulares en medio LB líquido incubados durante 10-14 horas a 30°C se diluyeron en medio LB fresco suplido con 0,5% (p/v) de SDS, 0,5 mM de EDTA o 2% (p/v) de DOC hasta alcanzar una DO_{660} de $\sim 0,1$. Tras 4 horas de incubación a 30°C en agitación, se sembraron diluciones seriadas de los cultivos en placas de medio LB sólido, y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Como control, se determinó el número de UFC/ml de cultivos incubados en medio LB líquido al que no se había añadido ninguno de los compuestos anteriores. El grado de resistencia/sensibilidad de cada cepa se expresó como porcentaje de supervivencia celular calculado como la relación existente entre el número de UFC/ml de los cultivos suplidos y el número de UFC/ml de los cultivos no suplidos.

11. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

11.1. Microscopía de células vivas

Para la observación de bacterias vivas, 15 μ l de un cultivo celular cultivado en medio LB se observaron con un microscopio Zeiss (Axioskop 20) dotado de objetivos y condensador de contraste de fases. Para la toma de fotografías se utilizó una película "Kodak" en blanco y negro de 100 ASA de sensibilidad.

11.2. Microscopía electrónica de transmisión

Células cultivadas en medio LB hasta la fase de crecimiento deseada se recogieron por centrifugación y se fijaron con una mezcla de formaldehído al 1% (v/v) y glutaraldehído al 2% (v/v) en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, se lavaron con este mismo tampón y se fijaron con tetróxido de osmio al 2% (v/v) y ferrocianuro potásico al 1,5% (v/v) durante 1 hora. Las muestras se lavaron nuevamente con el tampón anterior y se contrastaron en bloque con acetato de uranilo al 1% (v/v) durante 1 hora, se deshidrataron en un gradiente de etanol y se sometieron a un tratamiento con óxido de propileno. A continuación se infiltraron durante una hora en óxido de propileno más resina (proporción 1:1) y se dejaron en resina pura durante 12 horas. Después, se polimerizaron en una estufa a 60°C durante 12 horas y finalmente los bloques se cortaron en secciones ultrafinas de aproximadamente 500 Å, que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss modelo EM902, a un voltaje de aceleración de 80 kV. Tanto el procesamiento como la observación de las muestras se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

11.3. Microscopía electrónica de barrido

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

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

12.1. Preparación de lisado celular total

Entre 1 y 10 ml de un cultivo de células en la fase de crecimiento deseada se recogieron por centrifugación a 2.500 x g durante 10 min a 4°C. El sedimento celular se

resuspendió en tampón de muestra (Laemmli, 1970) a razón de 50 μ l por cada equivalente de DO₆₆₀-ml. El número de equivalentes de DO₆₆₀-ml se calculó multiplicando el volumen (en ml) de cultivo centrifugado por su DO₆₆₀ en el momento de la recogida. Para eliminar la viscosidad de la muestra debida a los ácidos nucleicos, se añadieron 2,5 U de la endonucleasa comercial "Benzonasa" (Merck, ref. 1.01653), por cada equivalente de DO₆₆₀-ml. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras se solubilizaron calentándolas durante 5 min a 95°C, y después se enfriaron en hielo. Las células sin romper y los restos celulares de mayor tamaño se eliminaron por centrifugación a 17.000 x g durante 3 min. Para el análisis electroforético de la muestra se utilizaron 15 μ l de este sobrenadante (0,3 equivalentes de DO₆₆₀-ml). Como patrones de peso molecular se utilizaron, indistintamente, los marcadores comerciales "SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range" (Bio-Rad Laboratories, ref. 161-0317), "Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range" (Bio-Rad Laboratories, ref. 161-0305) y "Color Markers, Wide Range" (Sigma, ref. C3437). Éstos, se diluyeron en tampón de muestra según las recomendaciones del fabricante, y se solubilizaron de manera idéntica a las demás muestras.

12.2. Aislamiento de proteínas de la membrana externa

Para el aislamiento de proteínas de la membrana externa se siguió el método descrito por Hancock y Carey (1979) basado en una centrifugación diferencial en gradiente de densidad de sacarosa. Brevemente, 500 ml de cultivos celulares en fase de crecimiento exponencial (DO₆₆₀ ~0,8) se centrifugaron a 2.500 x g durante 15 min a 6°C. Las células se resuspendieron en 12 ml de sacarosa 20% (p/v) y se incubaron con 50 μ l de la endonucleasa ADNasa I (10 mg/ml) durante 15 min a 25°C. Tras este tratamiento, las células se rompieron en la prensa de French a una presión de 15.000 psi, y se recogieron aproximadamente 10 ml del lisado celular en tubos de centrífuga que se enfriaron rápidamente en hielo para evitar la acción de las proteasas. El lisado se centrifugó a 1.250 x g durante 20 min a 6°C para eliminar las células enteras, y los 10 ml de la fracción sobrenadante se depositaron sobre un gradiente discontinuo de sacarosa. El gradiente de sacarosa 70-60-50-20% (p/v) se preparó en tubos de centrífuga "Ultra-Clear Centrifuge Tubes" (Beckman, ref. 344058). Las soluciones de sacarosa se vertieron lentamente y con cuidado por la pared del tubo para evitar que se mezclaran entre sí. El gradiente se preparó con 6 ml de sacarosa 70% (p/v), 10 ml de sacarosa 60% (p/v) y 10 ml de sacarosa 50% (p/v) sobre los que se depositó la solución de proteínas en sacarosa 20% (p/v). La separación se hizo mediante ultracentrifugación a 23.000 rpm durante 14 horas a 6°C en el rotor basculante SW28 de Beckman. La densidad de la membrana externa hace que se deposite en la interfase de las capas de sacarosa 60-70% (p/v). Tras la centrifugación, la fracción de proteínas de membrana

externa se recogió pinchando el fondo del tubo con una aguja hipodérmica previamente calentada. Se realizó un lavado de las proteínas con H_2O_d para eliminar los restos de sacarosa. Para ello, los tubos de centrifuga en los que se recogió la solución de proteínas, se completaron con H_2O_d y se centrifugaron a 40.000 rpm en el rotor de ángulo fijo 70-1 Ti durante 1 hora a 6°C. El precipitado se resuspendió en 500 μ l de H_2O_d y se volvió a concentrar por centrifugación a 17.000 x g durante 15 min a 4°C. Las proteínas se resuspendieron en 20-80 μ l H_2O_d y la solución resultante se almacenó a -20°C.

La concentración de proteína en las muestras se determinó siguiendo el método descrito por Sandermann y Strominger (1972).

El tampón de carga utilizado en la electroforesis de estas muestras se preparó 2 veces concentrado conteniendo Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (p/v), EDTA 40 mM, $MgCl_2$ 10 mM y azul de bromofenol 0,01% (p/v).

12.3. Separación de proteínas por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (EGPA-SDS)

Para la separación electroforética de proteínas se utilizó el equipo de electroforesis vertical "Mini-PROTEAN II" (Bio-Rad Laboratories, ref. 165-2940) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Las electroforesis se realizaron utilizando geles discontinuos de poliacrilamida de 0,75 ó 1,5 mm de espesor, de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Cada gel constaba de un segmento superior concentrador (con 4% [p/v] de poliacrilamida) y un segmento inferior separador (con una concentración de poliacrilamida entre el 10 y el 15% [p/v] dependiendo del tamaño de las proteínas a separar). Tanto los geles como el tampón de electroforesis llevaban 0,1% (p/v) de SDS.

12.4. Tinción de proteínas con Azul de Coomassie

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

Para almacenar los geles de forma definitiva, éstos se incubaron con agitación durante un par de horas en una solución que contenía glicerol 3% (v/v) y metanol 30% (v/v) tras lo cual, se prensaron entre dos hojas de papel celofán transparente, humedecidas previamente en H₂O_d, y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente.

12.5. Transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección

Para la transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente, se utilizó una membrana de nitrocelulosa "Immobilon-NC" (Millipore, ref. HAHY304F0) de 0,45 µm de diámetro de poro. Tras la electroforesis, el gel separador y la membrana se equilibraron brevemente en tampón de transferencia (Tris, 20 mM; glicina, 150 mM; etanol 20% [v/v]). La transferencia se realizó utilizando el equipo "Mini Trans-Blot" (Bio-Rad Laboratories, ref. 170-3930) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la transferencia, la membrana se sumergió en rojo Ponceau (Ponceau S, 0,2% [p/v]; ácido tricloroacético, 3% [p/v]), y se agitó suavemente durante 5 min a temperatura ambiente. Después, se lavó 3 ó 4 veces con H₂O_d hasta que las bandas de proteína se visualizaron claramente y finalmente, se secó entre dos hojas de papel "Whatman 3MM" (Whatman International Ltd., ref. 3030917). Así, a la vez que se comprobó la eficiencia de la transferencia, se marcó a lápiz la posición de las bandas correspondientes a los patrones de peso molecular. En este punto, la membrana se guardó para su uso posterior o se utilizó inmediatamente para la detección inmunológica. Para ello, la membrana se incubó en agitación durante 5 min en tampón PBS (NaCl, 137 mM; KCl, 2,7 mM; Na₂HPO₄, 10 mM pH 7,4) suplido con 5 ó 10% (p/v) de leche desnatada según se usase para el revelado un sustrato cromogénico o quimioluminiscente, respectivamente. Esta solución de PBS-leche, se utilizó en todas las incubaciones y lavados siguientes, salvo que se indique lo contrario. La membrana se incubó con el primer anticuerpo (diluído en PBS-leche) con agitación, durante 1 hora a temperatura ambiente o, alternativamente, durante toda la noche a 4°C. Después se realizaron 3 lavados con PBS-leche de 5 min cada uno y se añadió el segundo anticuerpo, conjugado a peroxidasa (diluído en PBS-leche). Tras incubarse en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se procedió al revelado (4 lavados de 10 min, cuando el revelado fue quimioluminiscente). En el caso del revelado con un sustrato cromogénico, la membrana se incubó, en oscuridad, en una solución recién preparada de PBS, con 0,6 mg/ml de 3,3'-diaminobencidina y 0,03% (v/v) de H₂O₂. Cuando las bandas de producto precipitado se visualizaron nítidamente, la reacción se paró lavando varias veces con H₂O_d. Para el revelado quimioluminiscente se utilizaron los sistemas comerciales "ECL Western blotting detection reagents" (Amersham Pharmacia Biotech, ref. RPN 2109) o

“SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate” (Pierce, ref. 34075) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas de reacción se visualizaron por exposición frente a una película "Hyperfilm-MP" (Amersham Pharmacia Biotech, ref. RPN 8). Tras el revelado quimioluminiscente la membrana se puede lavar con PBS durante 5 min y se puede realizar un revelado clásico.

Como anticuerpos primarios se utilizaron los anticuerpos descritos en la Tabla 2.4 diluïdos en PBS-leche a la dilución de uso indicada.

Como anticuerpos secundarios, se utilizaron anticuerpos de cabra (diluïdos 1:1.000) dirigidos contra inmunoglobulinas de ratón (Caltag Laboratories, ref. M30807) y anticuerpos de cabra (diluïdos 1:1.000) dirigidos contra inmunoglobulinas de conejo (Caltag Laboratories, ref. L42007). En ambos casos estaban conjugados a peroxidasa de rábano.

TABLA 2.4. Anticuerpos primarios utilizados en este trabajo

Anticuerpo	Características	Referencia/Fuente
<u>Monoclonales</u>		
MA1-6	Generado contra la proteína OprL de <i>P. aeruginosa</i> . Presenta reacción cruzada con la proteína OprL de <i>P. putida</i> . Dilución de uso 1:1000	Hancock <i>et al.</i> (1982)
MA7-1	Generado contra la proteína OprF de <i>P. aeruginosa</i> . Presentan reacción cruzada con la proteína OprF de <i>P. putida</i> . Dilución de uso 1:1000	Martin <i>et al.</i> (1993), Rawling <i>et al.</i> (1995)
<u>Policlonales</u>		
anti-β-lactamasa	Dirigido contra la enzima β-lactamasa de <i>E. coli</i> . Dilución de uso 1:1000	Cedido por D. Cavard, CNRS, Marsella, Francia
anti-RpoS	Generado contra la proteína RpoS (σ^{38}) de <i>E. coli</i> . Reconoce la proteína RpoS de <i>P. putida</i> . Dilución de uso 1:2000	Cedido por A. Filloux, CNRS, Marsella, Francia
anti-OprD	Generado contra la proteína OprD de <i>P. aeruginosa</i> . Reconoce la misma proteína de <i>P. putida</i> . Dilución de uso 1:2000	Cedido por R. Hancock, Univ. British Columbia, Vancouver, Canada
anti-OprB	Generado contra la proteína OprB de <i>P. aeruginosa</i> . Presenta reacción cruzada con la proteína OprB de <i>P. putida</i> . Dilución de uso 1:200	Wylie y Worobec (1994), Wylie <i>et al.</i> (1993)
anti-GBP	Generado contra la proteína periplásmica de unión a glucosa de <i>P. aeruginosa</i> . Reconoce a esta misma proteína de <i>P. putida</i> . Dilución de uso 1:100	Adewoye <i>et al.</i> (1998), Sly <i>et al.</i> (1993)

13. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PERIPLÁSMICAS EN EL MEDIO EXTRACELULAR

Para la realización de este protocolo es aconsejable utilizar tubos de material transparente durante las centrifugaciones. Cepas de *P. putida* (portando el plásmido pJB3Km1) se cultivaron en 25 ml de medio LB líquido con los antibióticos adecuados, hasta alcanzar una DO_{660} de 0,5. Entonces, 20 ml del cultivo celular se recogieron por centrifugación a $15.000 \times g$ durante 7 min a $25^{\circ}C$ (no se utilizó el freno de la centrífuga al parar). Parte del sobrenadante (15 ml) se recogió con una pipeta (con cuidado de no llevarse células) y se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriormente descritas. El sedimento celular de la primera centrifugación se resuspendió en tampón de muestra (Laemmli, 1970) como se indica en el apartado 12.1 de esta sección, y se utilizó como control positivo (lisado celular total). Parte del sobrenadante resultante de la segunda centrifugación (10 ml) se recogió con una pipeta (con mucho cuidado de no llevarse células) y se dejó 30 min en hielo, precipitando con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v). La muestra se concentró después por centrifugación a $15.000 \times g$ durante 30 min a $4^{\circ}C$. El sedimento se lavó con 400 μ l de acetona y se volvió a centrifugar como antes durante 5 min. Finalmente, el sedimento se resuspendió en tampón de muestra de Laemmli (con mucho cuidado de no dejar restos por las paredes del tubo) y se trató del mismo modo que se hizo con el sedimento de células. El tampón de muestra se añadió en la misma proporción que la indicada en el apartado 12.1 de esta sección (teniendo en cuenta que este sedimento provenía de 10 ml de cultivo original). Las muestras se analizaron en EGPA-SDS como se indica en el apartado 12.3 de esta sección, excepto que para el análisis de las muestras de sobrenadante celular se utilizaron 25 μ l (0,5 equivalentes de DO_{660} -ml) en lugar de los 15 μ l habituales. A continuación, se realizó un "Western blotting" (apartado 12.5) usando como anticuerpos primarios, los anticuerpos monoclonales MA1-6 y MA7-2 (Tabla 2.4), o los anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína β -lactamasa, contra la proteína RpoS, o contra la proteína peiplásmica de unión a glucosa (Tabla 2.4).

Alternativamente, las proteínas se visualizaron directamente en el gel mediante tinción de plata específica para proteínas (Wray *et al.*, 1981). Debido a la sensibilidad de la tinción de plata, es fundamental utilizar durante todo el proceso, H_2O_d de alta calidad (preferiblemente de 18 $M\Omega \times cm$ de resistividad), material de vidrio muy limpio, y manejar todo con guantes enjuagados previamente con H_2O_d . También es importante asegurarse de que el gel esté completamente sumergido en todo momento en las soluciones de incubación. Todas las incubaciones se realizaron con agitación suave y a temperatura ambiente. Tras la electroforesis, el gel de acrilamida se sumergió toda la noche en una solución de metanol 50% (v/v), y tras cambiar esa solución por solución

fresca e incubar durante 1 hora, el gel se lavó 3 veces con 200 ml de H₂O_d durante 10 min cada vez. El gel se sumergió entonces en la solución de tinción (preparada como se indica más abajo) durante 10 min, tras lo cual se lavó 3 veces con H₂O_d durante 10 min cada vez, y se transfirió a un recipiente de cristal limpio antes de añadir la solución reveladora. Se incubó en la solución de revelado (ácido cítrico 0,01% [v/v], formaldehído 0,038% [v/v]) durante 7 min, y el revelado se paró sumergiendo el gel durante 2-3 horas en una solución de metanol 50% (v/v) con ácido acético al 10% (v/v). El gel se almacenó como se indica en el apartado 12.4 de esta sección.

Para la preparación de la solución de tinción (ésta se preparó justo antes de usar y se protegió de la luz), se mezclaron 18,9 ml de NaOH 0,1 N con 1,4 ml de NH₄OH al 29,4% (v/v) y 75,7 ml de H₂O_d. A esta mezcla en agitación, se le añadió muy lentamente, para prevenir la formación de precipitados, AgNO₃ 20% (p/v) (aproximadamente 4 ml) hasta que la solución comenzó a saturarse.

14. ANÁLISIS DE LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)

14.1. Preparación de LPS y electroforesis

Para la preparación de LPS se siguió básicamente el método descrito por Hitchcock y Brown (1983). Un mililitro de un cultivo de células de *P. putida* en fase de crecimiento exponencial (DO₆₆₀ entre 0,5 y 0,6) se recogió por centrifugación a 17.000 x g durante 1 min. Tras lavar el sedimento celular 1 vez con PBS, se resuspendió en 80 µl de tampón de muestra de Laemmli modificado (SDS, 2% [p/v]; β-mercaptoetanol, 4% [v/v]; glicerol, 10% [v/v]; azul de bromofenol, 0,1 mg/ml; Tris-HCl, 1M pH 6,8). Las muestras se solubilizaron calentando durante 20 min a 95°C, y después se enfriaron en hielo. A cada muestra, se le añadió 20 µl de una solución de proteinasa K (2,5 mg/ml en tampón de muestra modificado), y se incubaron durante 2 horas a 60°C. Después, las muestras se calentaron 5 min a 95°C y se enfriaron en hielo. Los restos celulares de mayor tamaño se eliminaron centrifugando a 17.000 x g durante 3 min. Para el análisis electroforético se utilizaron 5 µl del sobrenadante. En la electroforesis, se utilizó un gel separador con 14% (p/v) de poliacrilamida. La electroforesis desnaturalizante se realizó como se indica en el apartado 12.3 de esta sección, excepto que el espesor de los geles utilizados fue de 0,75 mm.

14.2. Tinción de plata específica para LPS

La tinción de plata para LPS se realizó según el método descrito por Hitchcock y Brown (1983), aunque con algunas modificaciones. Como se indicó anteriormente debido a la sensibilidad de la tinción de plata, se utilizó durante todo el proceso, H₂O_d

de alta calidad, material de vidrio muy limpio, y se manejó todo con guantes enjuagados previamente con H_2O_d . Todas las incubaciones se realizaron en agitación suave.

Tras la electroforesis, el gel se incubó durante toda una noche en una solución de fijación que contenía isopropanol 25% (v/v) y ácido acético 7% (v/v). Después, se sumergió durante 5 min (más tiempo es perjudicial) en solución de oxidación recién preparada (1,05 g de ácido peryódico, 150 ml de H_2O_d y 4 ml de la solución de fijación anterior). A continuación, el gel se lavó exhaustivamente 3 veces en 200 ml de H_2O_d , durante 15 min cada vez, y después se sumergió durante 10 min en una solución de tinción (preparada como se indica más abajo). El gel se lavó nuevamente, al menos 4 veces en 200 ml de H_2O_d , durante 15 min cada vez, y se sumergió posteriormente durante 10-20 min en una solución reveladora recién preparada (50 mg/l de ácido cítrico y 0,0185% [v/v] de formaldehído). Esta solución se debe usar a 25°C, porque si se usa por debajo de esta temperatura podrían revelarse las proteínas resistentes al tratamiento con proteinasa K que pudiese haber en el gel. El revelado se paró sumergiendo el gel en una solución de ácido acético al 5% (v/v) durante 15 min. Finalmente, el gel se lavó varias veces con H_2O_d y se almacenó como se indica en el apartado 12.4 de esta sección.

Para la preparación de la solución de tinción (ésta se preparó justo antes de usar y se protegió de la luz), se mezclaron 28 ml de NaOH 0,1 N con 1 ml de NH_4OH al 29,4% (v/v) y 115 ml de H_2O_d . A esta mezcla en agitación, se le añadió muy lentamente $AgNO_3$ 20% (p/v) (aproximadamente 5 ml) hasta que la solución comenzó a saturarse. Entonces se le añadieron unas gotas de NH_4OH al 29,4% (v/v) hasta que la solución se aclaró por completo. Es fundamental que el NH_4OH concentrado esté en buen estado para obtener una tinción preferencial de los LPS.

15. TÉCNICAS COMUNES DE MANIPULACIÓN DE ARN

15.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó siguiendo el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987) y modificado por Marqués *et al.* (1994). Es importante usar guantes durante todo el proceso de extracción y cambiarlos frecuentemente, puntas sin autoclavar obtenidas de una bolsa recién abierta, material de vidrio tratado previamente con cloroformo y soluciones tratadas con dietilpirocarbonato (DEPC) o preparadas en H_2O_d tratada con DEPC (H_2O_{DEPC}) para evitar la degradación del ARN por ribonucleasas. El H_2O_{DEPC} se obtiene tras esterilizar por autoclave una solución de DEPC al 0,1% (v/v) en H_2O_d , que se ha incubado previamente al menos durante 60 min a temperatura ambiente y en agitación.

Para la preparación de ARN se recogieron 10-12 ml de cultivos celulares en fase de crecimiento exponencial en tubos de centrifuga enfriados previamente con nitrógeno líquido. Los sedimentos celulares obtenidos por centrifugación a 4°C se almacenaron a -80°C hasta la extracción del ARN. Para la extracción, se añadieron 1,4 ml de solución de lisis conteniendo 20 ml de Solución D, 4,2 ml de acetato sódico 2M y 20 ml de fenol saturado en H₂O_{DEPC} (la Solución D se preparó como una solución de tiocianato de guanidinio 4M, citrato sódico 25 mM y N-lauril sarcosina 0,5% [p/v] en 50 ml de H₂O_{DEPC} a la que se añadió, tras ser autoclavada, 0,36 ml de β-mercaptoetanol). Tras añadir la solución de lisis y resuspender bien en ella los precipitados celulares agitando vigorosamente, las muestras se incubaron durante 10 min a 60°C, agitando la mezcla periódicamente. Después se añadieron 0,28 ml de cloroformo y las muestras se agitaron de nuevo para homogeneizarlas. Se centrifugó entonces a 10.000 x g durante 10 min a 10°C y se recogió la fase acuosa, que se pasó a un tubo limpio al que se le añadieron 0,66 ml de isopropanol frío (-20°C). Las muestras se precipitaron a -20°C durante 30 min y se concentraron por centrifugación a 10.000 x g durante 15 min a 25°C. Los sedimentos se lavaron con etanol 70% (v/v), se centrifugaron durante 5 min en las condiciones anteriores y se secaron en una estufa a 50°C. Las muestras se resuspendieron en 75 µl de H₂O_{DEPC}.

El ADN presente en los ácidos nucleicos extraídos se eliminó mediante tratamiento con la enzima ADNasa I de páncreas bovino. A cada una de las muestras se le añadieron 25 µl de una solución preparada en H₂O_{DEPC} que contenía 20 U de inhibidor de ARNasas ("RNase-Inhibitor", Roche Molecular Biochemicals, ref. 799025), ditioneitol (DTT) 4 mM, MgCl₂ 40 mM y 10 U de ADNasa I libre de ARNasas (Roche Molecular Biochemicals, ref. 776785). La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. Para eliminar las proteínas presentes en las muestras, éstas se trataron con proteinasa K de *Tritirachium album* (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1373200). Para ello a los 100 µl de muestra se le añadieron 110 µl de una solución que contenía Tris-HCl 0,19 M pH 7, NaCl 0,09 M, SDS 0,36% (p/v), EDTA 18,2 mM pH 8 y 0,5 µg/µl de proteinasa K libre de ARNasas, y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Tras estos tratamientos, se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v), y una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). En cada una de las extracciones se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico o de cloroformo:alcohol isoamílico, y tras mezclar por agitación, se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min a 25°C, recogiendo la fase acuosa en un tubo limpio. El ARN presente en la fase acuosa de la última extracción se precipitó añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 2,5 volúmenes de etanol frío (-20°C) e incubando la mezcla 30 min a -20°C. Las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min a 25°C y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v),

se centrifugó durante 5 min en la mismas condiciones anteriores y se secó a 50°C. Las muestras de ARN se resuspendieron en 25 µl de H₂O_{DEPC} y se almacenaron a -20°C.

15.2. Determinación de la concentración de ARN

La concentración de una solución de ácidos nucleicos se determinó midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm frente a muestra de referencia de H₂O_d, disolvente utilizado normalmente para la disolución del ARN. La concentración de la muestra se calculó respecto al valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones que contienen 40 µg/ml de ARN (Ausubel *et al.* 1999). La relación A_{260}/A_{280} se utilizó para determinar el grado de pureza de la preparación. Esta relación es igual a 2 en el caso de muestras puras, de manera que valores de esta relación menores de 1,8 se consideraron indicadores de contaminación de la muestra por proteínas y/o fenol.

16. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE UN CEBADOR

16.1. Marcaje de cebadores

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se marcaron por fosforilación en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP (Amersham Pharmacia Biotech, ref. AA0068). Cada reacción contenía 5 pmoles de oligonucleótido, 1 µl del tampón de la enzima polinucleótido quinasa concentrado 10 veces (Tris 0,5 M pH 7,6; MgCl₂ 0,1M; DTT 50 mM; espermidina 1 mM; EDTA 1mM), 1 µl de [γ -³²P]ATP (>3.000 mCi/mmol) y 1 U del enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (Roche Molecular Biochemicals, ref. 838292) en un volumen final de 10 µl. Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 1 hora. La quinasa se eliminó tratando la mezcla con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 [v/v/v]), y el exceso de [γ -³²P]ATP se eliminó por filtración a través de una columna comercial con gel de poliacrilamida en Tris 10 mM pH 7,4 ("Micro Bio-Spin 6 Column Tris", Bio-Rad, ref. 732-6222) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El porcentaje de oligonucleótido marcado se calculó utilizando un detector de radiaciones "TRI-CARB 1500 Liquid Scintillation Analyzer" de Packard. Se determinó el número de desintegraciones por minuto (cpm) de una muestra de 0,5 µl del oligonucleótido a la que se añadió 4 ml de líquido de centelleo.

16.2. Reacción de extensión

Como cebadores complementarios a las cadenas de ARNm se utilizaron los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 2.5. Los cebadores hibridaban normalmente con secuencias próximas al extremo 5' de los genes en estudio, generalmente dentro de la región codificante.

TABLA 2.5. Oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de extensión

Nombre	Secuencia (5'→3')	Características
OR3	ACACCACGCCGCCCGCATCG	Hibrida con el gen <i>orf1</i> (nucleótidos 289 al 308 de la 31.1). Purificado por HPLC
PAL2	ACTTCAGCATTTCCATCGTG	Hibrida con <i>oprL</i> (nucleótidos 4.311 al 4.330 de la 31.1). Purificado por HPLC
TA4	AGGGCGAACACCAGCACATG	Hibrida con <i>tolA</i> (nucleótidos 1.910 al 1.929 de la 31.1). Purificado por HPLC
TB5	CGCTGGTAACCAGGATGTTC	Hibrida con <i>tolB</i> (nucleótidos 3.030 al 3.049 de la 31.1). Purificado por HPLC
TQ1	TACCACCACGCTGGCATTGC	Hibrida con <i>tolQ</i> (nucleótidos 728 al 747 de la 31.1). Purificado por HPLC
TR1	GCATCACGTCGATGTAGGGC	Hibrida con <i>tolR</i> (nucleótidos 1.442 al 1.461 de la 31.1). Purificado por HPLC

Para la hibridación de los oligonucleótidos con las cadenas de ARN, se mezclaron 2 µl de tampón de hibridación (NaCl 2M, Piperacina-N,N'-bis(2-etanosulfonato) [PIPES] 50 mM pH 6,4), 10⁵ cpm del oligonucleótido marcado y 25 µg de ARN total en un volumen final de 10 µl en H₂O_{DEPC}. La mezcla se incubó a 85°C durante 5 min, se pasó a un baño a 65°C donde se incubó durante 10 min y se dejó enfriar lentamente hasta 44°C. La reacción de extensión se realizó añadiendo 40 µl de una solución que contenía el tampón de la transcriptasa reversa (Tris-HCl 62,5 mM pH 8,2; MgCl₂ 10 mM; KCl 37,5 mM; DTT 1,25 mM), los 4 desoxinucleótidos a 1 mM cada uno, 20 U de inhibidor de ARNasas, 3 µg de actinomicina D y 7 U de la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de ave (Roche Molecular Biochemicals, ref. 109118). La mezcla se incubó a 44°C durante 1 hora. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 µl de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 150 µl de etanol frío (-20°C), y la muestra se dejó precipitando durante 10-14 horas a -20°C. Después se concentró por centrifugación a 17.000 x g durante 15 min a 25°C, se lavó con etanol 70% (v/v) frío (-20°C) y se secó a 90°C durante 3 min. El ADNc se resuspendió en 4 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM) y 2 µl de tampón de carga con formamida (0,3 % [p/v] azul de bromofenol; 0,3% [p/v] xilencianol; 10 mM EDTA pH 7,5; 97,5% [v/v] formamida desionizada), se incubó 5 min a 90°C y se enfrió en hielo antes de su separación por electroforesis.

16.3. Separación de cadenas de ADNc mediante electroforesis

La separación de las cadenas de ADNc se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (de 40 x 20 cm de tamaño) al 6,5% (p/v) en TBE (Tris-base 54 g/l; ácido bórico 27,5 g/l; EDTA 10 mM, pH 8) a potencia fija de

40 W y voltaje variable entre 1.500 y 2.000 V. La solución de acrilamida se preparó disolviendo urea (a 0,42 g/ml) en 6,5% (p/v) acrilamida:N,N'-metilenbisacrilamida en proporción 19:1 (p/p) en TBE, y una vez preparada se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa mediante vacío. Para catalizar la polimerización de la acrilamida, a 60 ml de la solución anterior se le añadieron 250 µl de persulfato amónico 10% (p/v) recién preparado y 75 µl de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED).

El montaje de las placas de cristal de la unidad de electroforesis, una de las cuales se trató con dimetildiclorosilano para evitar la adhesión del gel, se realizó conforme a las instrucciones del fabricante.

Una vez finalizada la separación, el gel se transfirió a un papel de filtro Whatman 3 MM, se cubrió con papel de plástico transparente y se secó al vacío en un secador Bio-Rad a 80°C durante 30 min. Las bandas de ADNc del gel se visualizaron por autorradiografía utilizando una película Kodak (Ref. 1651512) tras al menos 48 horas de exposición a -80°C. La película se reveló utilizando métodos estándar. Alternativamente, la radioactividad acumulada en el gel se cuantificó en un Molecular Imager modelo GS-525 (Bio-Rad).

16.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una transcripción reversa (RT-PCR)

Células de *P. putida* KT2440 se cultivaron en medio LB líquido hasta fase de crecimiento exponencial (DO_{660} entre 0,5 y 0,6) y se aisló el ARN total tal y como se describe en el apartado 15.1 de esta sección. La transcripción reversa y la posterior reacción de amplificación del ADNc, se realizó utilizando el sistema comercial "Titan One Tube RT-PCR System" (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1855476) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, se realizaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 94°C, 30 seg; 45-65°C, 30 seg; 68°C, 1 min, y finalmente se realizó una extensión a 68°C durante 10 min. La temperatura de hibridación se varió en función de los cebadores utilizados. En todos los ensayos se realizaron controles negativos para excluir la posibilidad de obtener falsos positivos en la reacción de extensión debido a la presencia de ADN en las muestras de ARN. Como controles negativos se realizó por un lado la reacción de transcripción reversa y amplificación sin la muestra de ARN, y por otro la reacción de amplificación tras un tratamiento a 94°C durante 15 min para inactivar la enzima transcriptasa reversa. También se realizó una PCR normal a partir de las muestras de ARN. En estas reacciones nunca se obtuvo ningún producto de amplificación.

17. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

La medida de actividad β -galactosidasa se realizó en células permeabilizadas según el método descrito por Miller (1972). Este método se basa en una reacción colorimétrica en la que el *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la enzima β -galactosidasa, es hidrolizado por dicha enzima produciendo galactosa y *o*-nitrofenol. Este último compuesto es de color amarillo y su concentración se puede determinar por espectrofotometría.

Cultivos celulares incubados a 30°C durante 10-14 horas se diluyeron 100 veces en 10 ml de medio LB líquido o de medio mínimo M9 y se incubaron a 30°C en agitación. Tras un periodo de incubación variable, se recogieron fracciones alícuotas de 100 μ l de los cultivos y se añadió el mismo volumen de una solución que contenía 2 mg/ml del detergente bromuro de alquil-trimetil-amonio (MATAB) en Tris-HCl 0,2 M pH 8, con objeto de permeabilizar las células. Ocasionalmente, se recogieron fracciones de 1,5 ml de los cultivos las cuales se centrifugaron a 17.000 x g durante 1 min. Los sobrenadantes se decantaron y los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 μ l de LB líquido y se les añadió el mismo volumen de la solución de MATAB. Tras incubar esta mezcla en hielo durante 20 min, se le añadieron 0,8 ml de tampón Z pH 7 (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄ y 50 mM β -mercaptoetanol) y 0,2 ml de una solución de ONPG (4 mg/ml de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido en tampón fosfato 0,1 M pH 7). La solución de ONPG es estable a 4°C y en oscuridad durante 2 semanas. La mezcla de reacción se incubó a 30°C hasta la aparición de color (entre 2 min y 1 hora) y se detuvo añadiendo 2 ml de una solución de Na₂CO₃ 0,5 M. La concentración de *o*-nitrofenol se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 420 nm. Para cada muestra se realizó además una medida a 550 nm para la corrección debida a la turbidez celular y se determinó también la densidad celular de los cultivos midiendo su turbidez a 660 nm. Ocasionalmente, las muestras se centrifugaron a 2.500 x g durante 10 min antes de determinar su absorbancia para eliminar la turbidez celular. En este caso, no se tuvo en cuenta la medida de absorbancia a 550 nm en la ecuación utilizada para calcular la actividad β -galactosidasa. Rutinariamente, los ensayos de β -galactosidasa se realizaron por triplicado.

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

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa} = \{ [A_{420} - (1,7 \times A_{550})] / (t \times V \times DO_{660}) \} \times 1000$$

donde t representa el tiempo de reacción en min y V el volumen (en ml) de células utilizado en la permeabilización.

18. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo siguiendo el método de Hofstra *et al.*, (1979). Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes *tol-oprL* no polares se cultivaron en medio LB líquido o medio mínimo M9 a 30°C durante 10-14 h (es importante no exceder este tiempo). Alícuotas de 100-300 µl de los cultivos, se centrifugaron a 17.000 x g durante 1 min y se lavaron con 1 ml de tampón PBS. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 50-100 µl de una solución 1% (p/v) de albúmina de suero bovino (BSA) en tampón PBS a la que se añadió el anticuerpo primario a la dilución adecuada (ver Tabla 2.4). Las muestras se incubaron con agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. Después se realizaron 3 lavados con PBS añadiendo 1 ml de PBS a cada una de las muestras y centrifugándolas a 17.000 x g durante 1 min. Los sedimentos celulares obtenidos de la última centrifugación se resuspendieron en 50-100 µl de una solución de BSA 1% (p/v) en tampón PBS a la que se añadió el anticuerpo secundario conjugado a una molécula de isotiocianato de fluoresceína (FITC) que emite fluorescencia al ser irradiada con luz azul (longitud de onda de 395 nm). Tras incubar las muestras con el segundo anticuerpo en agitación suave y oscuridad durante 1h a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados en PBS en las condiciones descritas anteriormente. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µl de BSA 1% (p/v) en tampón PBS y se mantuvieron a 4°C y en oscuridad. Aproximadamente 20 µl de cada muestra se extendieron sobre un portaobjetos recubierto de poli-L-lisina (Sigma, ref. P0425) y se dejaron secar en oscuridad, tras lo cual se añadieron 2-5 µl de una solución de glicerol:PBS en proporción 1:1 y se cubrieron con un cubreobjetos. Como control negativo del experimento, se utilizaron células de cada una de las cepas que no habían sido incubadas con el primer anticuerpo aunque sí con el segundo. La visualización de las muestras se realizó en un microscopio de epifluorescencia Zeiss (Axioskop 20) y para la toma de fotografías se utilizó una película "Kodak" en color, de 400 ASA de sensibilidad.

19. EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE CON COMPUESTOS MARCADOS CON ¹⁴C

19.1. Método de preparación de esferoplastos

Células de *P. putida* KT2440, de los mutantes *tol-oprL* no polares y del mutante *P. putida oprB*, se cultivaron en medio mínimo M9 suplido con glucosa 25 mM, hasta DO₆₆₀ ~0,7-0,9. En este momento se recogieron 50-100 ml de cada cultivo por centrifugación a 10.000 x g durante 5 min a 4°C. Los sedimentos celulares obtenidos se resuspendieron en frío en 6,3 ml de una solución de sacarosa 0,75 M, Tris-HCl 10 mM

pH 7,8 almacenada a 4°C. Las células se incubaron entonces con una concentración final de 0,1 mg/ml de lisozima durante 5-10 min en frío (agua-hielo). Tras este tratamiento, se añadieron, resbalando lentamente por la pared del tubo, 13,2 ml de EDTA 1,5 mM pH 7,5. Las células se incubaron 15 min a 30°C y se visualizaron al microscopio óptico de contraste de fases para comprobar la eficiencia del proceso.

19.2. Experimento de transporte de ^{14}C -glucosa y ^{14}C -glicerol

Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes *P. putida* QX, BX y *oprB* cultivadas en medio mínimo M9 suplido con 25 mM de glucosa hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial ($\text{DO}_{660} \sim 0,7-0,8$), o convertidas en esferoplastos tal y como se indicó en el apartado anterior, se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min a 4°C y se resuspendieron en medio mínimo M9 para *Pseudomonas* (ver apartado 2.1 de esta sección) sin fuente de carbono a una DO_{660} de 0,25 ó 0,3 por ml. Entre 5 y 10 ml de estas suspensiones celulares se incubaron en un baño a 30°C con agitación durante 5-10 min. Entonces, se añadió una solución de glucosa o glicerol preparada a 25 mM (concentrada 100 veces) conteniendo 24,9 mM de glucosa “fría” y 0,1 mM de D-[U- ^{14}C]glucosa (Amersham Pharmacia Biotech, ref. CFB.96) ó 24,9 mM de glicerol “frío” y 0,1 mM de [U- ^{14}C]glicerol (Amersham Pharmacia Biotech, ref. CFB174), respectivamente. Inmediatamente tras añadir el compuesto, se recogió 1 ml del cultivo y se filtró a través de un filtro de 0,45 μm de diámetro de poro (Millipore, ref. HA-WP02500) con ayuda de un aparato de filtración por vacío (“1225 Sampling Manifold”, Millipore, ref. XX27-025-50), tras lo cual el filtro se lavó 2 veces con 3 ml de una solución de LiCl 0,1 M mantenida a 4°C. Esta primera muestra equivaldría a tiempo cero. Los cultivos se incubaron entonces a 30°C con agitación, y se recogieron muestras de 1 ml de volumen a los 10, 20, 30 y 40 min de incubación con el compuesto radiactivo, que se filtraron y lavaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Como control negativo del experimento y para determinar la radiactividad inespecífica que quedaba retenida en los filtros, se recogieron muestras de 1 ml de células incubadas a 4°C (en agua-hielo) sin agitación con la misma cantidad de los compuestos radiactivos. Los filtros se incubaron con 4 ml de líquido de centelleo durante 3-5 h antes de medir su radiactividad. Con el fin de determinar los μmoles de compuesto acumulados por las células, se calculó también la radiactividad de las soluciones de glucosa y glicerol a 25 mM utilizadas en el experimento. Para ello se contabilizó el número de desintegraciones por minuto (cpm) de una muestra de 10 μl de las soluciones mencionadas a la que se añadieron 4 ml de líquido de centelleo. Los valores así obtenidos se utilizaron como referencia para el cálculo de la cantidad total de compuesto retenido por las células en los filtros. Los resultados del experimento de transporte se expresaron como μmoles de compuesto acumulado por $\text{DO}_{660}/\text{ml}$.

20. MEDIDA DE LA FUERZA PROTÓN-MOTRIZ (pmf)

Para medir la fuerza protón-motriz en los mutantes *tol-oprL* se siguió el método descrito por Possot *et al.* (1997), con algunas modificaciones. El método se basa en la utilización de una sonda catiónica fluorescente capaz de acumularse en bicapas lipídicas hiperpolarizadas. La acumulación de la sonda en la membrana interna bacteriana provoca un descenso en la emisión de fluorescencia, y su liberación tras la inhibición del potencial de membrana produce un aumento de la misma. La pmf se puede medir así como la diferencia existente entre la fluorescencia emitida por la sonda cuando está totalmente acumulada en el interior de la membrana interna y la emitida por la misma tras añadir un desacoplante del potencial de membrana que conduce a la liberación de la sonda del interior de la membrana interna. La sonda utilizada en este ensayo fue el 3,3'-dietiltiadicarbocianina de yodo [DiSC₂(5)] ("Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals", Molecular Probes, ref. D-304) que al ser excitada por luz de 650 nm de longitud de onda emite luz de 670 nm de longitud de onda. Como desacoplante del potencial de membrana se utilizó valinomicina. La membrana externa de las bacterias gram negativas es impermeable al DiSC₂(5) por lo que fue necesario permeabilizarla previamente al ensayo. Para ello, células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes *tol-oprL* no polares se cultivaron en medio LB líquido o en medio mínimo M9 suplido con glucosa 0,4% (p/v) hasta fase de crecimiento exponencial (DO₆₆₀ entre 0,5 y 0,7), se recogieron por centrifugación y se permeabilizaron tal y como se describe en el apartado 19.1 de esta sección, usando en este caso 0,2 mg/ml de lisozima, y 3,5 mM de EDTA. Una cantidad de células equivalente a la contenida en 1 ml de un cultivo a DO₆₆₀ = 1 de cada una de las cepas permeabilizadas se resuspendió en 500 µl de una solución que contenía HEPES, 125 mM, NaCl 0,9% (p/v), KCl 1 mM, MgCl₂ 1 mM y glucosa 0,4% (p/v), y se mantuvieron en hielo hasta que se realizó el ensayo. Estos ensayos se realizaron utilizando un espectrofluorímetro (SLM AMINCO SPF-500C). Para ello, 10-30 µl de las muestras se mezclaron en una cubeta de cuarzo con 1,3 ml de la solución anterior burbujeada previamente con aire y se añadió 1 µl de DiSC₂(5) para alcanzar una concentración final de 0,08 µM. Se midió entonces el descenso en la emisión de fluorescencia debido a la acumulación de la sonda en la membrana interna de la bacteria. Cuando este descenso se estabilizó, se añadieron 10 µl de una solución 0,2 mM de valinomicina y se registró el aumento en la emisión de fluorescencia.

21. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS

Para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos (determinación de las fases de lectura abierta, de los sitios de restricción, uso de codones, perfiles de hidropatía, composición de aminoácidos, etc.) se emplearon los

programas informáticos DNA Strider v. 1.3 (Marck, 1988) y SeqEd v. 1.0.3 (Applied Biosystems, Inc., 1992).

Para el diseño y análisis de oligonucleótidos (para secuenciación y PCR) se utilizaron los programas informáticos OLIGO v. 4.05 (W. Rychlik, National Biosciences, Inc., 1992) y Amplify v. 2.52 β (B. Engels, University of Wisconsin, 1996). Para la estimación de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos se usó el programa "Tm determination" (Breslauer *et al.*, 1986) disponible en Internet (Tabla 2.6) que además de la composición de bases, también tiene en cuenta su secuencia.

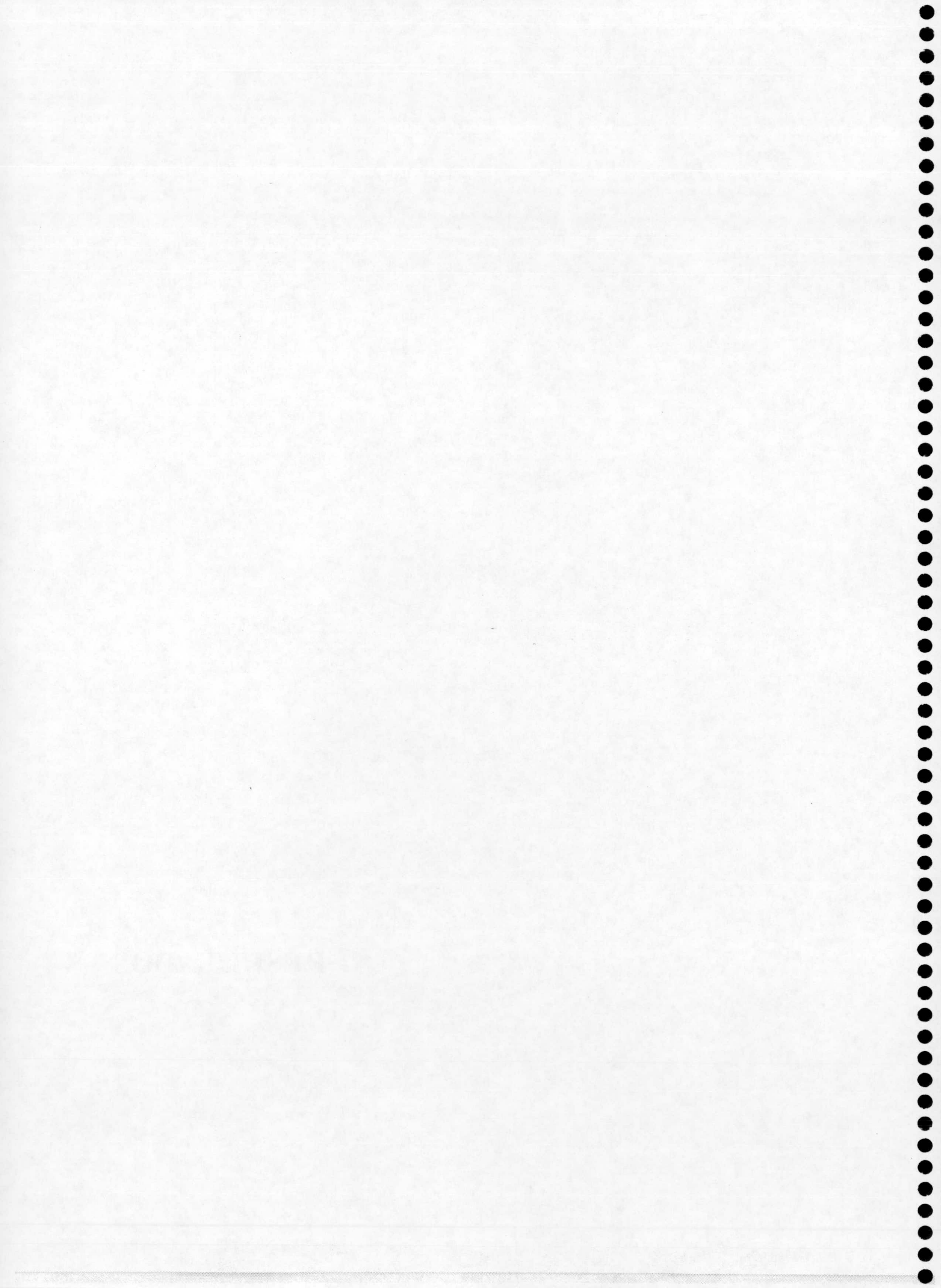
La comparación de nuevas secuencias (de nucleótidos y aminoácidos) con las distintas bases de datos, se realizó con la ayuda de los programas BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponible en el servidor de Internet del NCBI, y FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988) disponible en el servidor de Internet del EMBL-EBI (Tabla 2.6). Para la predicción de péptidos señal y de su sitio de corte se usó el programa. SignalP v. 2.0 (Nielsen *et al.*, 1999) disponible en el servidor de Internet del CBS (Tabla 2.6). El alineamiento de secuencias se realizó con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) disponible en el servidor de internet del PBIL (Tabla 2.6). Con todos estos programas se usaron las opciones estándar.

La predicción de estructuras secundarias en el ARNm se realizó utilizando el programa *mfold* v3.0 (Zuker *et al.*, 1999) (Tabla 2.6).

TABLA 2.6. Direcciones de Internet

Programa	Dirección
Tm determination	http://alces.med.umn.edu/rawtm.html
BLAST	http://ulrec3.unil.ch/software/WUBLAST_form.html
FASTA3	http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/
SignalP V2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/
Clustal W	http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html
<i>mfold</i> v2.3	http://bioinfo.math.rpi.edu/~mfold/rna/form1-2.3.cgi

RESULTADOS



Capítulo I

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE MUTANTES *tol-oprL* DE *Pseudomonas putida*

RESUMEN

En *P. putida* el sistema Tol-OprL está formado por siete genes (en el orden *orf1*, *tolQ*, *tolR*, *tolA*, *tolB*, *oprL* y *orf2*). A pesar de que las proteínas del complejo Tol-OprL están conservadas en un gran número de bacterias gram negativas, sus funciones fisiológicas aún no han sido dilucidadas por completo. Para abordar el estudio de las mismas se construyeron en *P. putida* KT2440, mediante técnicas de intercambio alélico por recombinación homóloga, una serie de mutantes en los genes *tolQ*, *tolR*, *tolA* y *tolB*. Las mutaciones, tanto polares como no polares, en los genes *tolQ*, *tolR*, *tolA* y *tolB* de *P. putida* se generaron por la inserción cromosómica del interposón Ω -Km (el cual presenta dos señales terminadoras de la transcripción) o del gen *xylE* (sin promotor ni señales terminadoras de la transcripción). El fenotipo de cada una de las cepas mutantes se analizó y se comparó con el de la cepa silvestre y el de un mutante *oprL::xylE*, caracterizado anteriormente. Todos los mutantes presentaron un fenotipo similar: morfología celular alterada, formación de pequeñas vesículas de membrana en la superficie celular, liberación de enzimas periplásmicos y proteínas de la membrana externa al medio extracelular, mayor sensibilidad a detergentes, a antibióticos y a EDTA, formación de filamentos, y movilidad celular reducida. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia del sistema Tol-OprL en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa de *P. putida*.

En un trabajo anterior, Rodríguez-Herva y Ramos (1996) habían construido y caracterizado un mutante nulo en el gen *oprL* de la cepa *P. putida* KT2440, y clonado y secuenciado las regiones de ADN flanqueantes a dicho gen (Rodríguez-Herva, 1999). La región secuenciada presentó un 60,5% de G+C (Fig. 3.1), porcentaje muy similar al estimado para el ADN de *P. putida* (60%). En ella se encontraron 9 fases de lectura abierta completas con posible carácter codificante (incluyendo la del gen *oprL*), cuyo uso de codones se ajustaba al de *P. putida*, y una fase de lectura abierta truncada en el extremo 5' cuyo hipotético producto mostraba una alta similitud con la proteína RuvB de *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y *E. coli* (89,4; 74,4 y 71,8% de identidad, respectivamente). En la Figura 3.2 se muestra un esquema del fragmento de 7.577 pb secuenciado. En dicha región, entre los genes '*ruvB* y *oprL*, se encontraron en el mismo sentido de transcripción que *oprL*, 5 fases de lectura abierta cuyos productos presentaron gran similitud con las proteínas Orf1, TolQ, TolR, TolA y TolB de varias bacterias gram negativas. Estos productos proteicos forman parte del denominado sistema Tol-PAL(OprL) (Dennis *et al.*, 1996; Sen *et al.*, 1996; Vianney *et al.*, 1996). En la Tabla 3.1 se resumen las principales características del sistema *tol-oprL* de *P. putida*. En dicha tabla se indica, además, el grado de identidad que dichos genes presentan con los correspondientes genes *tol-pal* de *E. coli*.

Corriente abajo del gen *oprL* se encontró un gen, denominado *orf2*, que presentaba similitud con los genes localizados corriente abajo de *pal* en otras bacterias gram negativas. El gen *orf2* está separado por 168 pb de los genes *orf3* y *orf4* (Fig. 3.1), cuyos hipotéticos productos presentaron similitud con las proteínas ExsD (27% de identidad) y ExsB (38% de identidad) de *Sinorhizobium meliloti*. En *S. meliloti*, *exsD* y *exsB* están localizados en el megaplásmido pSymB, y están implicados en la biosíntesis del exopolisacárido succinoglicano (Becker *et al.*, 1995).

1. CONSTRUCCIÓN DE LOS MUTANTES *tol* DE *P. putida* KT2440

Con el fin de estudiar la función del sistema Tol-OprL de *P. putida* se construyeron una serie de mutantes cromosómicos en los genes *tolQ*, *tolR*, *tolA* y *tolB* mediante reemplazamiento génico. Se construyeron dos tipos de mutantes en cada uno de estos genes: mutantes polares, que contenían una inserción del interposón Ω -Km en el gen correspondiente, y mutantes no polares en los cuales se reemplazó un fragmento interno de cada uno de los genes *tol* por un gen *xylE* que carecía de promotor y de señales de terminación de la transcripción corriente abajo del gen (Fig. 3.2).

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	GC GGCCGCGT	GGTCACCCGG	CATGCCTACC	TGCACTTTGG	GCTGAATATT	CCCGGGCGCT	TGGGGGAGGG	GGGCGATTTT	80
81	TCCGAGCCAG	GCGATGAATG	ACAGATCGAA	AGCGACTTTT	TGTGGTCCTA	CCGCTGGCAT	GCCCCTGGTG	CGCTGGCAAT	160
161	AAGACATTAA	TGAAGAAAAA	ACAGTTGCCA	CAGCGGATTG	GCAAGCTGAG	GAGTAAGCAC	TAGAGTATGC	GCGCGCAAAA	240
241	TCAGCTCGAA	CCGTTTCGCAC	ATCGGTGTCTG	CGTCTATTAC	GAAGATAACCG	ATGCGGGCGG	CGTGGTGTAT	TACGTCAACT	320
321	ACCTGAAATT	CATGGAGCGC	GCGCGCACCG	AACGCCTGCG	GCACCTGGGC	TTTTCCCAGT	CGCAACTGGC	TGAAGACAAC	400
401	CTGCTGTTTCG	TGGTCCATTC	CAGCGAAGCG	CGCTATCACG	CGCCGGCGCG	GCTGGATGAC	GAATTGCGGG	TGACCGCGCA	480
481	GGTCCTTGAA	CTCAATCGCG	CCAGCTTGCG	TTTCGTACAG	CAGGTCTGGC	GGGAAAAGGA	TGAAACGCTG	CTTTGCGAAG	560
561	GGCAGTTCCCT	GGTGGCTGCC	GTGCGCGCCG	ACACTTTCAA	ACCCCGAGCC	CTACCCCCCC	AGCTGCGCGA	CGCCTTTGCG	640
641	GCGGACGGCT	CGGGTAATCA	ATCGAATGCA	GGAGAATAAG	CGTGGAAAGCT	AACGTCGTCG	ACCATACCTC	CATGTGGAGT	720
721	CTGGTCAGCA	ATGCCAGCGT	GGTGGTACAG	CTGGTAATGC	TGACCCCTGGT	GGCCGCCTCG	GTCACCTCAT	GGATCATGAT	800
801	CTTCCAGCGC	AGCACCATGC	TGCGCGCCGG	TCGTCTGTGCG	CTGGATGCCT	TCGAAGAGCG	CTTCTGGTCCG	GGTATCGACC	880
881	TGTCCAAGCT	GTACCGCCAG	GCAAGCCGGT	GTTGACCCGG	GGACTCCGGC	GTAGAGCAGG	TGTTCCGTGC	CGGTTTCAAG	960
961	GAGTTCTCGC	GCCTGCGCCA	GCAACCGGGT	GTTGACCCGG	ACGCCGTGAT	GGAAGGTGTT	GGCCGTGCCA	TGCGCGTGGC	1040
1041	CATCTCGCGC	GAGGAAGAAA	AACTCGAGCA	GAGCTTGCCG	TTCCTGGCCA	CCGTGGTTC	GACCAGCCCG	TACATCGGCC	1120
1121	TGTTTCGGCAC	CGTGTGGGGC	ATCATGAACT	CCTTCGCGCG	CCTGGCCAGC	GCCCAGCAGG	CCACCCTGGC	TACCCTTGCT	1200
1201	CCGGGCATCG	CCGAAGCACT	GATCGCTACC	GCCATCGGCC	TGTTTCGCGC	AATCCCGGCT	GTTATTGCCT	ACAACCCTTT	1280
1281	CGCCGCGCGC	AGTGAAGTAC	TGATCGGCCG	TTACTACACC	TTCCGCCAGC	AGTTCAGGC	GATCCTGCAC	CGCAAAGTGC	1360
1361	ACACCAGCGA	AGAGTAATCA	GGTAGAAGCC	CATGGCCCGA	GTTCCGCCACA	AACGCAAGCC	CGTCGCCGAG	ATGAACGTGG	1440
1441	TGCCCTACAT	CGACGTGATG	CTGGTGTGTC	TGGTCACTTT	CATGGTGACG	GCGCCATGTC	TCAACCAGGG	CGTGAAGGTC	1520
1521	GACCTGCCCA	AGGTTTCCAG	CGAAGCCTTG	CCGCAGGACA	ACAACGTCCA	GATCCTCACC	ATCTCCATCA	AGGCCGATAA	1600
1601	AACCTATTAC	TGGAACCTCG	GCAAGCAAGT	CGATAACCAG	AAGCAGATGG	ACAAAGCCAT	GACCTTGCCG	GCCATGACCG	1680
1681	ACGCCGTGAC	CAAGATCATT	GCTGCCGGCC	GTGACCAGGG	CAAGCAGACC	CAGGTGTTCA	TTCGTGGCGA	CAAGGCTGTC	1760
1761	GACTATGGCG	CGGTCATGGG	TGCCATGGGC	GGGTTGCGA	AGGCCGGTGT	CGGTAACGTT	GGCCTGATTA	CCGAGGCGCC	1840
1841	CTGATGCAAC	AGCGAGAGCC	ATCCGCCTCG	GAAAGCTACT	TCTGGCCAG	TGTCTGGGCC	ATCGGCCTGC	ATGTGCTGGT	1920
1921	GTTTCGCCCTG	CTGTTTCGTC	GTTTTGCCAT	GACGCCGGAG	CTGCCGCCTT	CCAAGCCGAT	CGTTCAGGCT	ACCCTGTACC	2000
2001	AGCTCAAGTC	CAAGAGCCAG	GCAACCACCC	AGACCAATCA	GAAGATTGCC	GGGGAGGCGA	AGAAAACCGC	TTCGCGCCAG	2080
2081	ACCGAAGTCG	AGCAGCTGGA	ACAGAAGAAG	GTCGAGCAGG	AGGCCGTGAA	GGCCGCGGAA	CAAAAGAAAG	CTGACGCCGC	2160
2161	TCAAAAGGCC	GAAGAGGCC	GCGAAGCCGC	CGAGGCAGAA	AAAGCCGAGG	ATGCTGCCAA	GGCCGCTGAA	GCCGCCAAGG	2240
2241	CTGCCGAGGC	CAAGAAAGCT	GCCGAAGCCA	AGAAGGCCGA	CGAGGCAGAA	AAAGCTGCCG	AGAAACAGCA	GGCCGACATC	2320
2321	GCCAAGAAGA	AGGCCGAGGA	CGAAGCCAAG	AAAAAGCCG	AAGAAGAGGC	CAAGAAAGCG	GCCGCTGAAG	AGGCCAAGAA	2400
2401	GAAAGCCGCC	GAGGACGCCA	AGAAAAGGC	AGCCGAAGAG	GCCAAGAAGA	AAGCAGCCGA	GGACGCCAAG	AAGAAAGCGG	2480
2481	CGGCCGAGGA	CGCGAAGAAG	AAGGCAGCTG	AAGAGGCCAA	GAAAAGGCC	GCTGCAGATG	CCCAGAAGAA	GAAGGCACAG	2560
2561	GAAGCGGCC	GCAAGGCGGC	AGAAGACAAG	AAAGCCAGG	CACTGGCCGA	GCTGTTGTCC	GATACCACCG	AGCGGCAGCA	2640
2641	GGCGCTGGCC	GACGAGCAGG	GTGACCAGGT	GGCCGGCGAC	TTCGACGACC	TGATCCGCAT	GCGCGCGGCC	GAGGGCTGGG	2720
2721	CACGTCCGCC	TTCCGCGCGC	AAGGGCATGA	CGGTGGTCTT	GCAGATCAAC	ATGTTGCCGG	ACGGTACCAT	CACCAATGTC	2800
2801	AGCGTGGCCC	GGTCCAGTGG	TGACGGCCCG	TATGACAGTT	CGGCCGGTGGC	TGCGGTGAAG	AACATTGGTC	GTTTGACCGA	2880
2881	GATGCAGGGT	ATGAAGCCGA	GCGATTTCAA	CCAATATCGT	TCGTTCAAGA	TGACATTTAC	ACCTGAGGAT	CTAGCGTTGT	2960
2961	GATTAACGCT	CTGAGAGGAC	TGCTGGTTCAT	GCTCTGCTGC	GTGGCAGGCA	TGGCGGTGGC	AGAAGAAAAG	AACATCCTGG	3040
3041	TTACCAGCGG	CAGCGACCGG	GCCACGCCCA	TCGCGGTAGT	GCCGTTCCGGT	CTGCAGGGCG	GTAGCGTGTG	GCCTGAAGAC	3120
3121	ATCGCCGACA	TCATCGGCAA	CGACCTGCGC	AACTCTGGCT	ATTACTCGCC	AATTCGCGCG	CAGAACATGA	TCAGCCAGCC	3200
3201	GTCGAGGCC	AGCGAAGTGA	TCTTCCGTGA	TTGGAAAGCG	CTGGGTGCAC	AGTACGTGAT	GGTCGGCAGC	ATCGTGCCGT	3280
3281	CGGGCGGTCG	CCTGCAGGTG	CAGTACGCGC	TGTTCAACGT	CGCCACCAGG	CAGCAAGTGC	TGACCCGCGC	CGTGGCGGGC	3360
3361	AGCACCGACC	AGTTGCGCGA	CATGGCGCAC	TACATTGCCG	ACCAGTCGTT	CGAGAAGCTC	ACCGGCATCA	AGGGCGCGTT	3440
3441	CTCTACGCGC	ATGCTGTACG	TGACGGCCGA	GCGTTTCTCC	ACCAATAACA	CCCGCTACAC	CCTCCAGCGT	TCGGACTACG	3520
3521	ACGGTGCGCG	TGCGGTGACC	CTGCTGCAAT	CGCGTGAGCC	GATCCTGTCTG	CCGCGCTTTG	CGCCAGATGG	CAAACGTATC	3600
3601	GCCTACGTTT	CGTTCGAGCA	GAAGCGCCA	CGTATCTTCG	TGCAGAACAT	CGATACTGGC	CGCCGCGAGC	AGGTGACCAA	3680
3681	CTTCGAAGGC	CTGAACGGTG	CGCCAGCCTG	GTCGCCGGAC	GGTTTCGCGC	TGGCGTTCGT	ACTGTCCAAG	GACGGCAACC	3760
3761	CGGACATCTA	CGTGATGAAC	GTGGCCTCGC	GCCAGATCAG	CCGTGTTACT	GCAGGCCCGG	GTATCAATAC	CGAGCCGTTT	3840
3841	TGGGGTAAAG	ATGGCAACAC	CCTCTACTTC	ACTTCCGACC	GTGGCGGCAA	ACCGCAGATC	TATAAACAGT	CGGTGAGTGG	3920
3921	TGGTGGTGCC	GAGCGCGTAA	CGTTCGTAGG	TAATAACAAC	GCCAACCCGA	AACTTTCGGC	GGACGAAAAG	ACCTGGGTAA	4000
4001	TGATTCATCG	CCAACAGGGC	TTTACCAACT	TCAAAGTGGC	GGCACAGGAC	TTGCAACCGG	GAAGTGTAAG	GATTCTGTCT	4080
4081	GAAACAAGTC	TTGATGAGTC	TCCCACTGTT	GCGCCAAACG	GCACCATGCT	AATCTACGCC	ACCCGCCAGC	AGGGCCGGGG	4160
4161	AGTCTTGATG	CTCGTGTGCG	TGAACGGCCG	CGTGAGGCTC	CCACTTCCTA	CCGCTCAAGG	CGAAGTCAGA	GAACCGTCTT	4240
4241	GGTCCCCTTA	CCTGAACCTGA	TTGCGGCGTA	ATACATTTTG	CTTAACACAC	TGGGGTTTTCA	TTAGGAGTTT	CACGATGGAA	4320
4321	ATGCTGAAGT	TTGGTAAATT	TGCTGCGCTG	GCTCTGGCCA	TGGCCGTAGC	TGTAGGTTGC	TCCCTGAAGG	GCGGTGATAA	4400
4401	CGCAGGCCAA	GGCGCTGCTG	TAGACCCTAA	CGCTGGCTAC	GGTGCCAACA	CTGGCGCTGT	TGACGGCTCC	CTGAGCGAAG	4480
4481	AAGCCGCCCT	GCGCGCAATC	ACCACCTTCT	ACTTCGAATA	CGACAGCTCG	GACCTGAAGC	CAGAAGCCAT	GCGCGCTCTG	4560
4561	GACGTTTCAG	CCAAGGACCT	GAAAGCCAAC	GGCAACCCTG	TTGTTCTGGA	AGGTAACACC	GACGAGCGCG	GCACCCGCGA	4640
4641	GTACAACATG	GCTCTGGGTG	AGCGTCTGTC	GAAAGCCGTT	CAGCGCTACC	TGGTCTTGCA	GGGCGTTTCC	CCTGCTCAGC	4720
4721	TGGAACCTGGT	TTCTTACGGC	GAAGAGCGTC	CAGTTGCTAC	CGGCAACGAC	GAGCAGTCTT	GGGCTCAGAA	CCGTGCGGTA	4800
4801	GAACCTGCGTA	AGTAAGTTCT	TATGCGTATG	TGCCGCCGTG	TAGTAACCGT	CCTCGCACTC	AGCTTGCCGC	TTGCGGCCGT	4880
4881	GGCTGAGGTC	CCTGTAGTAG	ATGACAACGC	AGGCAGCTAT	CCGCCCTGCGG	GTTATGGCAC	GAGCGGCGCC	TATGCCGGGT	4960
4961	CAGGGGCTTC	GGCCCCTGCC	TCTGCACAGG	GCCAGCTGTT	CATGCAGCTG	CAACAGATGC	AGGATCAGCT	TTCCCGCCAG	5040
5041	CAAGGCATCA	TCGAAGAGCT	GCAAAACGAT	GTGTCCCGCA	TGAAGCAGGA	AAACCTGGAG	CGTTACCAGG	ACCTGGACCG	5120
5121	TCGCATCAAC	AGTGGCGCTG	CGCCTGCCGC	AACCCCTGAC	AATTCCTCCG	GTGGTGGCGC	GTCCAATGCC	GCCCCGATG	5200
5201	CCGCAGCAGG	TGCTGCTGCG	CAACAACCGG	CCGGCAGTAG	CCAGCCCGGT	GATCCGGCGA	AAGAGAAGCT	CTATTACGAC	5280
5281	GCAGCTTTCG	ACCTGATCAA	ACAGAAAGAC	TTCCGACAAGG	CCAGCCAGGC	GTTCAACGCC	TTCTGCGCA	AGTACCCCAA	5360
5361	CAGCCAGTAC	GCCGGTAATG	CCCAATACTG	GTTGGGTGAA	GTGAACCTGG	CCAAGGTTGA	CCTGCAAGGC	GCCAGCCAGG	5440
5441	CCTTTGCCCA	GGTCAGCCAA	AAGTACCCGA	AGCACAGCAA	GGTGCCAGAT	TCGCTGTACA	AACTGGCTGA	TGTCGAGCGC	5520
5521	CGTATGGGCC	ATACCGACAA	GGTAAAAGGC	ATCCTTCAGC	AGGTCGTGAC	CCAGTACCCC	GGCACCTCTG	CCGCTCAACT	5600
5601	GGCCAGCGT	GACCTGCAGA	AGCTCTAGGC	GTTGTGCTG	TACCGTCTCG	AAGAAACCCG	CGCCAGTCGC	GGGTTTTTTC	5680

4. Resultados – Capítulo II

```

10      20      30      40      50      60      70      80
5681  GTTAGAATCA CTGCCCTTTT TTCGTAAACA CGCTGCTGCG GATAACGCTA TGTCGAGTCC GCGACAGTGC CTGACGGAGG 5760
5761  CGGACAGCCT GTTTAGCTGT CACGCCCGTG GCGAGCATGC AAGACACATT ACGCATCACC GAAGTCTTTT ACTCTTTGCA 5840
5841  GGGTGAGACG CGAACGGCCG GGCTGCCAC GGTATTTGTG CGCCTCACC GTTGCCCCCT GCGTTGCCAG TACTGCGACA 5920
5921  GTGCCTATGC CTTAGTGGC GGTACCGTAC GCACCCTTGA TTCGATCCTC GAACAAGTGG CCGGCTTCAA ACCGCGCTAC 6000
6001  GTCTGTGTCA CCGGTGGCGA ACCACTGGCC CAGCCCAACG CCTTGCCGTT GCTGCAGCGG CTGTGTGATG CCGGTTACGA 6080
6081  GGTGTGCTG GAGACCAGCG GCGCGCTGGA TATTGCCGGC ACCGACACTC GCGTCAGCCG TGTGGTCGAC CTGAAAACCC 6160
6161  CAGGCTCCGA AGAGTCGCAC CGTAACCGCT ACGAGAACAT CGAGCAGCTG ACACGCAACG ACCAGGTCAA GTTCGTCATC 6240
6241  TGTTCCCGCG AGGATTATGA CTGGGCGGTA TCCAAGCTGA TCCAGTACAA CCTGGCCGAG CGTGCCGGTG AGGTGTTGTT 6320
6321  CTCACCCAGC CATCATCAGG TGAACGCCAG TGACCTGGCT GACTGGATCG TTGCTGACAA CCTGCCTGTA CGTTCCAAC 6400
6401  TGCAGCTGCA CAAGTTGCTG TGAACGCAG AGCCCGGACG TTGATTGAGG AGCACGTACA CATGACAGAA AAACGCGCAG 6480
6481  TAATCCTGTT GTCCGGCGGC CTGGATTCCG CCACCGTGGT TGCCATGGCC AAGGCCGAAG GCTACAGCTG CTACACCATG 6560
6561  AGCTTCGACT ACGGCCAGCG TCATCGTGCC GAGCTGAACG CCGCTGCCCG CGTGGCCCGC GACCTGGGTG TGGTCGAGCA 6640
6641  CAAGGTGATT GGGCTGAACC TCGACGGCAT CGGCGGTTCT GCATTGACCG ACAGCAGCAT CGACGTCCG GAAGCCCCGG 6720
6721  GTGAAGGCAT TCCGGTCACT TATGTGCCGG CGCGCAACAC CGTGTTCCTT TCGCTGGCCC TGGGTTGGGC CGAAGTACTG 6800
6801  GAAGCGCGCG ACATCTTCAT TGGCGTCAAC GCCGTGGATT ACTCCGGCTA CCCGGATTGC CGACCCGAGT TCGTCGAGGC 6880
6881  CTTGAGCGCG ATGGCCAACC TGGCGACCAA GGCTGGCGTA GAAGGGCAGG GCTTCCGCAT CCAGGCGCCG CTGCAGAACA 6960
6961  TGAGCAAGGC GCAGATCGTG CAGGCCGGTA TGGCCCGTGG CGTGGACTAC AGCCTGACCG TTTCTGTGTA CCAGGCCGAC 7040
7041  GATGACGGCC GCGCCTGTGG CAAATGCGAC AGCTGCCGCC TGCGCGCCGA TGGTTTCAAG GCCGCGGTA TCGAAGATCC 7120
7121  GACTCGGTAT TTTTGAAAAA ATCGTGATGG GGTGTTGAAT TC 7162

```

Figura 3.1 Secuencia correspondiente a los genes *'ruvB*, *orf1*, *tolQ*, *tolR*, *tolA*, *tolB*, *oprL*, *orf2*, *orf3* y *orf4* de *P. putida* KT2440. En azul se indican las regiones intergénicas. En rojo se indican los codones de iniciación y de parada de la traducción. En negro se indica el resto de la secuencia codificante para cada gen. Las posiciones de los genes (según la numeración utilizada en la figura) fueron las siguientes: *'ruvB*, 1-101; *orf1*, 227-679; *tolQ*, 682-1.377; *tolR*, 1.392-1.844; *tolA*, 1.844-2.962; *tolB*, 2.959-4.260; *oprL*, 4.315-4.815; *orf2*, 4.822-5.628, *orf3*, 5.797-6.444; *orf4*, 6.462-7.136 Esta secuencia está delimitada por un sitio *NotI* en el extremo 5' y por un sitio *EcoRI* en el 3', indicados en negrita. El número de acceso para esta secuencia en la base de datos GenBank es X74218.

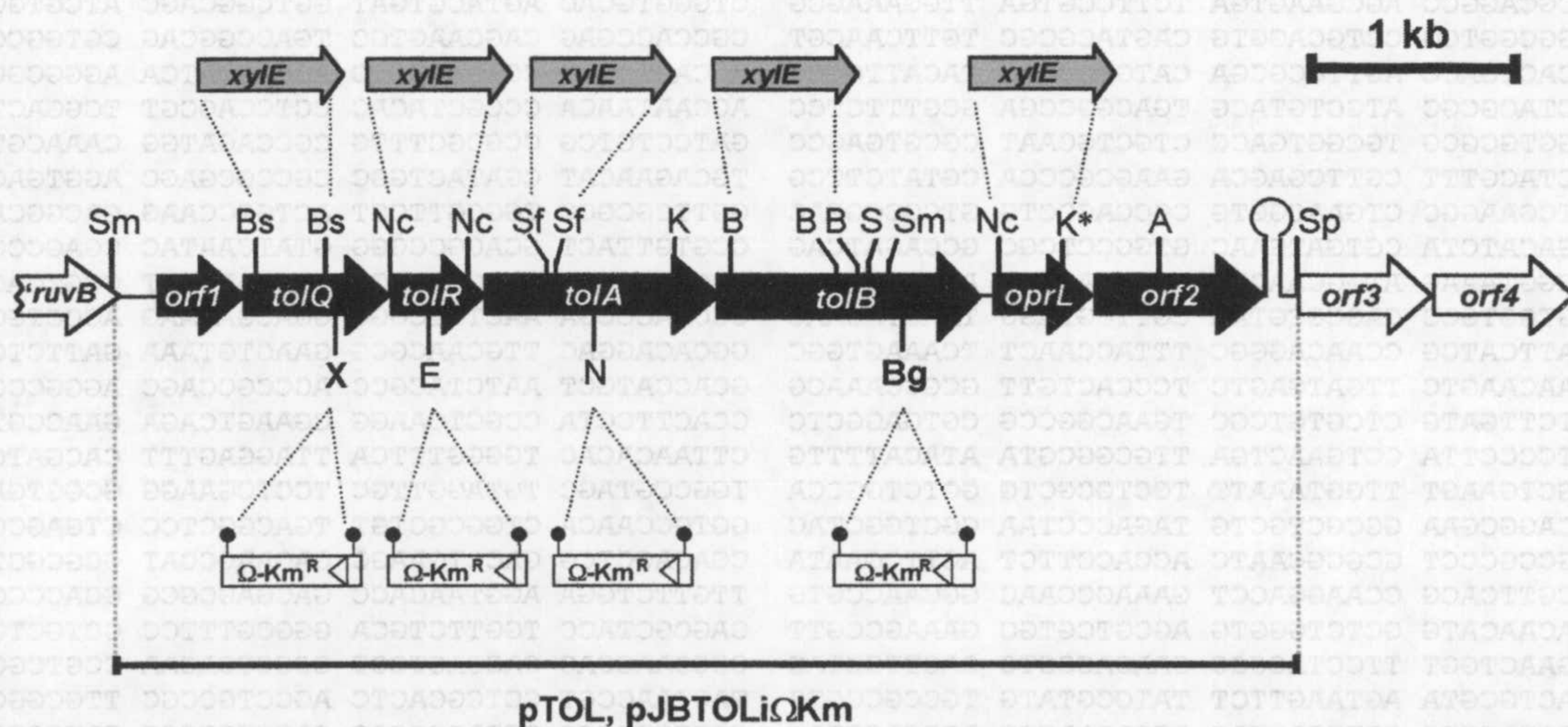


TABLA 3.1. Características principales de los genes del sistema *tol-oprL* de *P. putida*

Gen	Longitud (pb)	Codón iniciador	Longitud proteína (aa) ^a	Peso molecular (Da)	Distancia hasta el gen anterior (y hasta el gen siguiente) (pb) ^b	Péptido señal (longitud) ^c	Identidad con <i>E. coli</i> (%) ^d
<i>orf1</i>	453	AUG	150	17.194	125 (2)	-	48,0
<i>tolQ</i>	696	GUG	231	25.294	2 (14)	-	55,0
<i>tolR</i>	453	AUG	150	16.236	14 (-1)	-	34,5
<i>tolA</i>	1.119	AUG	372	40.108	-1 (-4)	-	37,8
<i>tolB</i>	1.302	GUG	433	47.401	-4 (54)	+ (21)	43,4
<i>oprL</i>	501	AUG	166	17.821	54 (6)	+ (21)	39,8
<i>orf2</i>	807	AUG	268	28.712	6 (168)	+ (21)	32,0

^a Longitud de la proteína en aminoácidos

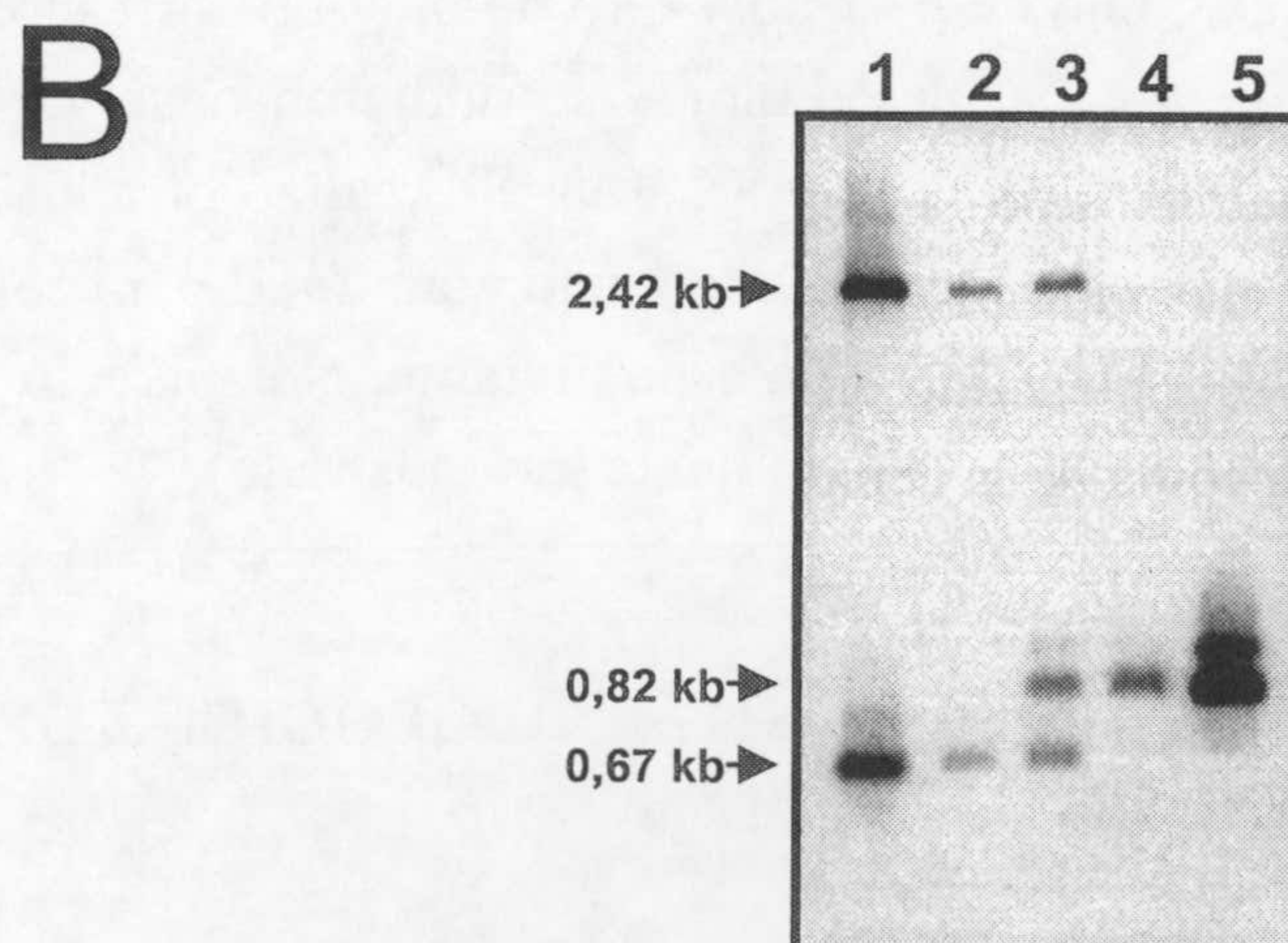
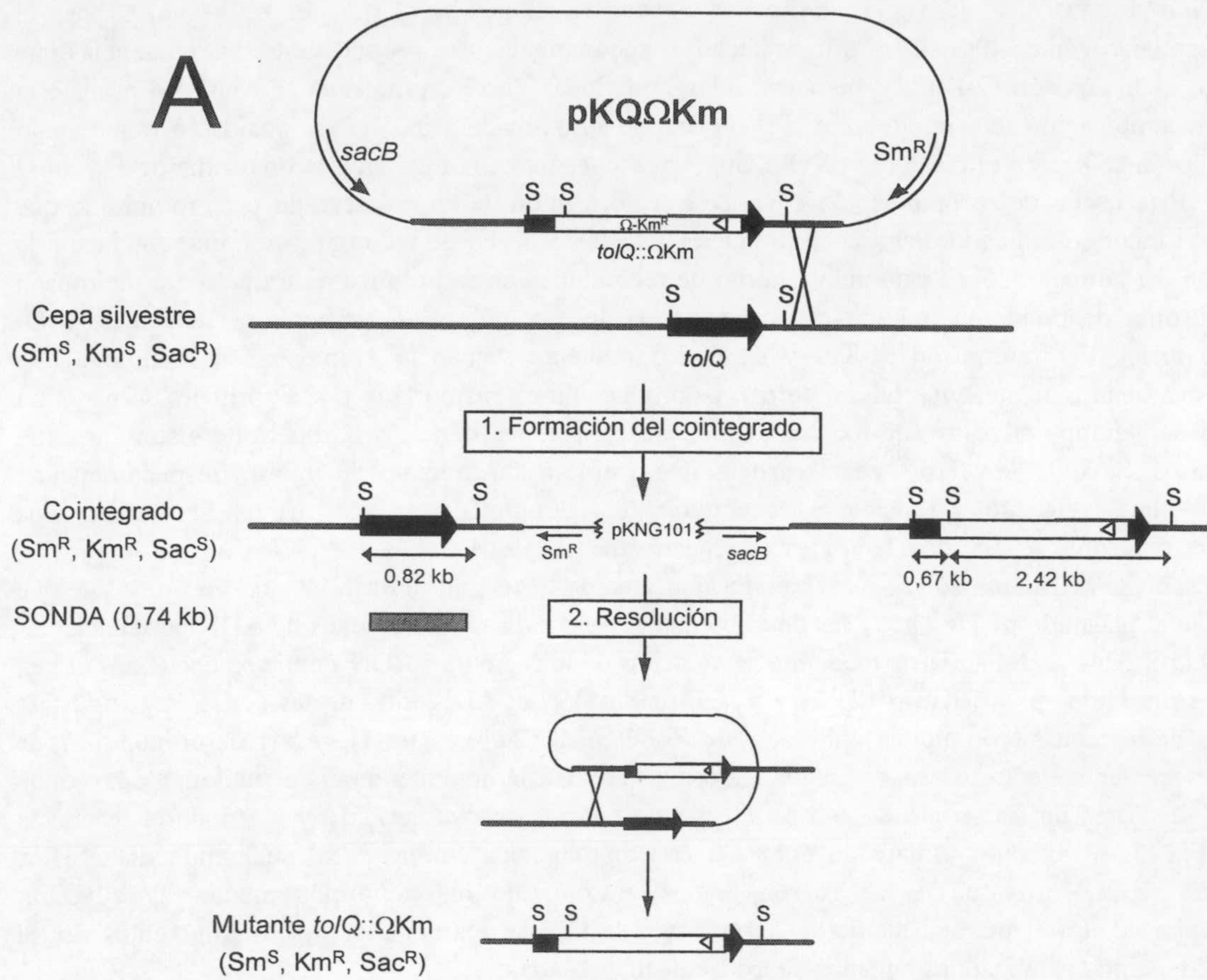
^b Distancia entre genes contiguos, en pares de bases. Un número negativo significa que los genes solapan en la cantidad de pares de bases indicada.

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

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

← **Figura 3.2.** Esquema de la región de 7.577 pb del cromosoma de *P. putida* que contiene el conjunto de genes *tol-oprL*. Las flechas indican las diferentes fases de lectura abierta y su sentido de transcripción. Las flechas negras indican la posición de los genes del sistema *tol-oprL*; las flechas blancas indican la posición de fases de lectura abierta adyacentes a los genes *tol-oprL*; las flechas grises indican la posición del gen indicador *xylE*; y los rectángulos blancos la posición del interposón Ω -Km (los triángulos internos indican el sentido de transcripción del gen de resistencia a Km, y los círculos negros representan las señales de terminación de la transcripción). La barra horizontal de mayor longitud representa el fragmento *SmaI-SphI* de 5.745 pb insertado en los plásmidos pTOL y pJBTOLi Ω Km. La posición del interposón Ω -Km en los diferentes mutantes *tol:: Ω Km* se indica debajo del mapa que muestra las distintas fases de lectura abierta encontradas. En *P. putida* Q Ω , R Ω y A Ω , el interposón Ω -Km se obtuvo del plásmido pHP45 Ω Km como un fragmento *BamHI* de 2.243 pb cuyos extremos 5' colgantes se rellenaron con ayuda del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, y se clonó en los sitios de restricción indicados que previamente también se convirtieron en romos. En *P. putida* B Ω , el interposón Ω -Km se obtuvo como un fragmento *BamHI* que se clonó en el sitio *BglIII* del gen *tolB*. La posición del gen indicador *xylE* en los mutantes no polares es los genes *tol-oprL* se muestra sobre el mapa de las fases de lectura abierta. En todos los casos el gen *xylE* fue obtenido del plásmido pXYLE10 como un fragmento *SmaI* de 962 pb. Se delecionaron fragmentos internos de cada uno de los genes *tol-oprL*, y tras tratar los extremos cohesivos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I o con la ADN polimerasa del fago T4, se reemplazaron por el gen *xylE*. En la figura sólo se indican los sitios de restricción relevantes. Los sitios únicos se indican en negrita. Los sitios de restricción se representan como: A, *Asp700*; B, *BstEII*; Bg, *BglIII*; Bs, *BstXI*; E, *EcoNI*; K, *KpnI*; N, *NotI*; Nc, *NcoI*; S, *StuI*; Sf, *SfiI*; Sm, *SmaI*; Sp, *SphI*; X, *XhoI*. *Por cambio de una C (situada en posición 4.757 pb [Fig. 3.1]) a una G se creó un sitio *KpnI* en el gen *oprL* por mutagénesis dirigida.

Para la construcción por recombinación homóloga de los mutantes *tol* de *P. putida*, se utilizaron plásmidos derivados de pKNG101. En concreto, se utilizaron los plásmidos pKQΩKm, pKRΩKm, pKAΩKm y pKBΩKm para construir los mutantes polares en los genes *tolQ*, *tolR*, *tolA* y *tolB*, respectivamente. Del mismo modo, para la construcción de los mutantes no polares en dichos genes se usaron los plásmidos pKSmaIQxylE, pKSmaIRxylE, pKSmaIAxylE y pKSmaIBxylE, respectivamente. Estos plásmidos, con los que se llevó a cabo el reemplazamiento génico, contienen parte del correspondiente gen *tol* que se quiere mutar interrumpido por el interposón Ω-Km o por el gen indicador *xylE*, además de secuencias flanqueantes de ADN cromosómico de *P. putida*. Para la construcción de los mutantes por recombinación homóloga se siguió el procedimiento descrito en el apartado 8 de la sección *Materiales y Métodos*. Como ejemplo, se describe a continuación de forma detallada la construcción del mutante *tolQ::ΩKm*. El plásmido suicida pKQΩKm, que contiene la inserción del interposón Ω-Km en el gen *tolQ* de *P. putida*, se transfirió desde *E. coli* CC118λ*pir* a *P. putida* KT2440 por conjugación "tripartita". Este plásmido confiere resistencia a estreptomicina y contiene el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* como marcador contraseleccionable, lo que permite la selección del segundo hecho de recombinación, necesario para completar el intercambio alélico. Los transconjugantes en los cuales el plásmido se había integrado en el cromosoma, se seleccionaron en medio mínimo con benzoato (5 mM), estreptomicina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). La frecuencia de aparición de transconjugantes fue de 1×10^{-5} por receptor, y no crecieron en LB suplido con 10% (p/v) de sacarosa. Los clones así seleccionados (denominados cointegrados o merodiploides) se cultivaron en medio LB líquido sin estreptomicina durante 9 horas para permitir la aparición de un segundo hecho de recombinación que completara el intercambio alélico. Al cabo de ese tiempo se sembraron diluciones seriadas en medio LB con 10% (p/v) de sacarosa que se incubaron a 22°C (se observó que la lisis producida por la expresión del gen *sacB* era más efectiva a temperaturas menores de 30°C). Las colonias resistentes a sacarosa aparecieron con una frecuencia de 1×10^{-3} . Entre estas colonias se seleccionaron aquellos clones que fueron sensibles a estreptomicina y resistentes a kanamicina. En la Figura 3.3A se muestra un esquema del procedimiento seguido para conseguir el reemplazamiento génico. El intercambio alélico de varios de esos clones se comprobó mediante análisis por PCR (no mostrado), y entre los clones que dieron un resultado positivo se eligió uno al azar que se denominó *P. putida* QΩ. En esta cepa se confirmaron, mediante hibridación de ADN (Southern-blotting), tanto la pérdida del gen silvestre y de las secuencias del vector, como la presencia de la copia mutada (Fig. 3.3B). Para ello, en una primera hibridación, el ADN cromosómico de la cepa parental, del cointegrado y del mutante seleccionado digeridos con *SaII*, se hibridaron con una sonda de 743 pb. La sonda hibridó en la cepa



(Ver Leyenda en la página siguiente)

↑ **Figura 3.3.** Estrategia seguida para la construcción del mutante *P. putida* QΩ y análisis mediante hibridación de ADN de la región donde se encuentra el gen *tolQ*. **(A)** Pasos seguidos para el reemplazamiento génico. Paso 1: el primer hecho de recombinación se produce entre las secuencias que flanquean al interposón Ω-Km y sus secuencias homólogas en el cromosoma. En nuestro caso, esta primera recombinación se produjo entre la secuencia de aproximadamente 1,7 kb situada corriente abajo del interposón Ω-Km en el plásmido pKQΩKm, y su secuencia homóloga en el cromosoma de *P. putida* KT2440. Este hecho de recombinación conduce a la formación de un cointegrado o merodiploide que presenta el fenotipo indicado. Paso 2: se produce un segundo hecho de recombinación que conduce a la resolución del cointegrado. Si este nuevo hecho de recombinación se produce en un lado del interposón Ω-Km distinto de donde tuvo lugar el primer hecho de recombinación (entre la secuencia de 1 kb corriente arriba del interposón Ω-Km y su correspondiente secuencia cromosómica homóloga), se formará una cepa mutante *tolQ*::ΩKm, pero si se produce en el mismo lado que el primero se generará una cepa de genotipo silvestre (no mostrado). La selección de resistencia a Km permite distinguir entre ambos casos. S, *SalI*; Km^R/Km^S, cepa resistente o sensible a kanamicina (50 µg/ml), respectivamente; Sm^R/Sm^S, cepa resistente o sensible a estreptomicina (100µg/ml), respectivamente; Sac^R/Sac^S, cepa resistente o sensible a sacarosa 10% (p/v), respectivamente. La flecha negra indica el gen *tolQ*, y el rectángulo blanco el interposón Ω-Km. Las líneas negras de trazo fino indican las regiones de ADN que pertenecen al plásmido pKNG101, y las de trazo más grueso indican las regiones de ADN pertenecientes a *P. putida* KT2440. **(B)** Análisis mediante hibridación de la región de ADN donde se encuentra el gen *tolQ*. Los plásmidos pKQΩKm (calle 1) y pTOL (calle 5), y el ADN total de las cepas *P. putida* QΩ (calle 2), de la cepa merodiploide (calle 3) y de *P. putida* KT2440 (calle 4), se digirieron con *SalI*, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfirieron a membrana de nailon. Como sonda de ADN se utilizó un fragmento de 743 pb localizado entre las posiciones 719 y 1.461 de la secuencia génica (Fig. 3.1), obtenido y marcado por PCR con digoxigenina conjugada al nucleótido dUTP. Los plásmidos pKQΩKm y pTOL se usaron como controles de los genotipos mutante y silvestre, respectivamente. En el margen izquierdo de la figura se indican los tamaños de los fragmentos. En el margen izquierdo se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos.

silvestre con una banda de 0,82 kb que contenía el gen *tolQ*, mientras que la cepa mutante hibridó con dos fragmentos, uno de 2,42 kb y otro de 0,67 kb correspondientes a la construcción *tolQ*::ΩKm. En la cepa merodiploide se pudieron observar las tres bandas (ver explicación de los tamaños en la Figura 3.3A). Se realizó otra hibridación adicional usando como sonda el plásmido pKNG101 cortado con *SmaI* para comprobar que no quedaba ningún resto de este plásmido en la cepa mutante. No apareció ninguna señal de hibridación con el cromosoma de la cepa mutante (no mostrado).

2. CARACTERIZACIÓN FISOLÓGICA Y MORFOLÓGICA DE LOS MUTANTES *tol* DE *P. putida* KT2440

2.1. Crecimiento de los mutantes *tol* en medio rico

Células de *P. putida* KT2440 y de los diferentes mutantes *tol-oprL* se cultivaron en medio LB líquido a 30°C y 200 rpm. Los tiempos de generación de los mutantes *tol-oprL* fueron de aproximadamente 41 min, similares al de la cepa parental (37 min),

excepto en el caso de los mutantes *P. putida* B Ω y R Ω cuyos tiempos de generación fueron ligeramente superiores (alrededor de 44 y 48 min, respectivamente).

Durante el cultivo en medio líquido, y al alcanzar la fase de crecimiento estacionaria, las cepas mutantes comenzaron a formar grumos, probablemente como consecuencia de fenómenos de adhesión celular debido a la presencia de restos celulares resultantes de un proceso de lisis bacteriana.

2.2. Ensayos de resistencia/sensibilidad a diferentes compuestos

Se comparó el patrón de resistencia/sensibilidad de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* a SDS, DOC y EDTA, con el de la cepa silvestre y el del mutante PX previamente caracterizado. Las células se incubaron durante 4 horas a 30°C en medio LB líquido suplido con 0,5% (p/v) de SDS, 2% (p/v) de DOC, o 0,5 mM de EDTA, y se determinó su sensibilidad a estos compuestos tal y como se describe en el apartado 10.2 de la sección *Materiales y Métodos*. Mientras el porcentaje de supervivencia de la cepa silvestre fue del 70-99% en todos los casos, para los mutantes *tol-oprL* el porcentaje de supervivencia se situó entre el 0,1 y el 0,6% tanto en SDS como en EDTA, y entre 0,004 y el 0,1% en presencia de DOC (Tabla 3.2). Los mutantes *tolR* de *P. putida* (RX y

TABLA 3.2. Sensibilidad de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* a detergentes y a EDTA^a

Cepa	SDS (0,5% [p/v])	DOC (2% [p/v])	EDTA (0,5 mM)
KT2440	99,8	86	70
Q Ω	0,14	0,09	0,26
R Ω	0,056	0,042	0,093
A Ω	0,37	0,075	0,98
B Ω	0,17	0,12	0,32
QX	0,125	0,15	0,075
RX	0,087	0,006	0,035
AX	0,375	0,025	0,1
BX	0,083	0,009	0,64
PX	0,32	0,004	0,12

^a Las células se incubaron durante 4h a 30°C en medio LB suplido con diferentes compuestos a la concentración indicada arriba, y se determinó el número de UFC/ml de cada cultivo. Los valores presentados corresponden al porcentaje de supervivencia, calculado como la relación entre el número de UFC/ml en los cultivos suplidos con el compuesto y el número de UFC/ml en los cultivos no suplidos (ver apartado 10.2 de la sección *Materiales y Métodos*).

RΩ) fueron los más sensibles, particularmente a DOC, con una tasa de supervivencia de sólo el 0,006% (Tabla 3.2). El mutante PX fue también muy sensible a este compuesto (porcentaje de supervivencia del 0,004%) (Tabla 3.2).

Por otro lado, se determinó la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de los mutantes no polares en los genes *tol-oprL* y se comparó con la de la cepa silvestre. Los mutantes fueron más sensibles que la cepa parental a los antibióticos hidrofóbicos ácido fusídico, novobiocina y rifampicina, principalmente a este último (Tabla 3.3). Los mutantes también presentaron mayor sensibilidad a los aminoglicósidos probados, como gentamicina y estreptomina, a algunos β-lactámicos, tales como cefepine y piperacilina, aunque no a imipenen, y a ácido nalidíxico (Tabla 3.3). Los mutantes fueron también más sensibles que la cepa silvestre a cloramfenicol, y algo menos a tetraciclina (ambos antibióticos son eliminados de la célula mediante sistemas de extrusión activa) (Tabla 3.3). En general, los mutantes no polares en la agrupación *tol-oprL* más sensibles a los antibióticos ensayados fueron *P. putida* BX y PX (Tabla 3.3).

TABLA 3.3. MICs de diferentes antibióticos para *P. putida* KT2440 y los mutantes no polares en los genes *tol-oprL*^a

Antibióticos	MICs (µg/ml)					
	KT2440	QX	RX	AX	BX	PX
Ácido fusídico	512	128	128	64	64	128
Ácido nalidíxico	32	8	8	8	4	4
Cefepine	2	0,5	0,25	0,5	0,12	0,12
Cloramfenicol	128	16	16	16	16	16
Estreptomina	8	1	4	2	2	0,5
Gentamicina	2	0,25	0,5	0,5	0,12	0,12
Imipenen	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Novobiocina	256	64	64	32	64	64
Piperacilina	16	16	4	4	4	2
Rifampicina	8	2	1	4	0,5	0,5
Tetraciclina	2	1	0,5	1	1	2

^a La concentración mínima inhibitoria del crecimiento se determinó como se indicó en el apartado 10.1 de la sección *Materiales y Métodos*. Los datos son el promedio de los valores obtenidos a partir de tres experimentos independientes.

2.3. Observación de los mutantes *tol-oprL* al microscopio óptico y electrónico

Células de los mutantes *tol-oprL* y de la cepa parental cultivadas en medio LB líquido se observaron al microscopio óptico de contraste de fases. El cultivo de la cepa parental presentaba el aspecto característico de un cultivo de *Pseudomonas* en fase de crecimiento exponencial, con numerosas células individuales de forma bacilar y otras muchas en proceso de división celular (no mostrado). Las células de todos los mutantes presentaron un aspecto diferente. En general, eran más cortas que las de la cepa silvestre y todas crecían formando filamentos compuestos por 10 o más unidades celulares (no mostrado).

La cepa parental y los mutantes *tol-oprL* en fase de crecimiento exponencial se observaron también al microscopio electrónico de barrido. Las células de la cepa parental presentaron el mismo aspecto bacilar descrito anteriormente y aparecieron tanto de forma individual como en parejas en diferentes estadios de la división celular (Fig. 3.4A). Por el contrario, todos los mutantes *tol-oprL* crecieron formando largas cadenas, en las que las células eran a menudo más cortas que las de la cepa silvestre, lo que corroboraba las observaciones realizadas al microscopio óptico (Fig. 3.4B-F). Los filamentos estaban formados por unidades celulares definidas, y la mayoría de ellas parecían estar en una fase muy avanzada del proceso de división celular (Fig. 3.4B-F). Los tabiques de septación entre células se distinguían con facilidad, aunque en ocasiones no se apreciaba ninguna señal externa de separación entre ellas (Fig. 3.4B-F). Una diferencia destacable entre los mutantes *P. putida tolQ*, *tolR* y *tolA*, y los mutantes *P. putida* BX y PX fue que los primeros presentaron pequeñas evaginaciones de membrana en la superficie celular (Fig. 3.4B-D), mientras que éstas solo aparecieron ocasionalmente en los segundos (Fig. 3.4E y F).

Por último, mediante microscopía electrónica de transmisión, se analizó la ultraestructura de *P. putida* KT2440 y de los mutantes *tol-oprL* en fase de crecimiento exponencial. Las células de la cepa parental presentaron un aspecto homogéneo y la morfología característica del género *Pseudomonas* (Fig. 3.5A). Las células de las cepas mutantes presentaron un aspecto similar a las de la cepa silvestre excepto por la presencia ocasional de filamentos celulares que se observaron cuando el plano de corte coincidía adecuadamente (Fig. 3.5B). Un análisis detallado de las células que formaban estos filamentos puso de manifiesto que éstas se encontraban en un estadio bastante avanzado del proceso de división celular, confirmando las observaciones previas realizadas al microscopio electrónico de barrido. En la Figura 3.5C se muestra la zona de separación entre dos células de un filamento, observándose como las membranas interna y externa así como el periplasma, aparecen íntegras y bien definidas, sin alteraciones estructurales apreciables.

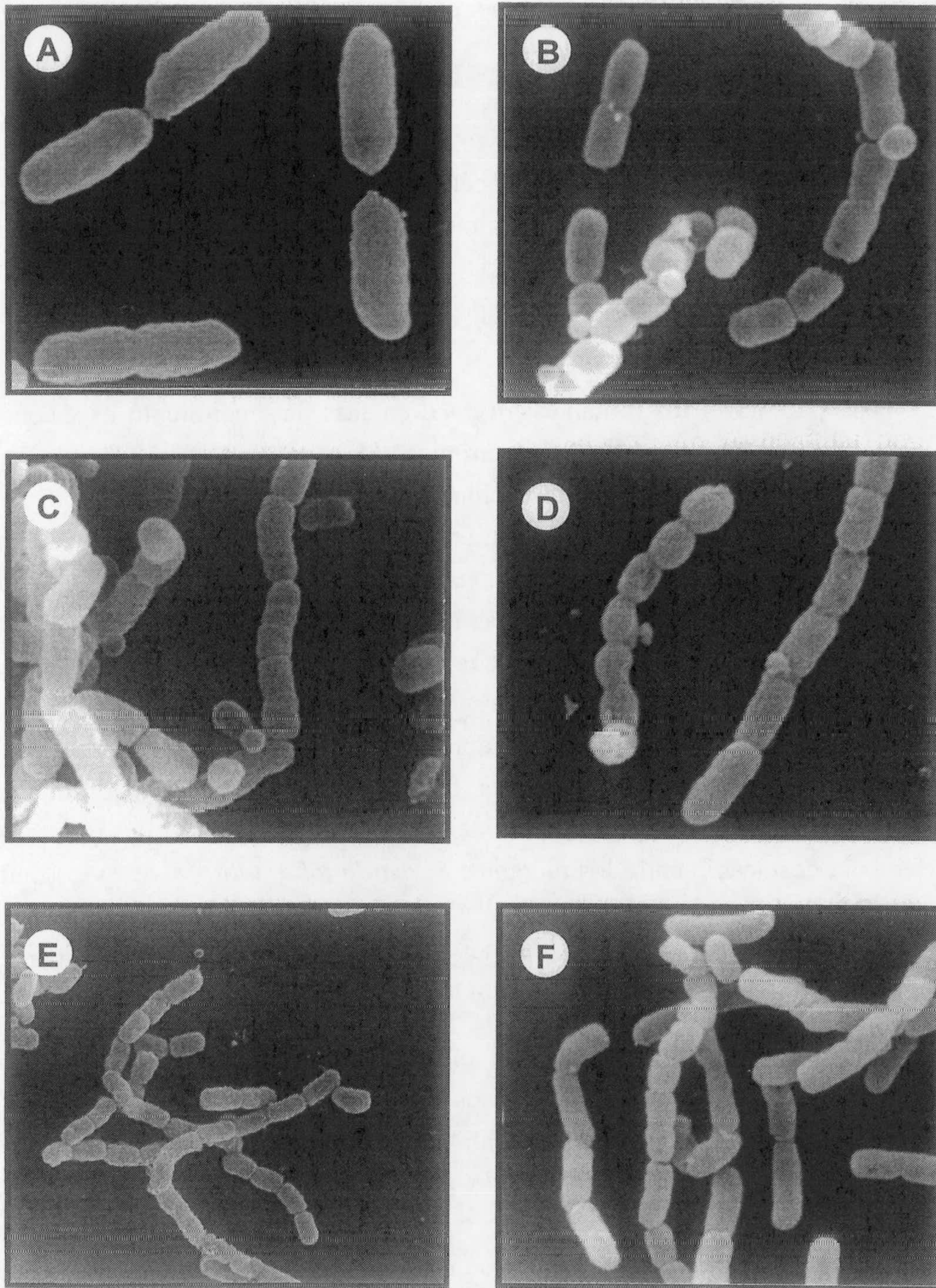


Figura 3.4. Microscopía electrónica de barrido de células de *P. putida* KT2440 y de algunos de los mutantes *tol-oprL*. Las células se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5. Entonces se prepararon como se describe en el apartado 11.3 de la sección *Materiales y Métodos*, y se observaron al microscopio electrónico de barrido. (A) KT2440. Aumentos: x15.000. (B) Q Ω . Aumentos: x10.000. (C) R Ω . Aumentos: x10.000. (D) A Ω . Aumentos: x10.000. (E) BX. Aumentos: x5.000. (F) PX. Aumentos: x7.000.

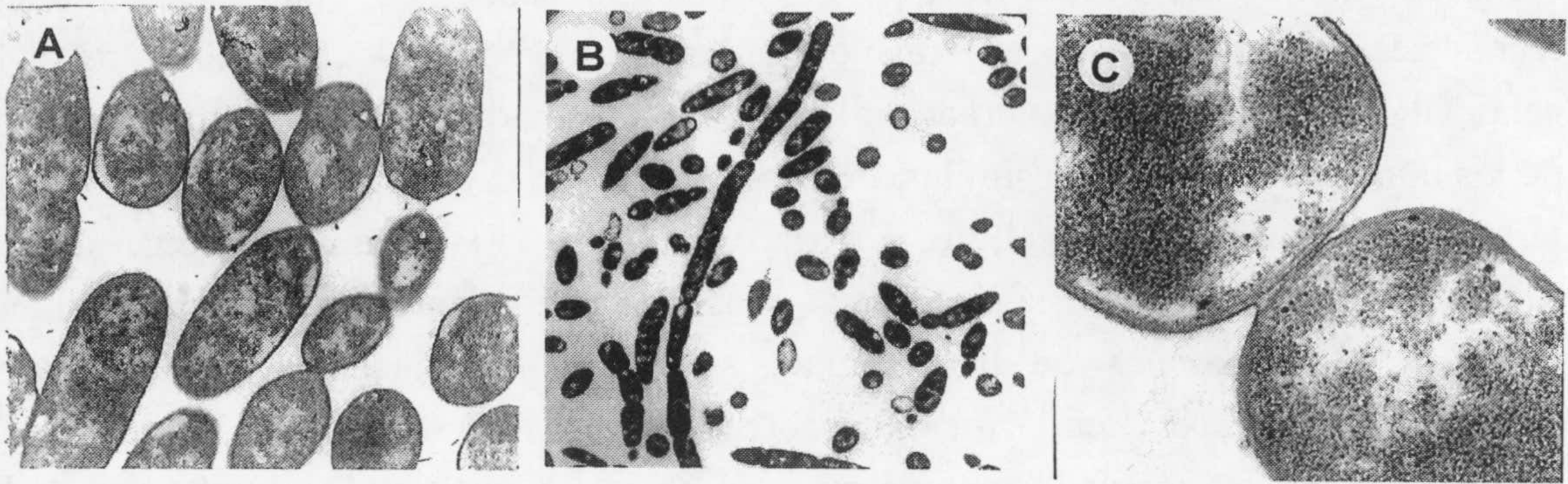


Figura 3.5. Microscopía electrónica de transmisión de *P. putida* KT2440 y de algunos de los mutantes no polares en los genes *tol-oprL*. Las células se cultivaron en medio LB líquido y se recogieron en fase de crecimiento exponencial. Después se prepararon como se describe en el apartado 11.2 de la sección *Materiales y Métodos* y se observaron al microscopio electrónico de transmisión. (A) KT2440. Aumentos: x16.000. (B) QX. Aumentos: x3.000. (C) Detalle del tabique de septación entre dos células de *P. putida* PX pertenecientes a un filamento celular. Aumentos: x50.000.

3. LIBERACIÓN DE ENZIMAS PERIPLÁSMICOS AL MEDIO EXTRACELULAR

La liberación de enzimas periplásmicos fue uno de los primeros fenotipos descritos para los mutantes *tol-pal* de *E. coli* (Bernadac *et al.*, 1998; Fognini-Lefebvre *et al.*, 1987; Lazzaroni y Portalier, 1992). Para estudiar si los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* también presentaban dicho fenotipo, primero se transfirió el plásmido pJB3Km1 mediante conjugación tripartita desde *E. coli* JM109 a *P. putida* KT2440 y a *P. putida* QX, RX, AX, BX y PX. Este plásmido porta el gen *bla* que codifica la enzima periplásmica β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina y piperacilina, entre otros antibióticos β -lactámicos. Después, se analizó mediante transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa e inmunodetección, la presencia de la enzima β -lactamasa en la fracción sobrenadante de cultivos de la cepa silvestre y de los mutantes no polares en los genes *tol-oprL* de *P. putida* que portaban el plásmido pJB3Km1. Los cultivos se recogieron en fase de crecimiento exponencial para evitar en lo posible las interferencias debidas a la lisis celular que ocurre en fases posteriores del crecimiento. En primer lugar, se analizó la fracción sobrenadante de los cultivos celulares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y posterior tinción de plata. En los sobrenadantes de las cepas mutantes se pudieron observar diferentes bandas de proteína que no estaban presentes en el sobrenadante de la cepa parental (Fig. 3.6A). Además, las cepas mutantes QX, RX, AX, BX y PX liberaron β -lactamasa al medio extracelular,

como demostraba el hecho de que un anticuerpo específico contra esta proteína reconociese un producto de un tamaño similar al esperado (29 kDa) (Fig. 3.6B). La cantidad de β -lactamasa encontrada en la fracción sobrenadante de los cultivos celulares de los mutantes *tol-oprL* fue similar. Por el contrario, en la cepa silvestre no se observó la liberación de esta enzima al medio extracelular (Fig. 3.6B). Para comprobar si dicha liberación era específica de la fracción de proteínas periplásmicas o si era un resultado indirecto de fenómenos de lisis celular, se estudió la presencia de la proteína citoplásmica RpoS (σ^{38}) en la fracción sobrenadante de dichos cultivos. No se observó la presencia de este marcador citoplásmico en el medio extracelular de ninguna de las cepas (no mostrado).

Por otro lado, también se había descrito que en *E. coli*, además de proteínas periplásmicas, los mutantes *tol-pal* liberaban al medio extracelular vesículas de membrana que contenían proteínas de membrana externa (Bernadac *et al.*, 1998). Para estudiar si los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* mostraban un fenotipo similar, la fracción sobrenadante de cultivos celulares de la cepa parental y de los mutantes *tol-oprL*, se analizó mediante transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección con un anticuerpo monoclonal generado contra la proteína de membrana externa OprF de *P. aeruginosa*, que también reconocía dicha proteína en *P. putida*. Mientras que en el sobrenadante de la cepa silvestre no se detectó la presencia de esta proteína, en los sobrenadantes de los cultivos celulares de los mutantes *tol-oprL* el anticuerpo MA7-2 (anti-OprF) reaccionó contra una proteína de 42 kDa (Fig. 3.6C). El tamaño del producto detectado fue similar al esperado para la proteína OprF de *P. putida*. Además, también se analizó la presencia de la lipoproteína de membrana externa OprL de *P. putida* en dichos sobrenadantes con ayuda del anticuerpo monoclonal MA1-6 generado contra esta proteína de *P. aeruginosa* y que reconoce específicamente a la proteína OprL de *P. putida*. Al contrario de lo que ocurría en el caso de los mutantes *tol-pal* de *E. coli*, la proteína OprL no se detectó en la fracción sobrenadante de los mutantes *tol-oprL* (no mostrado).

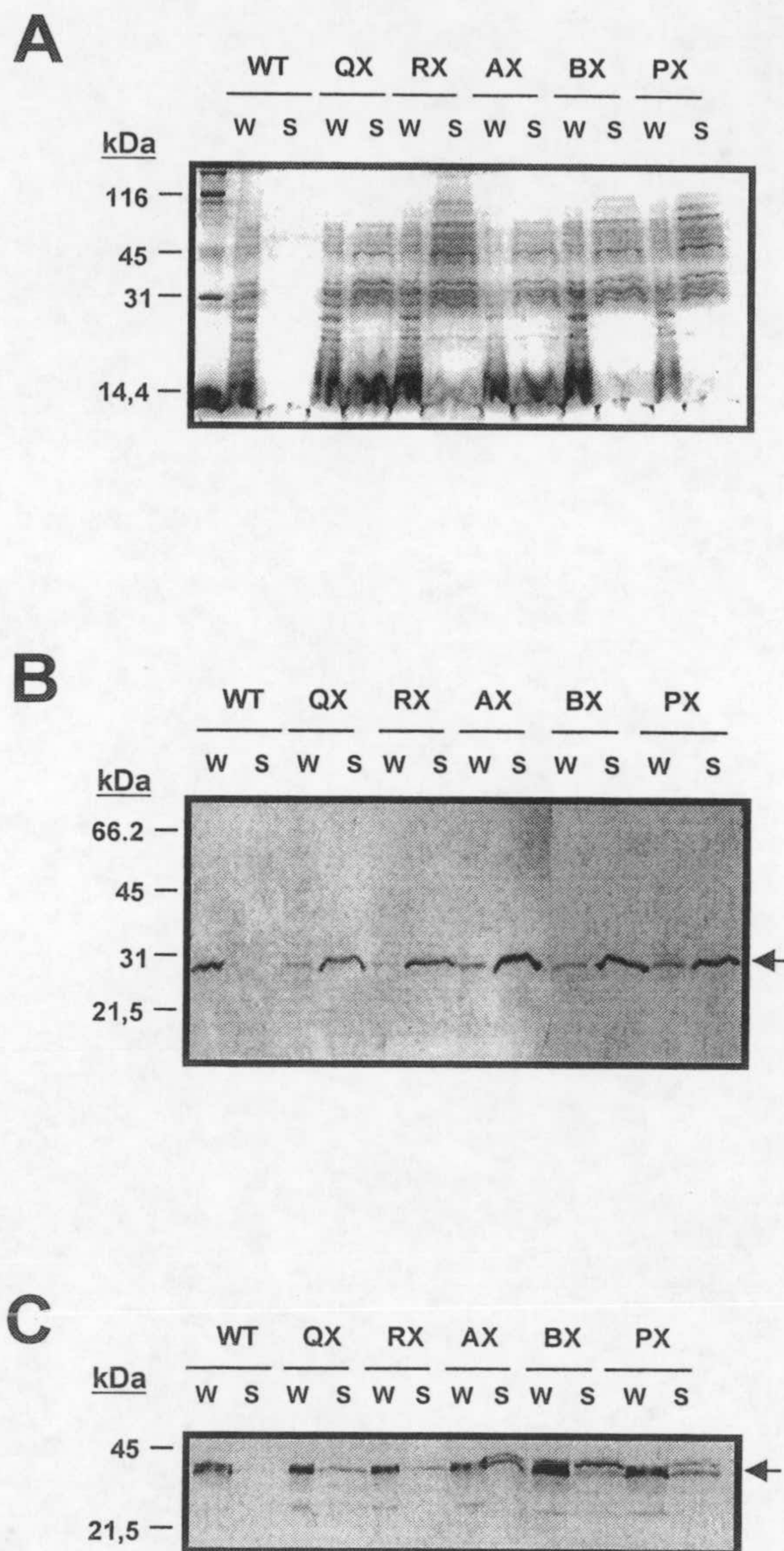
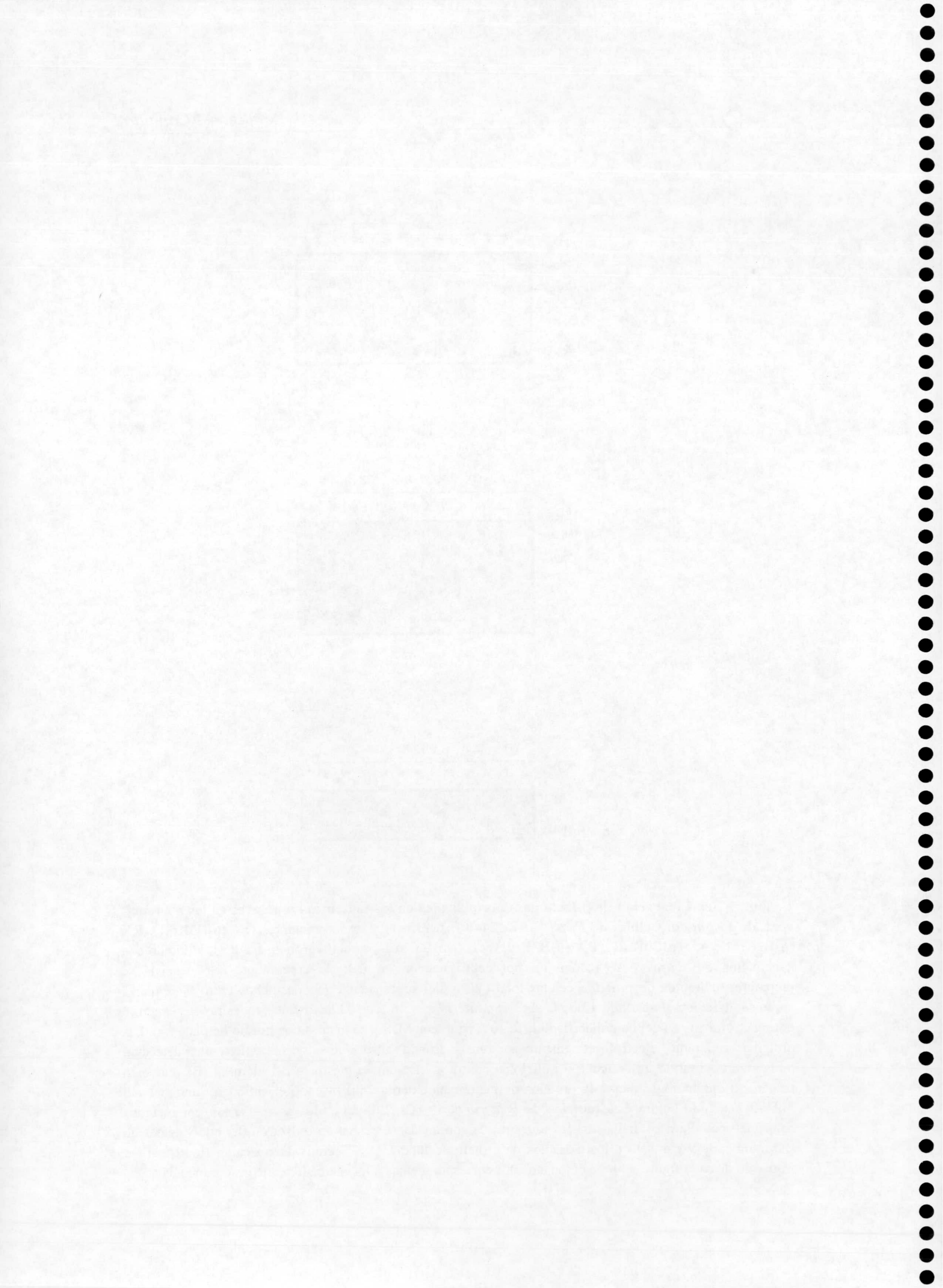


Figura 3.6. Liberación de β -lactamasa periplásmica en los mutantes no polares en los genes *tol-oprL* de *P. putida*. Células de *P. putida* KT2440 (pJB3Km1) y de los mutantes QX (pJB3Km1), RX (pJB3Km1), AX (pJB3Km1), BX (pJB3Km1) y PX (pJB3Km1), se cultivaron en medio LB líquido con kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se recogieron por centrifugación en fase de crecimiento exponencial. Se prepararon extractos de proteína celular total (W) y del sobrenadante (S) de dichos cultivos celulares como se indicó en el apartado 13 de la sección *Materiales y Métodos*. Las distintas muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (p/v) con SDS y se tiñeron con nitrato de plata (A). Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a nitrocelulosa y se realizó una detección inmunológica usando un anticuerpo policlonal contra la enzima periplásmica β -lactamasa (B). También se detectó inmunológicamente la proteína de membrana externa OprF usando el anticuerpo monoclonal MA7-2 generado contra esta proteína de *P. aeruginosa* (C). Los revelados se realizaron por métodos colorimétricos. Para el análisis de las muestras de sobrenadante celular se utilizaron 0,5 equivalentes de $\text{DO}_{660}\text{-ml}/\text{calle}$ y para el de los extractos de proteína celular total 0,3 equivalentes/calle. En el margen izquierdo de cada figura se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular.



Capítulo II

ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *tol-oprL* DE *Pseudomonas putida*

RESUMEN

Mediante el análisis de fusiones transcripcionales de los genes *tol-oprL* de *P. putida* al gen *lacZ* de *E. coli*, se determinó que éstos estaban organizados en dos unidades transcripcionales: *orf1-tolQ-tolR-tolA-tolB* bajo el control del promotor P_1 , y *oprL-orf2* bajo el control del promotor P_L . Estos resultados se completaron mediante análisis de RT-PCR y estudios de expresión en mutantes polares en cada uno de los genes *tol*. Los sitios de iniciación de la transcripción de estas dos unidades transcripcionales se determinaron mediante análisis de extensión de ARN a partir de cebadores específicos. El sitio de iniciación de la transcripción de la unidad transcripcional *oprL-orf2* se localizó dentro del gen *tolB*. Las regiones -10 y -35 de dicho promotor presentaron gran similitud con las secuencias consenso definidas para los promotores reconocidos por el factor de transcripción σ^{70} . El sitio de iniciación de la transcripción de *orf1-tolQ-tolR-tolA-tolB* se localizó 91 pb corriente arriba del codón iniciador del gen *orf1* y también presentó secuencias con las características típicas de un promotor reconocido por el factor de transcripción σ^{70} . Por otro lado, se analizó la expresión de los genes *tol* en distintas condiciones de crecimiento, encontrándose que la expresión de estas proteínas dependía de la fase de crecimiento, siendo mayor en fase exponencial que en estacionaria. Además, el análisis de fusiones traduccionales de los genes *tol-oprL* al gen *lacZ* demostró que la expresión de los genes *tolA* y *orf2* era dependiente de la traducción previa del gen adyacente situado corriente arriba (*tolR* y *oprL*, respectivamente).

La organización transcripcional de los genes *tol-oprL* se ha estudiado principalmente en *E. coli* y *P. aeruginosa*. En *E. coli*, basándose en el análisis de diversas fusiones transcripcionales, se ha propuesto la existencia de dos regiones promotoras: P₁ y P_B, la primera estaría localizada delante del gen *orf1* y la segunda delante de *tolB*, aunque el mensajero producido a partir del primer promotor abarcaría todo el conjunto de genes (Vianney *et al.*, 1996). Se ha estimado que el promotor P_B contribuye al 70% y P₁ al 30%, de la transcripción de los genes *tolB*, *pal* y *orf2*. Además, también se ha demostrado la existencia de acoplamiento traduccional entre los genes *tolQ* y *tolR*, que están separados por 3 pb (Vianney *et al.*, 1996). En el caso de *P. aeruginosa*, también mediante el análisis de diversas fusiones transcripcionales, se ha propuesto la existencia de 3 promotores: P₁, P_B y P_P, situados delante de los genes *orf1*, *tolB* y *oprL*, respectivamente (Duan *et al.*, 2000). En la agrupación génica *tol-oprL* de *P. aeruginosa* sólo se ha identificado una secuencia terminadora localizada corriente abajo del gen *orf2*, pero ninguna entre los dos primeros operones (entre los genes *tolA* y *tolB*). Por esto, y por el resultado positivo obtenido de la amplificación de la región que se encuentra entre los genes *tolA* y *tolB*, y *tolB* y *oprL*, respectivamente, mediante ensayos de RT-PCR, se ha sugerido que en *P. aeruginosa* a partir del promotor P₁ se produciría un mensajero que abarcaría todo el conjunto de genes, y a partir de P_B también se expresarían los genes *oprL* y *orf2* (Duan *et al.*, 2000). En *H. influenzae* NTHI, se ha estudiado solamente la expresión del gen *pal*, y se ha propuesto que el punto de iniciación de la transcripción de este gen se localizaría al final de la región codificante de *tolB* (Sen *et al.*, 1996).

En *P. putida* KT2440, Rodríguez-Herva y Ramos (comunicación personal) habían realizado diversos intentos para localizar posibles promotores en la agrupación génica *tol-oprL* mediante análisis de extensión de ARNm a partir de un cebador, pero los resultados obtenidos no habían permitido definir con claridad las posibles regiones promotoras. Por tanto, al inicio de este trabajo no se conocía la organización estructural y funcional de los genes *tol-oprL* de *P. putida* KT2440. Por otro lado, los trabajos disponibles sobre el estudio de la organización génica y transcripcional de los sistemas *tol-pal(oprL)* de otras bacterias se habían realizado a partir de los genes clonados en plásmidos, lo cual conducía a interpretaciones incorrectas (Duan *et al.*, 2000; Lafontaine y Sokol, 1998) y no permitía establecer de manera fiable la organización transcripcional de las mismas. Por todos estos motivos, en este trabajo se decidió estudiar la organización transcripcional de los genes *tol-oprL* de *P. putida* y definir con precisión la localización de sus regiones promotoras.

1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS OprL Y TolA de *P. putida* KT2440.

Como primera aproximación para estudiar la organización transcripcional de los genes *tol-oprL* de *P. putida*, se analizó la expresión de las proteínas OprL y TolA. Para ello se aprovechó tanto la disponibilidad de anticuerpos dirigidos contra estas proteínas como de los mutantes *tol::ΩKm*, que llevan una mutación polar por inserción cromosómica de un interposón con paradas transcripcionales, en los distintos genes *tol* (ver Capítulo I). En primer lugar se examinó la expresión de la proteína OprL en la cepa silvestre y dichos mutantes. Para ello, cultivos celulares de la cepa silvestre y de los diferentes mutantes *tol::ΩKm* se recogieron en fase de crecimiento exponencial y se analizó, mediante transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa e inmunodetección con el anticuerpo MA1-6, la presencia de la proteína OprL en los extractos celulares. La cantidad de proteína OprL detectada en los mutantes QΩ, RΩ y AΩ fue similar, aunque menor que la cantidad de proteína detectada en la cepa parental (Fig. 4.1). Sin embargo, la cantidad de proteína OprL detectada en el mutante BΩ fue considerablemente menor que en la cepa parental (Fig. 4.1). Dado que en *E. coli* se ha demostrado que la proteína Pal (la equivalente a OprL en enterobacteriáceas) interacciona con TolB (Bouveret *et al.*, 1995; 1999), existía la posibilidad de que la menor cantidad de proteína OprL observada en el mutante BΩ se debiese a una cierta inestabilidad de la proteína OprL por la ausencia de TolB. Para descartar esta posibilidad, se analizó la expresión de la proteína OprL en la cepa *P. putida* BX, que lleva una mutación no polar en el gen *tolB*. El nivel de expresión de OprL en el mutante *tolB::xylE* fue comparable al de la cepa silvestre (Fig. 4.1), lo que indicaba que la menor cantidad de proteína OprL detectada en el mutante BΩ no se debía a la ausencia de TolB.

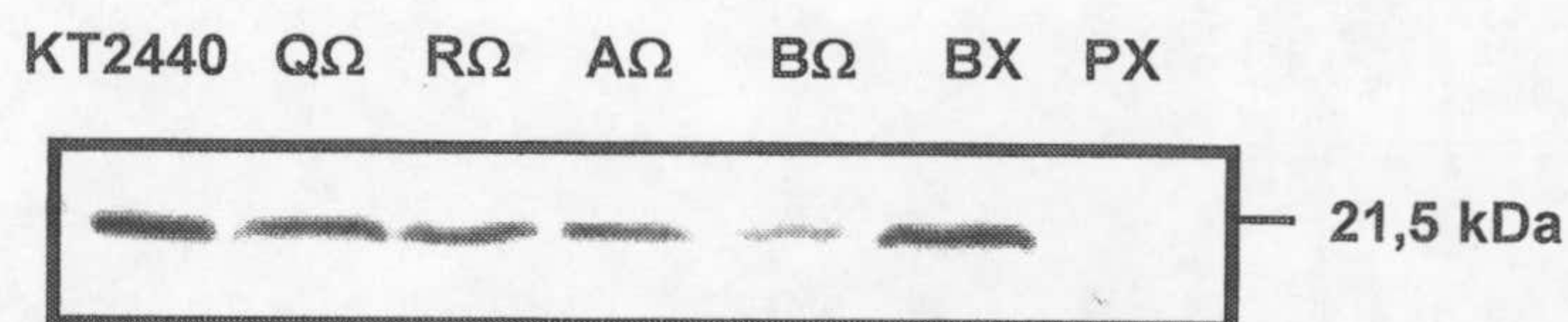


Figura 4.1. Inmunodetección de OprL en extractos de proteína celular total de *P. putida* KT2440 y de diferentes mutantes *tol-oprL*. Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes QΩ, RΩ, AΩ, BΩ, BX y PX se cultivaron en medio LB líquido, y se recogieron por centrifugación en fase de crecimiento exponencial. Se prepararon extractos de proteína celular total de dichos cultivos celulares como se indicó en el apartado 12.1 de la sección *Materiales y Métodos*. Aproximadamente 0,3 equivalentes de DO₆₆₀-ml de cada una de las muestras se cargaron en cada calle del gel. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% (p/v) con SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La proteína OprL se detectó inmunológicamente usando el anticuerpo monoclonal MA1-6. El revelado se realizó por métodos colorimétricos. En el margen derecho de la figura se indica la posición del marcador de peso molecular de 21,5 kDa

Estos resultados sugerían que el gen *oprL* no se transcribía a partir de un único promotor, y que una parte de su expresión se debía a un promotor situado corriente arriba del sitio *Bgl*III en *tolB* donde está insertado el interposón en el mutante BΩ. Sin embargo, también podrían indicar que el promotor del gen *oprL* está localizado cerca del sitio *Bgl*III en *tolB*, o que la región de ADN entorno a ese sitio de restricción influye en la expresión a partir del promotor del gen *oprL*.

Por otro lado, también se estudió la expresión de la proteína TolA de *P. putida* KT2440 en los diferentes mutantes polares y no polares en los genes *tol-oprL*. Los cultivos celulares en medio LB líquido de cada una de las cepas se recogieron en fase de crecimiento exponencial, y se analizó la expresión de TolA mediante ensayos de inmunodetección sobre membrana de nitrocelulosa usando un anticuerpo policlonal generado contra dicha proteína. Las cepas *P. putida* KT2440, BX, BΩ y PX presentaron cantidades similares de proteína TolA (Fig. 4.2). Sin embargo, TolA no se detectó en los mutantes polares QΩ y RΩ que portan una inserción cromosómica del interposón Ω-Km en los genes *tolQ* y *tolR*, respectivamente (Fig. 4.2). En principio este resultado sugería que al menos los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA* se transcribirían a partir de un mismo promotor. Sin embargo, la proteína TolA tampoco se detectó en los mutantes no polares *P. putida* QX y RX, en los que un fragmento del gen *tolQ* o *tolR*, respectivamente, se ha reemplazado por el gen indicador *xyle* (Fig. 4.2). El hecho de que TolA no se detecte en dichos mutantes podría deberse a que la proteína TolA sea inestable en ausencia de TolQ o TolR, y en este caso la ausencia de TolA en los mutantes *tolQ*::ΩKm y *tolR*::ΩKm no se podría interpretar como una evidencia de su co-transcripción. Pero también cabe la posibilidad de que exista acoplamiento traduccional entre los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA*. De esta forma, al evitar que se complete la traducción del ARNm de *tolQ* y *tolR* se estaría impidiendo también la traducción de *tolA*. Con el fin de esclarecer estos resultados, decidimos analizar ambas posibilidades tal y como se describe posteriormente.

2. IDENTIFICACIÓN DEL PUNTO DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE *oprL*.

Con el fin de determinar el punto de iniciación de la transcripción de *oprL*, se realizaron ensayos de extensión de ARN a partir de un cebador. Las cepas *P. putida* KT2440, *P. putida* (pJBTOLiΩKm) y el mutante *P. putida* BΩ se cultivaron en medio LB líquido a 30°C hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. En este punto se recogieron las células en fracciones alícuotas de 10 ml y se aisló en ARN total celular tal y como se indica en el apartado 15.1 de la sección *Materiales y Métodos*. Muestras

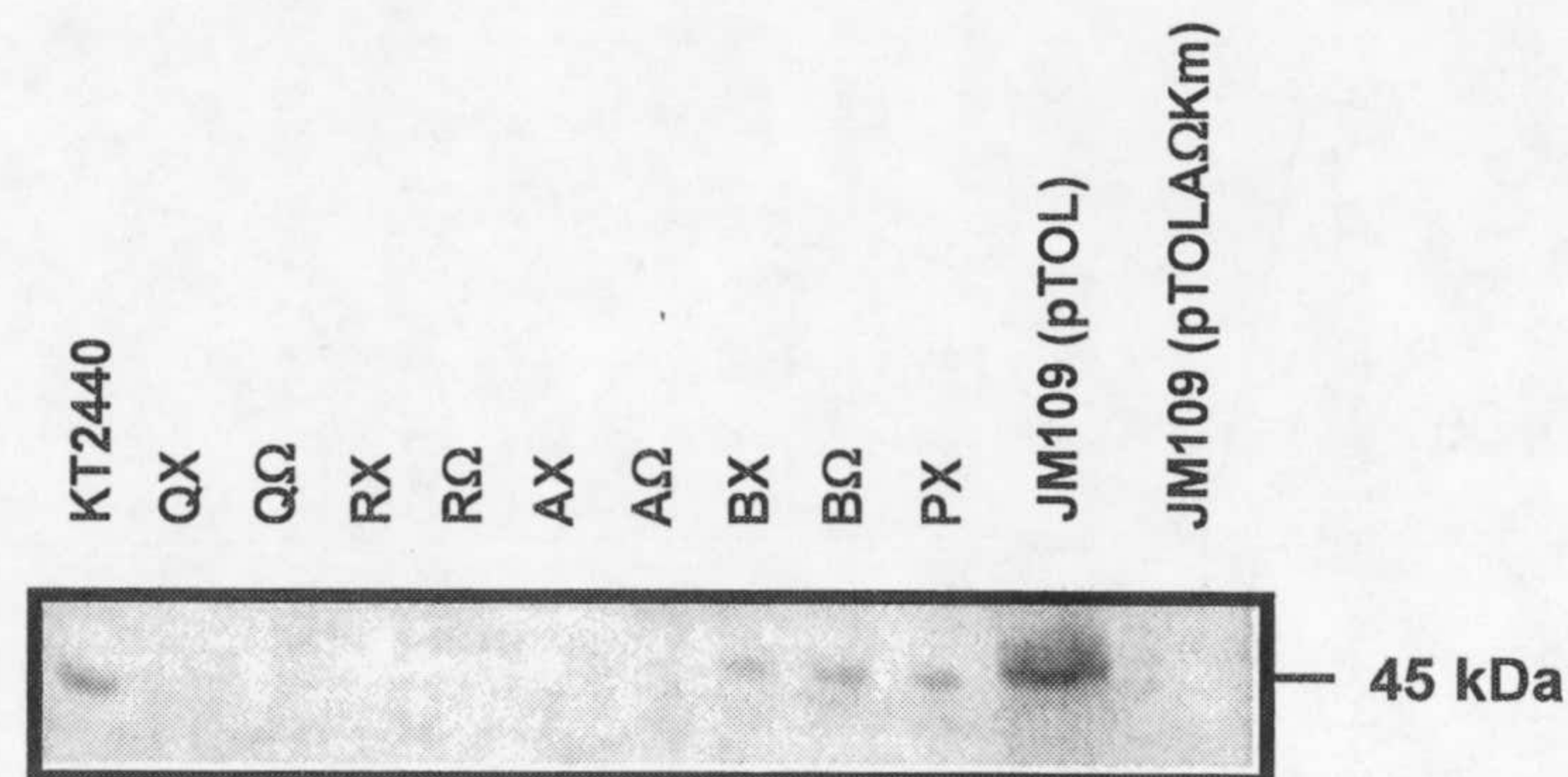


Figura 4.2. Inmunodetección de TolA en extractos de proteína celular total de *P. putida* KT2440 y de los mutantes *tol-oprL* polares y no polares. Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes QX, QΩ, RX, RΩ, AX, AΩ, BX, BΩ y PX se cultivaron en medio LB líquido (con kanamicina 50 µg/ml en el caso de los mutantes *tol::ΩKm*), y se recogieron por centrifugación en fase de crecimiento exponencial. Las cepas *E. coli* JM109 (pTOL) y *E. coli* JM109 (pTOLAΩKm) se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente. Se prepararon extractos de proteína celular total de dichos cultivos celulares como se indicó en el apartado 12.1 de la sección *Materiales y Métodos*. Aproximadamente 0,3 equivalentes de DO₆₆₀-ml de cada una de las muestras se cargaron en cada calle del gel. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (p/v) con SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La detección inmunológica se realizó usando un anticuerpo policlonal generado contra la proteína TolA de *P. putida*. Los revelados se realizaron por métodos colorimétricos. En el margen derecho de la figura se indica la posición del marcador de peso molecular de 45 kDa.

de cada una de las cepas, que contenían 25 µg de ARN total, se analizaron por extensión a partir del cebador PAL2 (complementario a la región codificante del ARNm de *oprL*) marcado radiactivamente en su extremo 5' (el marcaje del oligonucleótido y la extensión del ARN se realizaron como se describe en los apartados 16.1 y 16.2, respectivamente, de la sección *Materiales y Métodos*). La electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida del ADNc obtenido, se realizó en paralelo a una reacción de secuenciación del ADN de dicha región usando el mismo cebador. Basándonos en el tamaño del producto de ADNc obtenido de la muestra de ARN de la cepa parental, se localizó el punto de iniciación de la transcripción de *oprL* en un residuo de adenina situado 174 pb corriente arriba del codón de iniciación de la traducción de *oprL*, y 120 pb corriente arriba del codón de terminación de la traducción de *tolB* (Fig. 4.3).

En posición 5' con respecto al inicio de transcripción encontrado, se buscaron las secuencias consenso para los distintos tipos de promotores conocidos. En la región -10 del promotor de *oprL* se encontró la secuencia TAATCT que presentaba similitud con la secuencia consenso propuesta para los promotores reconocidos por el factor de transcripción σ^{70} de la ARN polimerasa. El grado de similitud de la región -35 (5'-CTGTTG-3') con la secuencia consenso reconocida por σ^{70} fue menor (Fig. 4.3). La

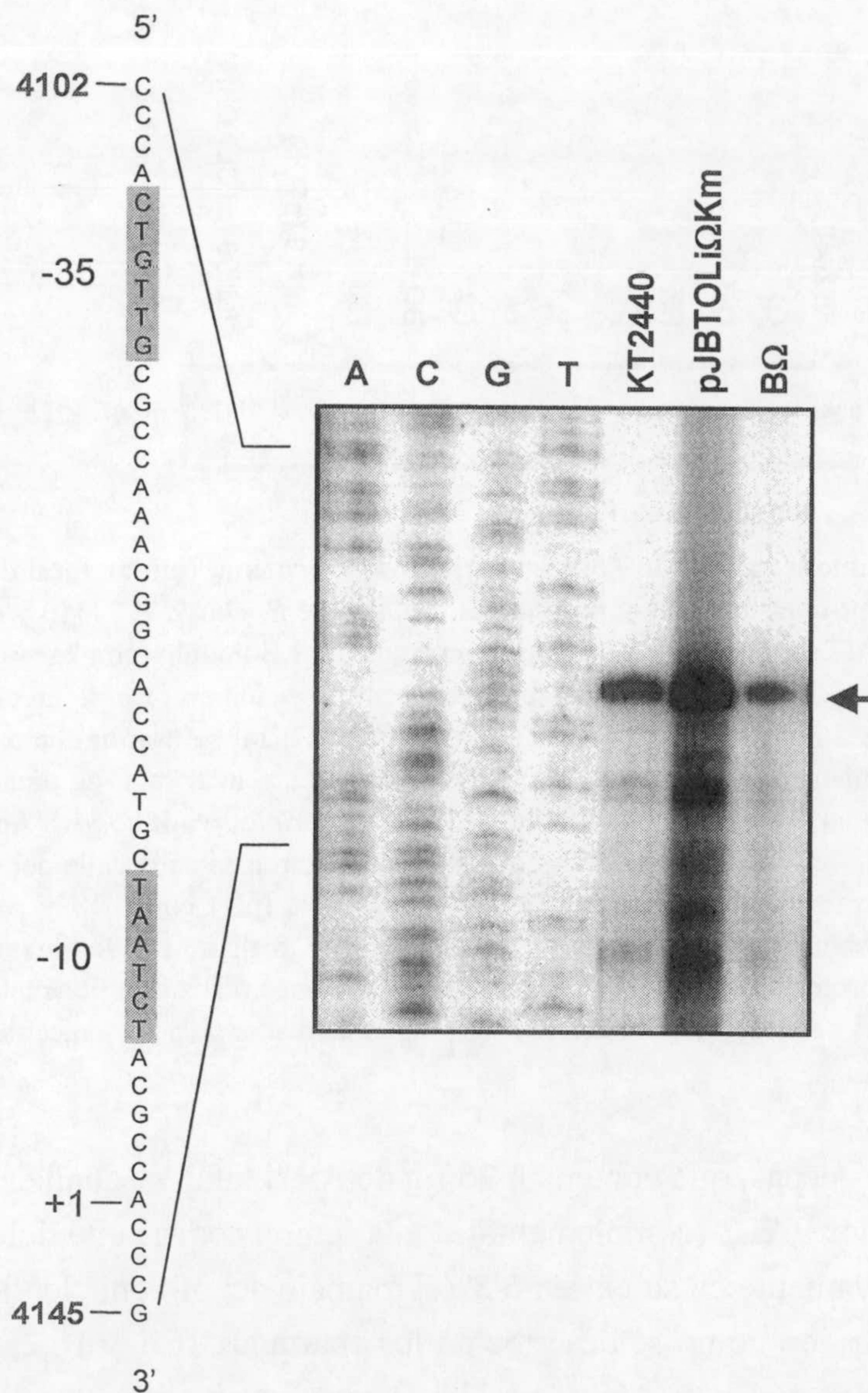


Figura 4.3. Determinación del punto de iniciación de la transcripción del gen *oprL* de *P. putida* KT2440. Células de *P. putida* KT2440, *P. putida* (pJBTOLiΩKm) y *P. putida* BΩ se cultivaron en medio LB líquido a 30°C y en agitación. Fracciones de 10 ml de cada uno de los cultivos se recogieron por centrifugación en fase de crecimiento exponencial ($DO_{660} \sim 0,5$) y se aisló el ARN total tal y como se describió en el apartado 15.1 de la sección *Materiales y Métodos*. La autorradiografía muestra los productos de ADNc obtenidos tras el análisis por extensión a partir del oligonucleótido PAL2 marcado radiactivamente en su extremo 5' de muestras que contenían 25 μ g de ARN total. El ADN del plásmido pTOL se secuenció con el cebador PAL2 y los productos de secuenciación (A, C, G y T) se usaron como patrón de peso molecular. La flecha indica el producto de ADNc derivado del punto de iniciación de la transcripción propuesto para *oprL*. En el margen izquierdo se muestra la secuencia de la región promotora de *oprL*, en la que se indican el punto de iniciación de la transcripción (+1) y las regiones -10 y -35 (secuencias sombreadas) propuestas para el promotor P_L . La numeración de la secuencia se corresponde con la de la Figura 3.1.

extensión del ARN aislado de la cepa *P. putida* portando el plásmido pJBTOLiΩKm con el cebador PAL2 (dicho plásmido lleva clonados todos los genes *tol-oprL* [ver Figura 3.2]), resultó en un producto de igual tamaño que el de la cepa parental. Además, de acuerdo con lo esperado, al aumentar el número de copias del ARNm de los genes *tol-oprL*, la intensidad de la banda de ADNc obtenida fue mayor que la obtenida con el ARN de la cepa silvestre. En ambos casos, no se detectaron productos de mayor tamaño que pudieran derivar de la degradación de un transcrito mayor, lo que sugería que *oprL* se transcribía principalmente a partir de este promotor. La región promotora recién definida se denominó P_L.

Para intentar determinar el motivo de la menor cantidad de proteína OprL observada mediante inmunodetección en el mutante *P. putida* BΩ, se realizó una extensión del ARN total de dicha cepa con el cebador PAL2. Como se muestra en la Figura 4.3, se obtuvo un producto del mismo tamaño que el de la cepa parental, pero la cantidad de ADNc obtenida con el ARN del mutante BΩ fue menor que en la cepa silvestre. Esto sugiere que la inserción del interposón de kanamicina en el sitio *Bgl*III de *tolB* ejerce una influencia negativa en la transcripción de *oprL* a partir del promotor P_L.

3. IDENTIFICACIÓN DE OTROS POSIBLES PROMOTORES DE LOS GENES *tol-oprL* DE *P. putida*.

Con objeto de estudiar la presencia de otros posibles promotores en los genes *tol-oprL* de *P. putida*, se realizaron ensayos de extensión de ARN total de la cepa silvestre con cebadores que hibridaban con cada uno de los genes de la agrupación génica *tol-oprL* (ver Tabla 2.5). Sólo se encontró un nuevo promotor, localizado corriente arriba del gen *orf1* (Fig. 4.4). Con el resto de los genes, en lugar de obtener una banda de ADNc definida, se observó la presencia de numerosos productos de extensión de gran tamaño consecuencia, probablemente, de la degradación de un transcrito de ARNm generado a partir de un promotor distante (no mostrado). En la extensión del ARN total de la cepa silvestre con el cebador OR3 marcado radiactivamente en su extremo 5', se obtuvo un producto de extensión que permitió situar el punto de iniciación de la transcripción de *orf1* en un residuo de timina localizado 91 pb corriente arriba del supuesto codón iniciador del gen *orf1* (Fig. 4.4). En las regiones -10 y -35 se encontraron secuencias que presentaban similitud con la secuencia consenso propuesta para los promotores dependientes del factor de transcripción σ^{70} (Fig. 4.4). Esta región promotora se denominó P₁. La extensión del ARN aislado de la cepa *P. putida* (pJBTOLiΩKm) con ese mismo oligonucleótido, resultó en un producto de igual tamaño que la cepa parental pero de mayor intensidad

como consecuencia del aumento en el número de copias de ARNm de los genes *tol-oprL* (Fig. 4.4). Estos resultados sugieren que los genes *orf1*, *tolQ*, *tolR*, *tolA* y *tolB* forman una unidad transcripcional que se expresa a partir de un único promotor localizado delante del gen *orf1*.

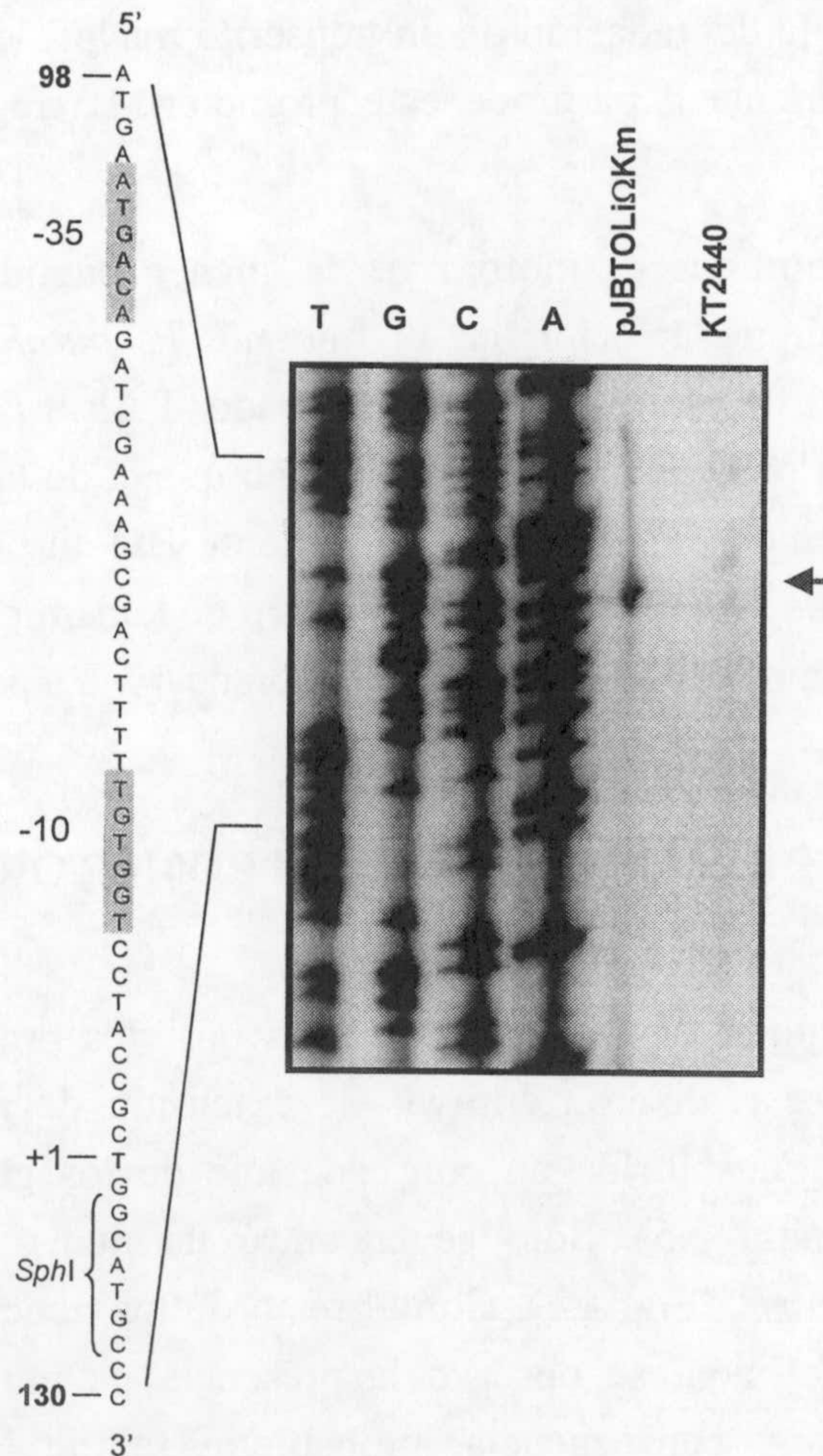


Figura 4.4. Determinación del punto de iniciación de la transcripción del gen *orf1* de *P. putida* KT2440. Células de *P. putida* KT2440 y *P. putida* (pJBTOLiΩKm) se cultivaron en medio LB líquido a 30°C con agitación hasta fase de crecimiento exponencial ($DO_{660} \sim 0,5$). Muestras de 25 µg de ARN total aislado de cada una de las cepas se extendieron con el cebador OR3 marcado radiactivamente en su extremo 5' como se describió en el apartado 16.1 de la sección *Materiales y Métodos*. Se secuenció, con ese mismo cebador, el ADN del plásmido pTOL, y los productos de secuenciación (A, C, G y T) se usaron como patrón de peso molecular. La flecha indica el producto de ADNc derivado del punto de iniciación de la transcripción de *orf1*. En el margen izquierdo se representa la secuencia de la región promotora de *orf1*, en la que se indica como +1 el punto de iniciación de la transcripción de *orf1*, y las regiones -10 y -35 (secuencias sombreadas) propuestas para el promotor P₁. En negrita se indica el codón de terminación de la traducción del gen *ruvB* dentro de la región -35. La numeración de la secuencia se corresponde con la de la Figura 3.1.

4. ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *tol-oprL* DE *P. putida* MEDIANTE RT-PCR.

Los resultados obtenidos de los experimentos de inmunodetección de las proteínas OprL y TolA, y de los ensayos de extensión de ARNm a partir de cebadores específicos, sugerían que la agrupación génica *tol-oprL* de *P. putida* está formada por dos unidades transcripcionales, *orf1-tolQ-tolR-tolA-tolB* y *oprL-orf2*. Con el fin de confirmar esta organización transcripcional y para estudiar en más detalle si existía solapamiento en la transcripción de estos dos operones (como ocurre con los genes *tol-pal[oprL]* de *E. coli* y *P. aeruginosa*) (Duan *et al.*, 2000; Vianney *et al.*, 1996) se realizaron ensayos de RT-PCR a partir del ARN total aislado de la cepa *P. putida* KT2440. En el ensayo se usaron parejas de oligonucleótidos enfrentados que hibridaban con el final y con el principio, respectivamente, de dos genes adyacentes de la agrupación *tol-oprL* (Fig. 4.5A). También se analizó la posible presencia de un ARNm que se extendiera desde del gen *orf2* hasta el gen *orf3*, o que apareciera como consecuencia de una terminación ineficiente en la transcripción del gen *ruvB* (localizado delante del gen *orf1*). No se amplificó ningún producto de ADNc cuando se usaron las parejas de oligonucleótidos que hibridaban con *ruvB* y *orf1*, o con *orf2* y *orf3*, respectivamente (Fig. 4.5B, calles 7 y 8). Estos resultados demostraban que el ARNm de los genes *tol-oprL* de *P. putida* estaba claramente delimitado por los genes *orf1* y *orf2*. Sin embargo, sí se detectaron productos de ADNc del tamaño esperado cuando se usaron el resto de las parejas de oligonucleótidos en el ensayo de RT-PCR (Fig. 4.5B). Particularmente interesante fue el resultado positivo obtenido de la amplificación de la región que se encuentra entre los genes *tolB* y *oprL* (Fig. 4.5B, calle 5). Este resultado sugiere que existe un ARNm que abarca toda la región *tol-oprL* desde el gen *orf1* hasta *orf2*, además de un segundo ARNm que se iniciaría delante del gen *oprL*. Según esto, una parte de la expresión del operón *oprL-orf2* se derivaría del promotor P₁ situado corriente arriba del gen *orf1*.

5. EFECTO DE LA FASE DE CRECIMIENTO Y DE LA CONCENTRACIÓN DE HIERRO EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *tol-oprL* DE *P. putida* KT2440.

En *P. aeruginosa*, se ha descrito que la expresión de los genes *tol-oprL* depende de la fase de crecimiento y de la concentración de hierro en el medio de cultivo (Duan *et al.*, 2000; Lafontaine y Sokol, 1998) Como primera aproximación en el estudio de la expresión de la proteína OprL de *P. putida*, se realizaron análisis de inmunodetección de la misma en extractos de proteína celular total preparados a partir de muestras

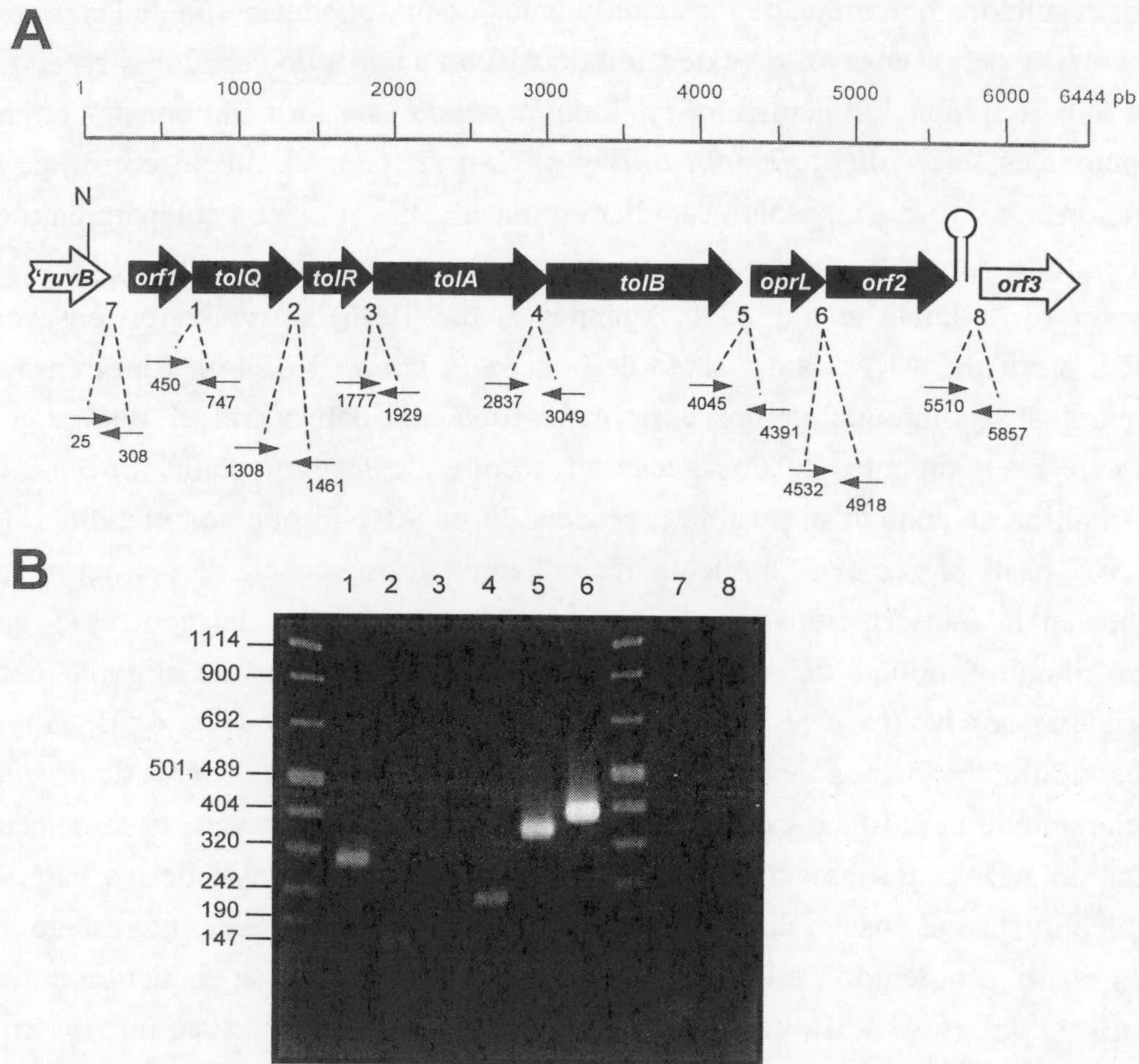


Figura 4.5. Organización de los genes *tol-oprL* en *P. putida* KT2440. **A.** Localización de los genes *tol-oprL* y de los oligonucleótidos usados para la amplificación del ARNm en el ensayo de RT-PCR. Los números debajo de los cebadores indican su posición en la secuencia de ADN de los genes *tol-oprL*. La numeración de la secuencia se corresponde con la de la Figura 3.1. **B.** Electroforesis del ADNc amplificado con los oligonucleótidos 450 y 747 (calle 1), 1308 y 1461 (calle 2), 1777 y 1929 (calle 3), 2837 y 3049 (calle 4), 4045 y 4391 (calle 5), 4532 y 4918 (calle 6), 25 y 308 (calle 7), 5510 y 5857 (calle 8). En el margen izquierdo se indican los tamaños correspondientes a los patrones de peso molecular, en pares de bases. Como control negativo se realizó la RT-PCR de muestras que contenían la misma cantidad de ARN total, de cebadores y de la enzima *Taq* polimerasa, pero sin la enzima transcriptasa reversa. En estas reacciones no se obtuvo ningún producto de amplificación (no mostrado).

recogidas en distintas fases del crecimiento. Cultivos celulares de la cepa silvestre y del mutante *P. putida* PX se recogieron en fase de crecimiento exponencial ($DO_{660} \sim 0,5$), en fase estacionaria temprana ($DO_{660} \sim 1$) y en fase estacionaria tardía ($DO_{660} \sim 4$), y se determinó la cantidad de proteína OprL mediante inmunodetección con el anticuerpo MA1-6. Como se muestra en la Figura 4.6, la expresión de *oprL* fue mayor en fase de crecimiento exponencial, disminuyendo progresivamente en fase estacionaria.

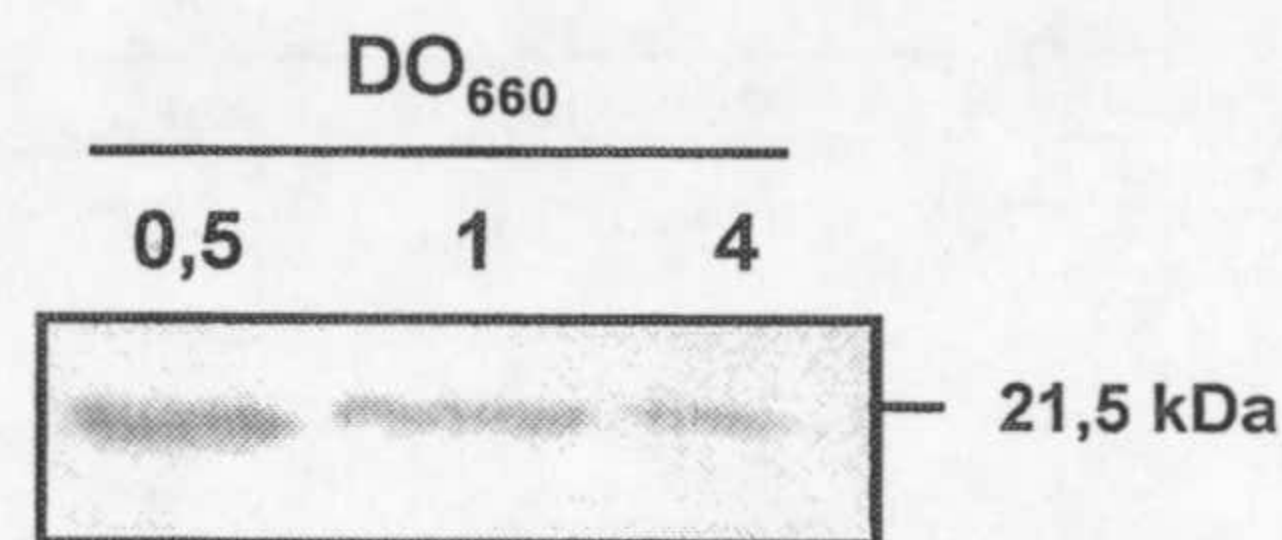
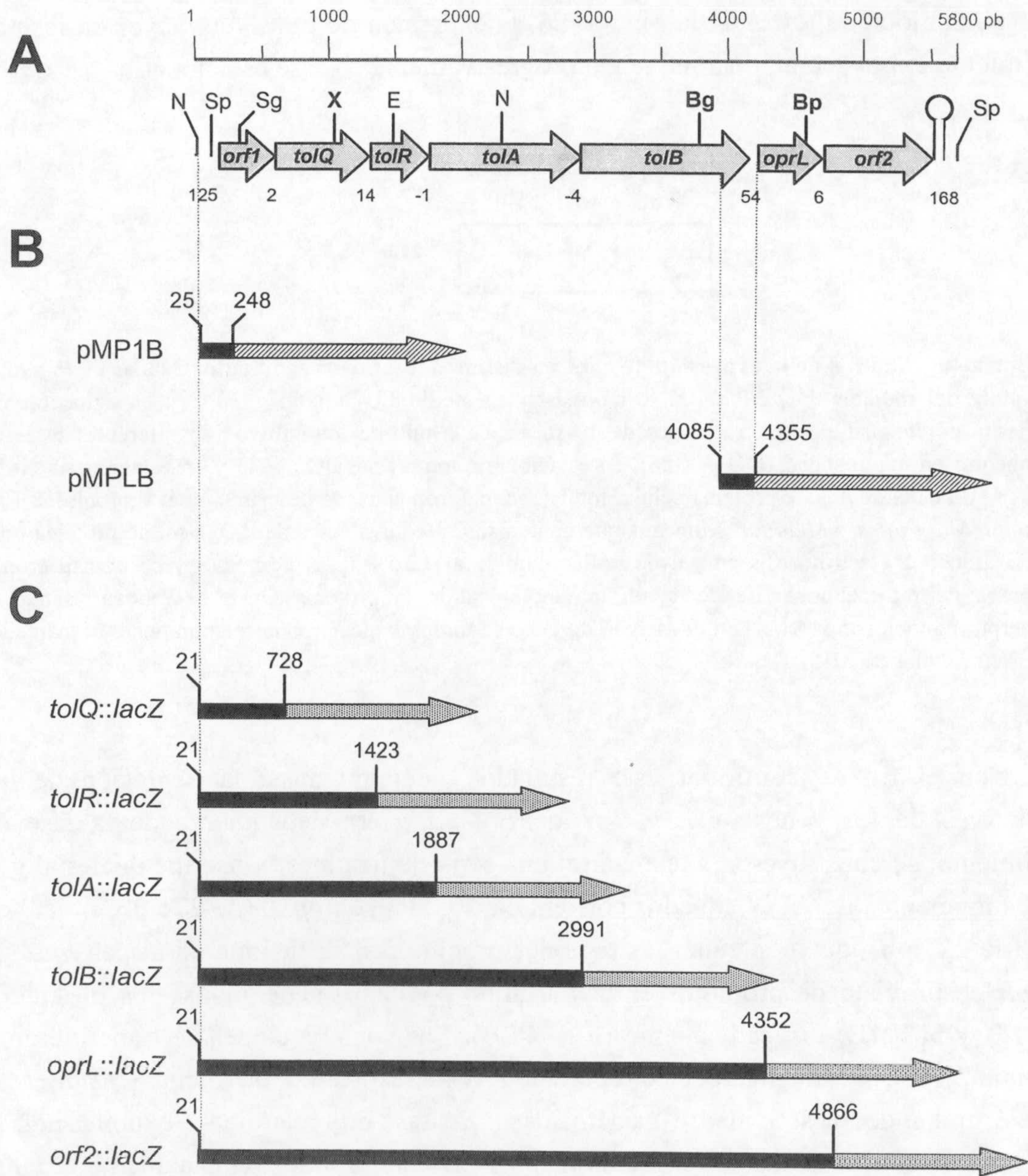


Figura 4.6. Análisis de la expresión de *oprL* en distintas fases de crecimiento. Células de *P. putida* KT2440 y del mutante *P. putida* PX se cultivaron en medio LB líquido a 30°C y en agitación. Se recogieron por centrifugación fracciones de 10 ml de cada uno de los cultivos en diferentes fases de crecimiento: en exponencial ($DO_{660} \sim 0,5$), en estacionaria temprana ($DO_{660} \sim 1$) y en estacionaria tardía ($DO_{660} \sim 4$). Los extractos de proteína celular total se prepararon como se describió en el apartado 12.1 de la sección *Materiales y Métodos*. Muestras que contenían 0,3 equivalentes de DO_{660} -ml de proteína total se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% (p/v) con SDS y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. La detección inmunológica de la proteína OprL se realizó usando el anticuerpo monoclonal MA1-6. En el margen derecho se indica la posición correspondiente al marcador de peso molecular de 21,5 kDa.

Con el fin de confirmar este resultado y determinar si la expresión de los promotores de los genes *oprL* y *orf1* de *P. putida* era dependiente de la fase de crecimiento, se construyeron y analizaron una serie de fusiones transcripcionales al gen *lacZ*. Fragmentos de ADN situados corriente arriba del gen *oprL* (de 271 pb) o del gen *orf1* (de 223 pb), que contenían las regiones promotoras, se fusionaron al gen *lacZ* de *E. coli* desprovisto de promotor en el plásmido pMP220, generándose los plásmidos pMPLB y pMP1B, respectivamente (Fig. 4.7B). Las construcciones se transfirieron a *P. putida* KT2440 mediante electroporación, y la expresión de dichas fusiones se analizó midiendo su actividad β -galactosidasa. En fase de crecimiento exponencial, la actividad β -galactosidasa de la fusión pMPLB fue de aproximadamente 20.000 unidades Miller, mientras que en fase estacionaria la actividad disminuyó hasta 15.000 unidades Miller (Fig. 4.8A). La expresión desde el promotor de *orf1*, cuantificada como actividad β -galactosidasa de la fusión pMP1B en células cultivadas en medio LB líquido, fue de aproximadamente 2,700 unidades Miller en fase de crecimiento exponencial, disminuyendo progresivamente a medida que se acercaba a la fase de crecimiento estacionaria (900 unidades Miller) (Fig. 4.8A). Estos resultados confirmaban los obtenidos previamente en el experimento de inmunodetección de OprL.



← **Figura 4.7. Mapa de la agrupación génica *tol-oprL* de *P. putida* KT2440 y de la posición de las fusiones transcripcionales y traduccionales al gen *lacZ*.** A. Mapa de la región de 5.800 pb del fragmento de ADN *NotI-SphI* del cromosoma de *P. putida* que contiene el conjunto de genes *tol-oprL*. Las flechas grises indican la posición de los genes *tol-oprL*, su tamaño y el sentido de su transcripción. También se indica la posición de un posible terminador transcripcional independiente del factor de terminación Rho ($\Delta G_0 = 19,2$ kcal/mol) corriente abajo del gen *orf2*. Los números debajo del mapa indican la distancia (en pb) que existe entre dos genes adyacentes (un número negativo significa que los genes solapan en la cantidad de pares de bases indicada). Sólo se indican los sitios de restricción relevantes. Los sitios únicos se indican en negrita. Los sitios de restricción se representan como: Bg, *BgIII*; Bp, *BlpI*; E, *EcoNI*; N, *NotI*; Sg, *SgrAI*; Sp, *SphI*; X, *XhoI*. B. Diagrama de las diferentes fusiones transcripcionales construidas para el estudio de los promotores de los genes *orf1* y *oprL*. Los rectángulos negros indican la posición de los fragmentos de ADN de los genes *tol-oprL*. Las flechas ralladas representan el gen *lacZ* sin promotor del plásmido pMP220. C. Diagrama de las fusiones traduccionales utilizadas en el estudio del acoplamiento traduccional entre los genes *tol-oprL*. Los rectángulos negros indican la posición de los fragmentos de ADN correspondientes a los genes *tol-oprL*. Las flechas punteadas indican el fragmento del gen *lacZ* del plásmido pMLB1034. En los tres esquemas, la posición 1 corresponde a la primera “G” del sitio de restricción *NotI* (GCGGCCGC) localizado corriente arriba del gen *orf1* (el número de acceso para la secuencia completa en la base de datos GenBank es X74218).

Por otro lado, dado que en *P. aeruginosa* se había demostrado que la expresión de los genes *oprL* y *tolQ-tolR-tolA* estaba regulada por hierro (Duan *et al.*, 2000; Lafontaine y Sokol, 1998; Ochsnel y Vasil, 1996), decidimos analizar si la concentración de hierro en el medio de cultivo ejercía un efecto similar sobre la expresión de los genes *oprL* y *orf1* de *P. putida*. La expresión de estos genes se analizó en células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pMPLB o el plásmido pMP1B cultivadas en medio mínimo M9 con alta concentración de hierro (50 μ M FeCl₃) o con bajo nivel de hierro por la adición del quelante de hierro EDDHA (400 μ g/ml). Al contrario de lo que ocurre en *P. aeruginosa*, donde la expresión del gen *oprL* y de los genes *tolQRA* disminuye en presencia de hierro, la expresión desde los promotores de los genes *oprL* y *orf1* de *P. putida* fue similar en medios con alta y baja concentración de hierro, tanto en fase de crecimiento exponencial (Fig. 4.8B) como en fase de crecimiento estacionaria (no mostrado).

6. ANÁLISIS DE FUSIONES TRADUCCIONALES DE LOS GENES *tol-oprL* de *P. putida* AL GEN *lacZ*.

El análisis de la secuencia de ADN corriente arriba del gen *tolA* de *P. putida* reveló la presencia de una posible estructura secundaria que podría formarse en la región de ARNm que abarca el codón de terminación del gen *tolR*, y la zona de unión al ribosoma y el codón de iniciación de la traducción del gen *tolA* (Fig. 4.9A). También se

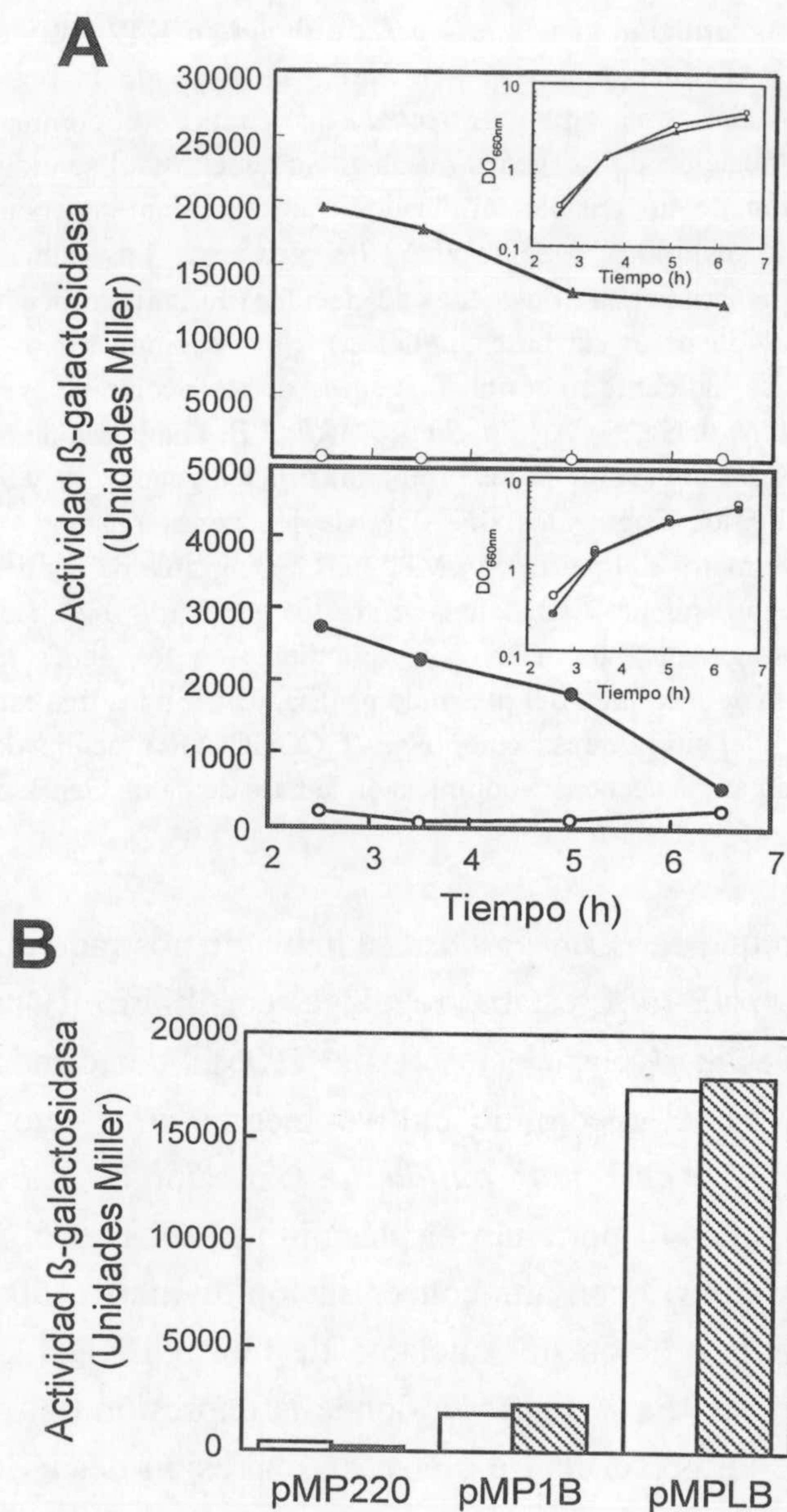


Figura 4.8. Efecto de la fase de crecimiento (A) y de la concentración de hierro (B) en la expresión de los genes *oprL* y *orf1* de *P. putida* KT2440. A. Células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pMPLB (triángulos cerrados) y pMP1B (círculos cerrados) se cultivaron en medio LB líquido con 20 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina a 30°C y con agitación. Se recogieron fracciones alícuotas de 100 μl del cultivo a distintas DO_{660} , con las que se determinó la actividad β -galactosidasa. Como control negativo se usaron células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pMP220 (círculos abiertos). B. Células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pMPLB o el plásmido pMP1B se cultivaron en medio mínimo M9 suplido con 50 μM de FeCl_3 (rallado) o con 400 $\mu\text{g/ml}$ de EDDHA (color blanco) y se determinó la actividad β -galactosidasa en fase de crecimiento exponencial. Células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pMP220 se usaron como control negativo. En el histograma se representan las medias de los valores obtenidos a partir de tres experimentos independientes.

predijo la existencia de otra posible estructura secundaria en la región de ARNm comprendida entre *oprL* y *orf2* (Fig. 4.9B). Si esas estructuras secundarias se formasen realmente *in vivo* en el ARNm, los genes *tolR* y *tolA*, y *oprL* y *orf2*, respectivamente, podrían estar acoplados traduccionalmente, siendo necesaria la traducción previa de *tolR* para que pueda traducirse adecuadamente *tolA*, y la de *oprL* para que *orf2* se traduzca de forma eficiente. Para estudiar esta posibilidad, se construyeron fusiones traduccionales de cada uno de los genes *tol-oprL* al gen '*lacZ* desprovisto de promotor y de sitio de unión al ribosoma (Fig. 4.7C), en el plásmido pMLB1034, y se determinó la actividad β -galactosidasa de cada una de estas fusiones traduccionales (Tabla 4.1). Los plásmidos con las diferentes fusiones se digirieron con enzimas de restricción que tenían una sola diana de corte en el gen inmediatamente adyacente a cada una de las fusiones. Dichos plásmidos se trataron con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa o con la enzima ADN polimerasa del fago T4 y posteriormente se ligaron sobre sí mismos con la enzima ADN ligasa del fago T4. La adición o delección de nucleótidos tras este tratamiento alteró la fase de lectura del gen donde se localizaba el sitio de restricción, provocando la aparición de un codón de terminación prematuro de la traducción. Mediante la medida de la actividad β -galactosidasa de cada una de las fusiones, se estudió el efecto que producía en cada uno de los genes el cambio de la fase de lectura en los genes situados corriente arriba. Tal y como se muestra en la Tabla 4.1, cuando no se produce la expresión de *tolR* por la presencia de un codón de terminación prematuro, la expresión de *tolA* disminuye drásticamente hasta un 1% con respecto al valor de la fusión control. Esto sugiere que la traducción de *tolA* depende de la traducción previa de *tolR*, el gen situado inmediatamente corriente arriba a *tolA*. En el caso de los genes *oprL* y *orf2* se obtuvo el mismo resultado. La aparición de un codón de terminación prematuro en el gen *oprL* ejercía un efecto polar sobre la expresión de *orf2*, reduciendo la actividad β -galactosidasa de la fusión *orf2::lacZ* hasta en un 95% (Tabla 4.1), lo cual sugería que estos genes también estaban acoplados traduccionalmente. La actividad β -galactosidasa de la fusión *tolB::lacZ* también fue menor (8%) que la de la fusión original cuando un interposón Ω -Km se insertó en el sitio *NotI* del gen *tolA* (plásmido pMLB-A Ω Km) (Tabla 4.1). Estos resultados confirmaban que los genes *orf1*, *tolQ*, *tolR*, *tolA* y *tolB* formaban una unidad transcripcional que se expresaba desde el promotor situado delante del gen *orf1*.

Por otro lado, dado que el experimento de RT-PCR sugería la existencia de un ARNm que se expresaría desde el promotor del gen *orf1* y que abarcaría todos los genes, desde *orf1* hasta *orf2*, decidimos cuantificar la contribución de este promotor a la expresión de cada uno de los genes *tol-oprL*, y particularmente a la expresión de *oprL* y *orf2*. Para eliminar la actividad del promotor P₁, se insertó el interposón Ω -Km en el

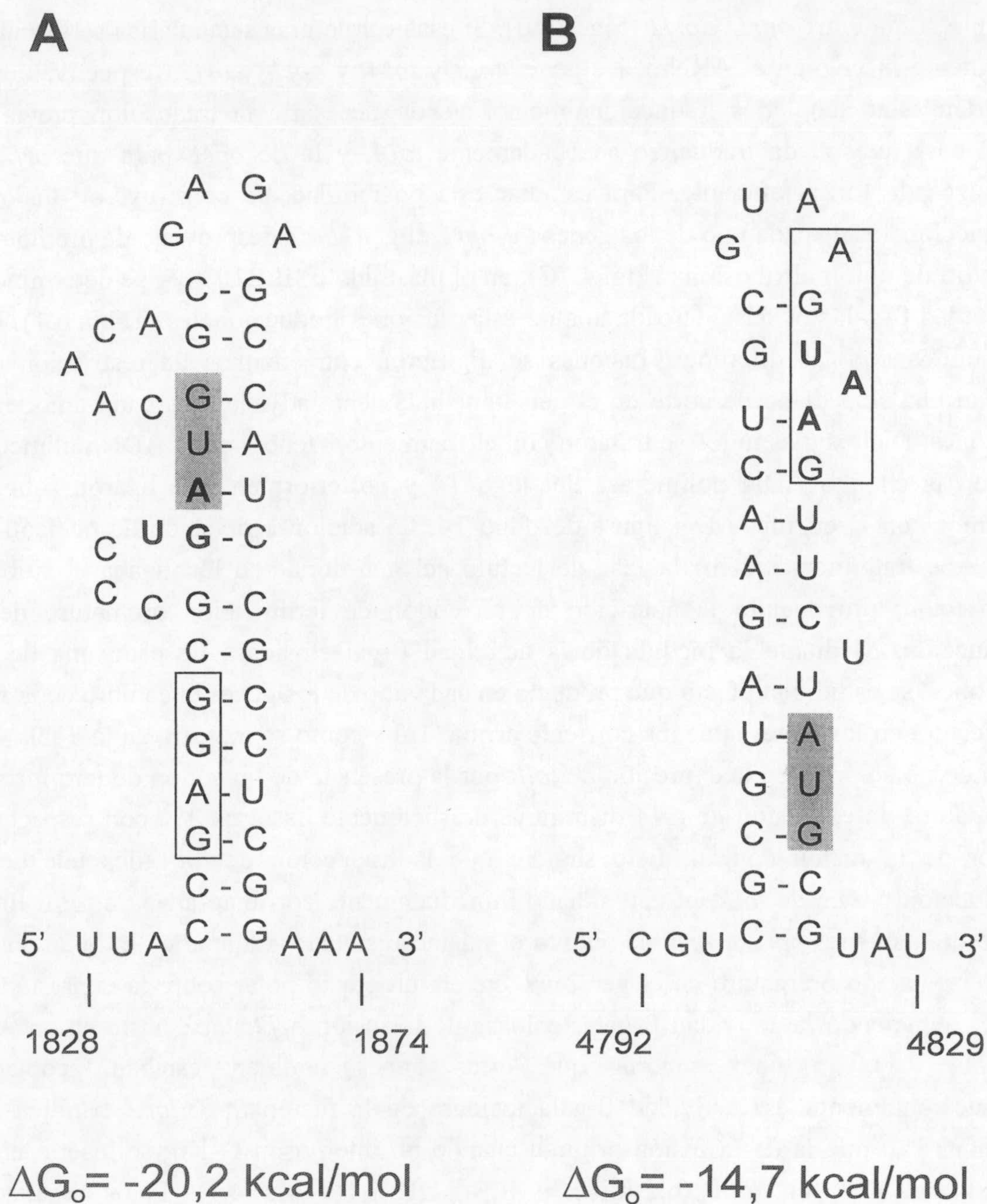


Figura 4.9. Esquema de las estructuras secundarias potenciales predichas en el ARNm de las regiones intergénicas *tolR-tolA* (A) y *oprL-orf2* (B). Las estructuras secundarias en el ARNm y sus ΔG_0 , se predijeron usando el programa *mfold* v2.3. Las zonas sombreadas indican los codones de iniciación propuestos para la traducción de *tolA* (A) y de *orf2* (B). En negrita se indican los codones de terminación de la traducción de *tolR* (A) y de *oprL* (B). Las cajas abiertas indican las zonas propuestas como sitios de unión al ribosoma de *tolA* (A) y de *orf2* (B).

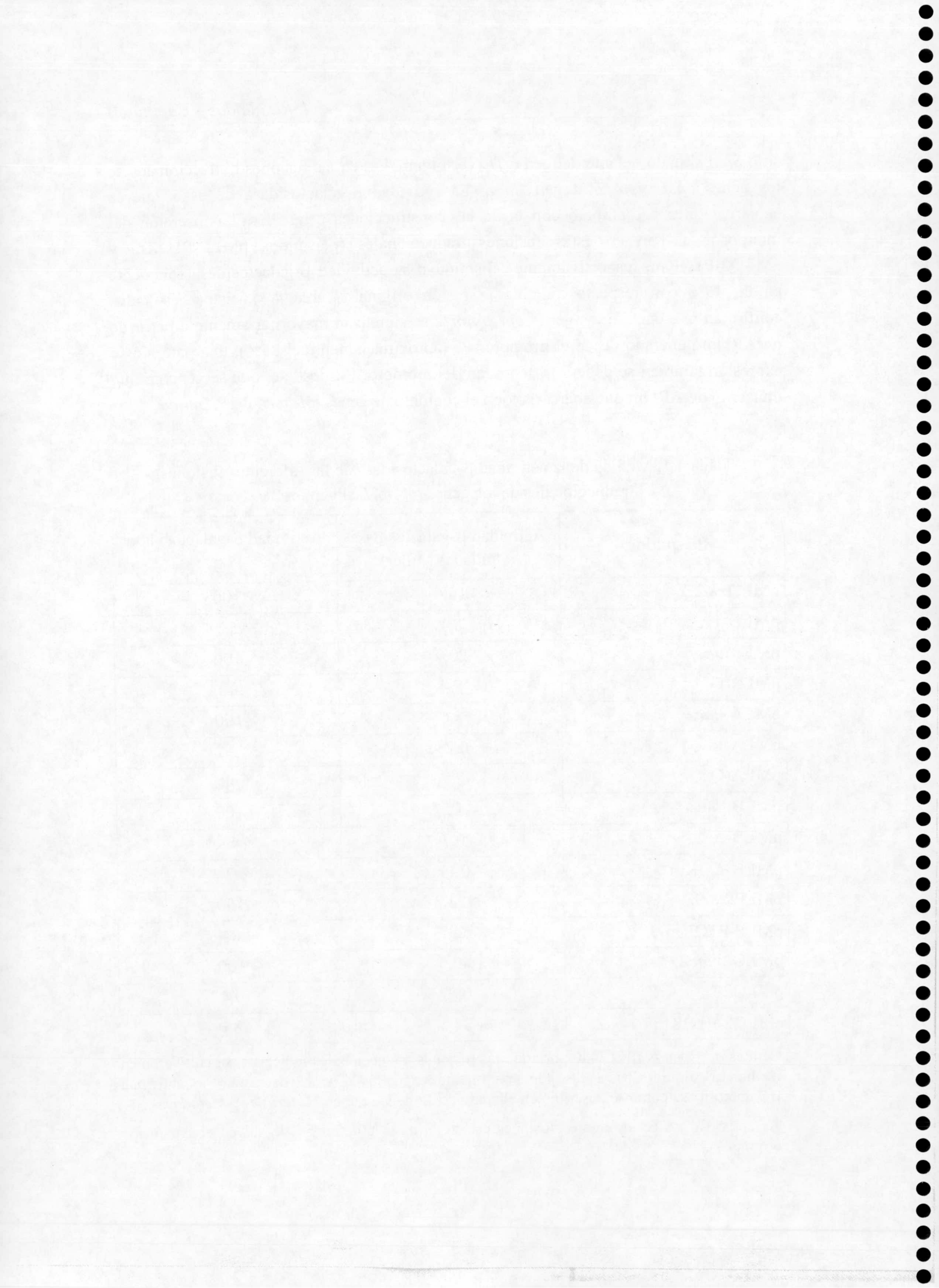
sitio *SphI* situado delante del gen *orf1* (ver Figura 4.4) en las fusiones traduccionales de los genes *oprL* y *orf2* al gen *lacZ*. La actividad β -galactosidasa de estas nuevas construcciones se comparó con la de las construcciones originales. La inserción del interposón Ω -Km en estas fusiones traduccionales (plásmidos pMLP-P1 Ω Km y pMLO2-P1 Ω Km, respectivamente), disminuyó su actividad β -galactosidasa solamente en un 15% con respecto a la de la fusión original (Tabla 4.1). Estos resultados confirman que aunque los genes *oprL* y *orf2* se sintetizan mayoritariamente a partir de un ARNm generado desde el promotor P_L (aproximadamente el 85%), una parte de su expresión también se debe a la actividad del promotor P₁, desde el que se generaría un transcrito de ARNm que abarcaría todo el conjunto de genes *tol-oprL* de *P. putida*.

Tabla 4.1. Medida de la actividad β -galactosidasa de las diferentes fusiones traduccionales de los genes *tol-oprL* al gen *lacZ*^a.

Plásmido	Actividad β -galactosidasa (Unidades Miller)	Actividad β -galactosidasa (%) ^b
pMLQ:: <i>lacZ</i>	15,6	100
pMLQ-1	8,1	52
pMLR:: <i>lacZ</i>	20,9	100
pMLR-Q	8,4	40
pMLA:: <i>lacZ</i>	5,6	100
pMLA-R	0,28	5
pMLA-Q	2,7	48
pMLB:: <i>lacZ</i>	1,5	100
pMLB-A	0,7	47
pMLB-A Ω Km	0,11	7
pMLP:: <i>lacZ</i>	123,3	100
pMLP-P1 Ω Km	103,3	84
pMLO2:: <i>lacZ</i>	40,5	100
pMLO2-L	0,17	0,4
pMLO2-P1 Ω Km	34,5	85

^a Células de *P. putida* KT2440 portando las fusiones traduccionales indicadas, se cultivaron en medio LB líquido hasta fase de crecimiento exponencial y se determinó la actividad β -galactosidasa como se describió en el apartado 17 de la sección *Materiales y Métodos*.

^b La actividad de las diferentes fusiones está referida a la actividad de su respectiva fusión original.



Capítulo III

PAPEL DEL SISTEMA Tol-OprL EN EL TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS Y AMINOÁCIDOS A TRAVÉS DE LA ENVUELTA CELULAR

RESUMEN

Como parte de los estudios de caracterización de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida*, se analizó el crecimiento de los mismos en medio mínimo con distintas fuentes de carbono y se comparó con el de la cepa parental. Tanto la cepa silvestre como los mutantes *tol-oprL* utilizaron benzoato como fuente de carbono, alcanzando un rendimiento final similar (determinado como turbidez del cultivo). Sin embargo, se observó que el crecimiento de los mutantes en medio mínimo con glucosa fue menor que el de la cepa silvestre, y en contraste con la cepa parental, en medio mínimo con glicerol, fructosa o arginina, los mutantes fueron incapaces de crecer. Con el fin de estudiar si el defecto en la utilización de estas fuentes de carbono se debía a la alteración de la envuelta celular en los mutantes *tol-oprL*, se analizó, por un lado, la presencia y correcta exposición de algunas proteínas de la membrana externa implicadas en la difusión de estos compuestos al periplasma de la célula, y por otro, el transporte de distintos compuestos marcados con ^{14}C a través de la envuelta celular. Mediante ensayos de inmunodetección en membrana de nitrocelulosa se determinó que las proteínas OprF, OprD y OprB estaban presentes en los mutantes *tol-oprL* de *P. putida*. También se analizó la presencia de la proteína periplásmica de unión a glucosa (GBP) en el sobrenadante de cultivos celulares de dichos mutantes. En contraste con la cepa silvestre, los mutantes *tol-oprL* liberaron GBP al medio extracelular, aunque la cantidad de dicha proteína aún presente en los extractos de proteína celular total fue similar a la encontrada en la cepa silvestre. El análisis del transporte de ^{14}C -glucosa y ^{14}C -glicerol utilizando células enteras o esferoplastos indicó que el defecto en el transporte de estos dos compuestos en los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* se producía a nivel de la membrana interna. Sin embargo, la fuerza protón-motriz (pmf) necesaria para el transporte de muchos de estos compuestos al interior celular, no estaba afectada en dichos mutantes. Por último, también se analizó el crecimiento de mutantes *tol-oprL(pal)* en otras bacterias gram negativas. Los mutantes *tol-oprL(pal)* de *P. aeruginosa* y de *E. coli* tampoco crecieron bien medio mínimo con diferentes fuentes de carbono. En conjunto, estos resultados sugieren que las proteínas del sistema Tol-OprL(PAL) son importantes en el transporte de diferentes compuestos a través de la envuelta celular.

1. CRECIMIENTO DE LOS MUTANTES *tol-oprL* DE *P. putida* EN DISTINTAS FUENTES DE CARBONO.

Los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* se cultivaron en medio mínimo M9 suplido con distintas fuentes de carbono. Tras incubar las células durante 27h a 30°C y 200 rpm, se determinó la turbidez de cada uno de los cultivos. En la Tabla 5.1 se muestra el crecimiento de dichos mutantes en los distintos medios de cultivo utilizados, comparándolo con el crecimiento de la cepa parental. Cuando se usó benzoato como fuente de carbono, el crecimiento de los mutantes *tol-oprL* fue similar al de la cepa parental. Sin embargo, su crecimiento en medio mínimo con glucosa, succinato o sacarosa fue menor que el de la cepa parental, y en arginina, fructosa y glicerol los mutantes no fueron capaces de crecer. En medio mínimo con prolina como única fuente de carbono, el rendimiento en el crecimiento de los mutantes no polares QX, RX, AX y PX fue sólo ligeramente menor que el de la cepa parental. Sin embargo, los mutantes polares QΩ, RΩ, AΩ y BΩ, así como el mutante BX, no fueron capaces de crecer en esta fuente de carbono.

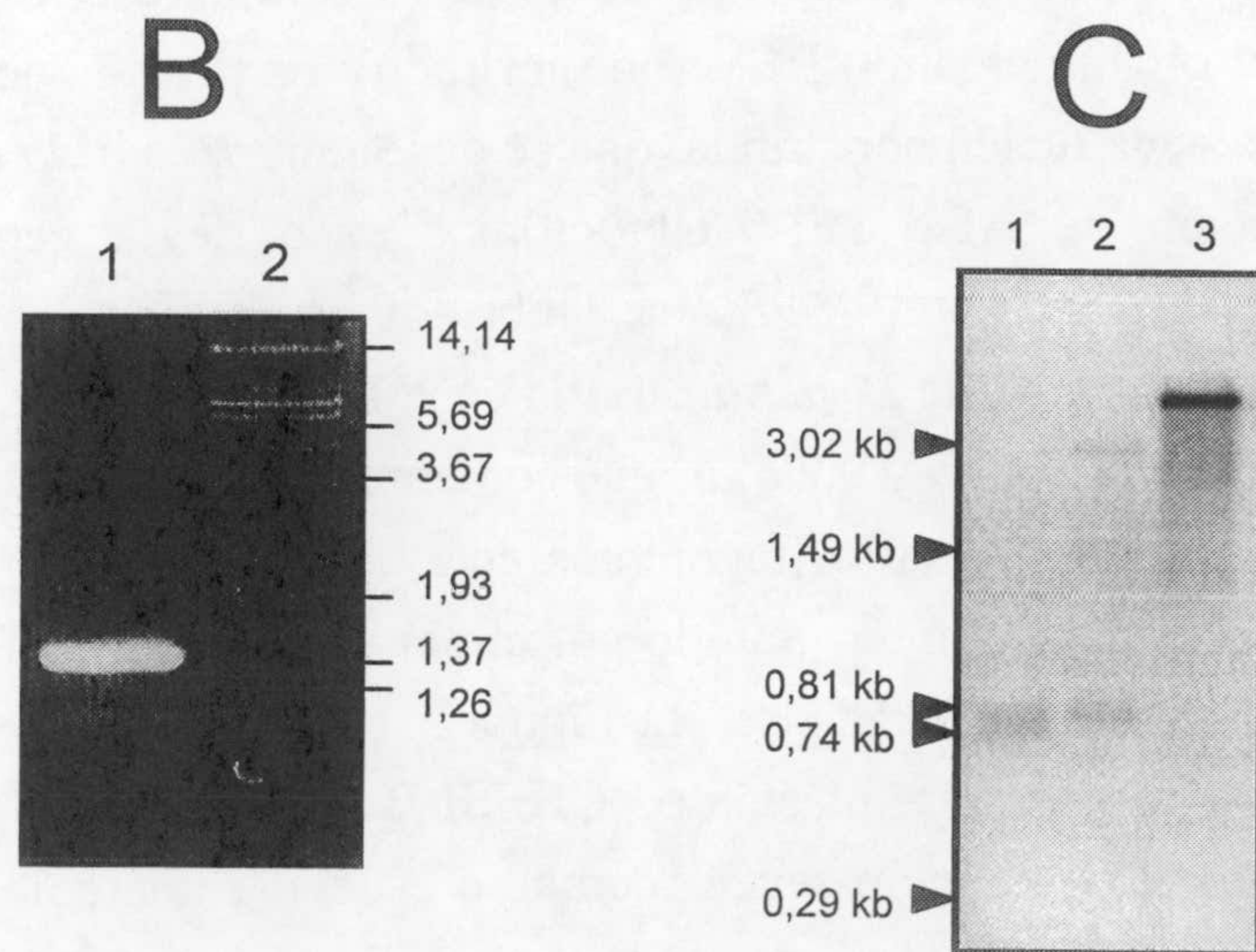
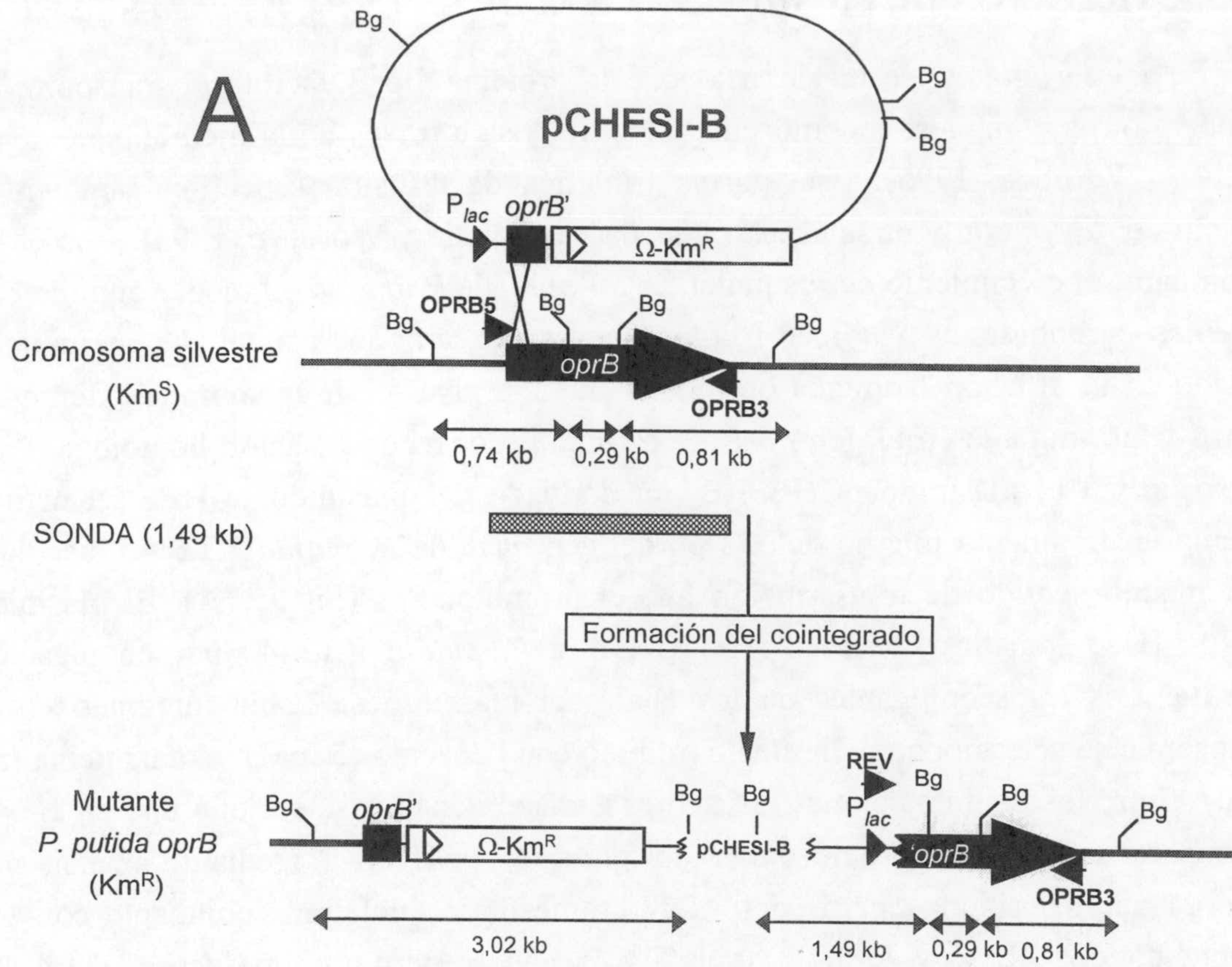
TABLA 5.1. Crecimiento de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* en diferentes fuentes de carbono

^a Fuente de carbono	<i>P. putida</i>									
	KT2440	QΩ	RΩ	AΩ	BΩ	QX	RX	AX	BX	PX
Arginina	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoato	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Fructosa	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Prolina	+++	-	-	-	-	++	++	++	-	++
Sacarosa	+++	-	-	-	+	-	-	-	+	+
Succinato	+++	+	+	+	+	+	++	+	+	+

^a La turbidez de los cultivos celulares se determinó tras de 27 h de incubación a 30°C en medio mínimo M9 con las fuentes de carbono indicadas. +++, $DO_{660} \geq 1$; ++, $0,5 \leq DO_{660} < 1$; +, $0,25 \leq DO_{660} < 0,5$; -, $DO_{660} < 0,25$.

2. CONSTRUCCIÓN DE UN MUTANTE *oprB* DE LA CEPA *P. putida* KT2440

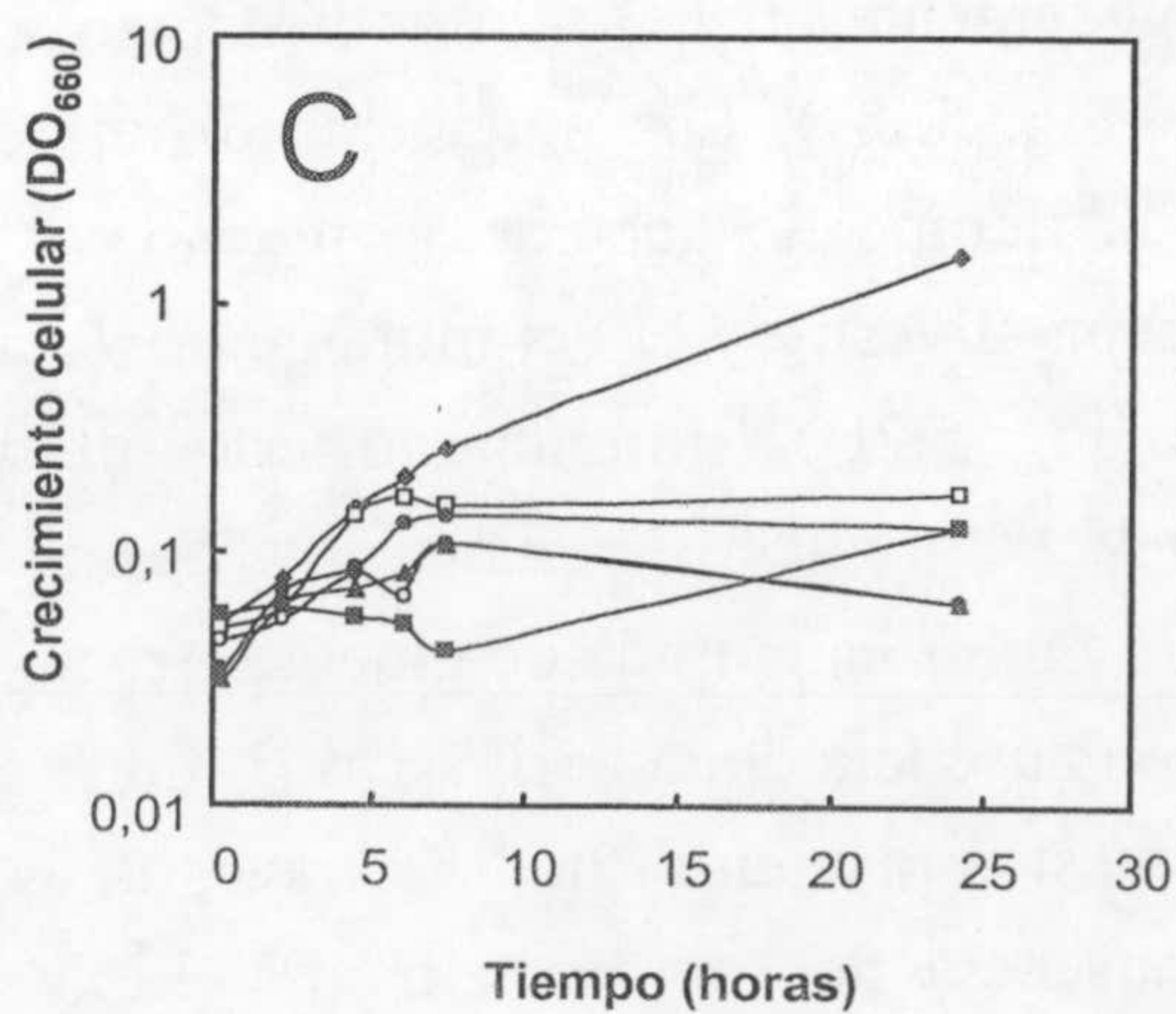
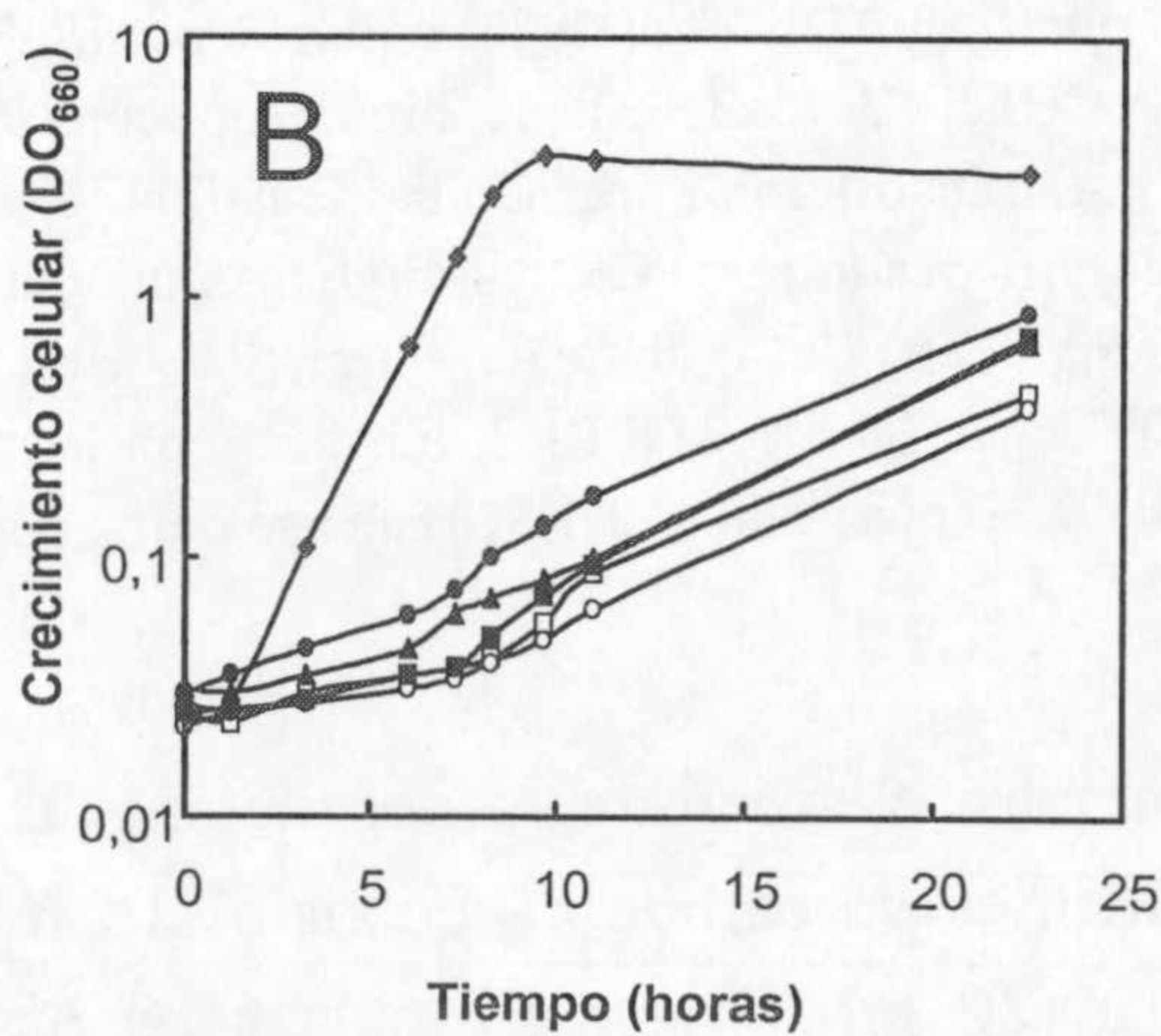
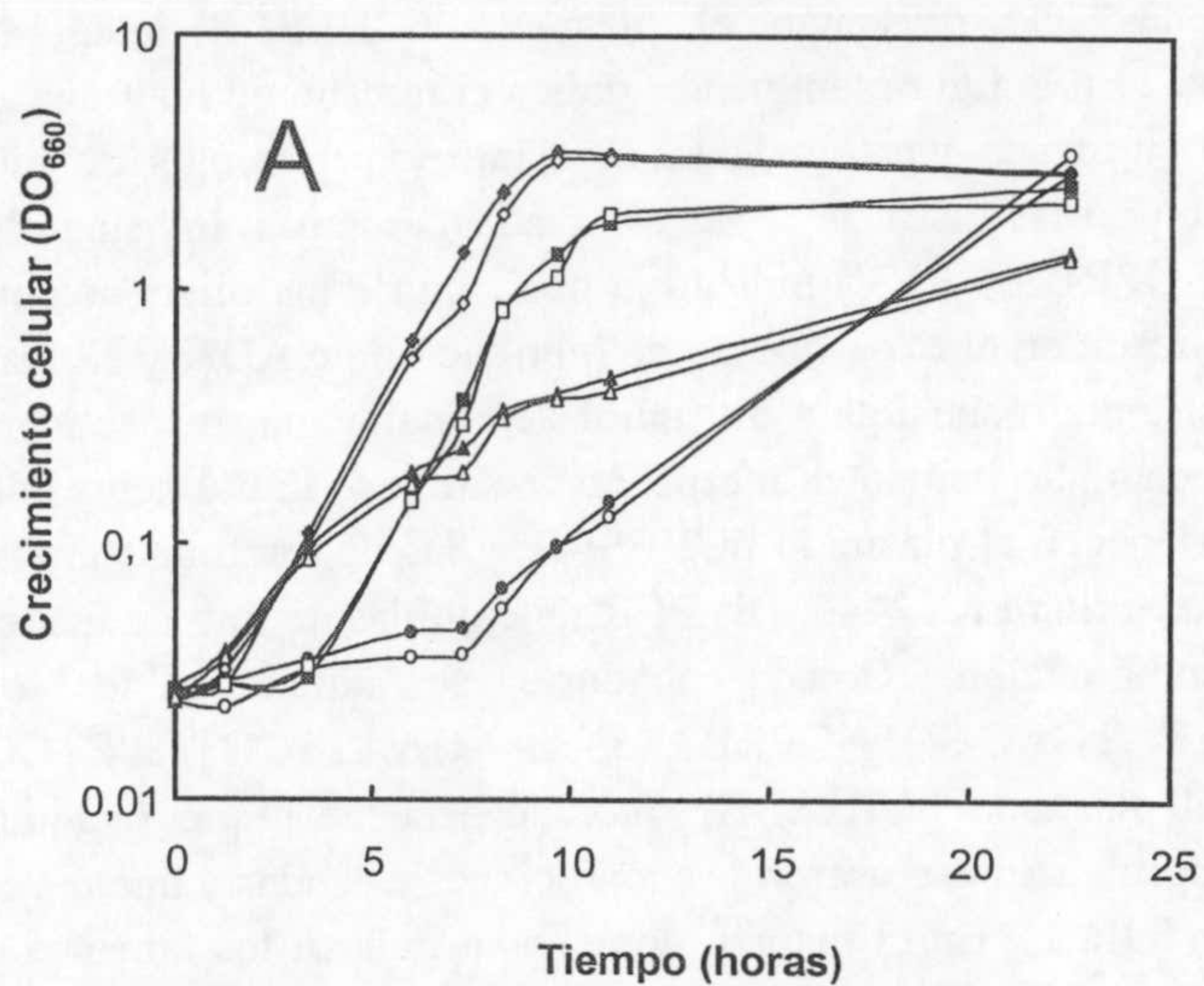
En *P. aeruginosa* se ha descrito que la proteína OprB facilita el transporte de glucosa y otros compuestos como glicerol y fructosa a través de la membrana externa (Wylie y Worobec, 1995). Esta porina trimérica de difusión específica también se encuentra en *P. putida* y otras pseudomonadáceas (Wylie y Worobec, 1994). Con el fin de comparar el crecimiento de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* en medio mínimo con diferentes carbohidratos y glicerol como fuente de carbono, con el de un mutante afectado en la difusión facilitada de carbohidratos a nivel de la membrana externa, se construyó un mutante en el gen *oprB* de *P. putida* por recombinación homóloga. Para ello se utilizó el plásmido pCHESI-B, un derivado del plásmido pCHESI Ω Km que contenía un fragmento interno de 338 pb del gen *oprB* de *P. putida* KT2440 insertado en el mismo sentido de transcripción que el promotor P_{lac} (Fig. 5.1A). El plásmido pCHESI-B se transfirió desde *E. coli* DH5 α a *P. putida* KT2440 por conjugación tripartita. Los transconjugantes en los cuales el plásmido se había integrado en el cromosoma, se seleccionaron en medio mínimo con benzoato (5 mM) y kanamicina (50 μ g/ml). Entre los distintos clones resistentes a kanamicina, se seleccionó uno en el que se confirmó la inserción cromosómica del plásmido pCHESI-B mediante análisis por PCR. La amplificación a partir del ADN cromosómico del transconjugante con los oligonucleótidos REV y OPRB3 (ver Fig. 5.1A), generó un producto de 1,4 kb correspondiente al gen *oprB* interrumpido por el plásmido (Fig. 5.1B). Como control negativo, se utilizó el ADN cromosómico de la cepa silvestre. Como era de esperar, no se produjo la amplificación de ningún producto de PCR al carecer éste de la secuencia que hibrida con el oligonucleótido REV (no mostrado). La pérdida de la copia silvestre del gen *oprB* en la cepa recién construida, que se denominó *P. putida oprB*, se confirmó mediante hibridación de ADN. El ADN cromosómico de la cepa parental y del transconjugante digeridos con *Bgl*I, se hibridó con una sonda de 1,49 kb correspondiente al gen *oprB* de *P. putida*. En la cepa silvestre la sonda hibridó con tres fragmentos de 0,81 kb, 0,74 kb y 0,29 kb, que contenían el gen *oprB*, mientras que en el transconjugante hibridó con cuatro fragmentos de 3,02 kb, 1,49 kb, 0,81 kb y 0,29 kb correspondientes al gen *oprB* interrumpido por el plásmido pCHESI-B (ver detalles del tamaño de los fragmentos esperados en la Figura 5.1A). Como control positivo de la transferencia y la hibridación, el plásmido pCHESI-B digerido con *Bgl*I se hibridó con la misma sonda. Esta hibridación reveló como se esperaba una sola banda de 4,1 kb (Fig. 5.1C).



← **Figura 5.1. Estrategia seguida para la construcción del mutante *P. putida oprB* y análisis mediante hibridación de ADN y por PCR de la región donde se encuentra el gen *oprB*.** (A) Esquema del reemplazamiento génico. El hecho de recombinación se produce entre la secuencia de 338 pb situado delante del interposón Ω -Km en el plásmido pCHESI-B, y su secuencia homóloga en el cromosoma de *P. putida* KT2440, el cual conduce a la formación de un cointegrado. La resistencia a Km permite seleccionar aquellos clones que presentan el plásmido pCHESI-B integrado en su cromosoma interrumpiendo el gen *oprB*. En la figura también se indica el tamaño de los fragmentos *Bgl*I que hibridan con la sonda de 1,49 kb utilizada para analizar, mediante experimentos de hibridación de ADN, la organización de esta región en las distintas cepas estudiadas. Además, los símbolos negros en forma de punta de flecha (OPRB5, OPRB3 y REV) indican la posición de los oligonucleótidos utilizados para la obtención de la sonda utilizada en el experimento de hibridación de ADN y en los análisis por PCR. *Bg*I; Km^R/Km^S, cepa resistente o sensible a 50 μ g/ml de kanamicina, respectivamente. La flecha negra indica el gen *oprB*, y el rectángulo blanco el interposón Ω -Km. Las líneas negras de trazo fino indican las regiones de ADN que pertenecen al plásmido pCHESI-B, y las de trazo más grueso indican las regiones de ADN pertenecientes a *P. putida* KT2440. (B) PCR de colonias de uno de los mutantes *oprB* obtenido tras el hecho de recombinación. Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos REV (5'-CACAGGAAACAGCTATGAC-3') y OPRB3 (5'-AAAGAATTCCTGTCTCGGCCTATCC-3') que hibridan con el MCS del plásmido pCHESI-B y con la secuencia que flanquea al gen *oprB* en 3', respectivamente. En la amplificación se usaron las condiciones estándar y una temperatura de hibridación de 55°C. *P. putida oprB* (calle 1). En el margen derecho se indican los tamaños correspondientes a los patrones de peso molecular (calle 2), en kilobases. (C) Análisis mediante hibridación de ADN de la región donde se encuentra el gen *oprB*. El ADN total de las cepas *P. putida* KT2440 (calle 1) y *P. putida oprB* (calle 2), y el plásmido pCHESI-B (calle 3), se digirieron con *Bgl*I, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfirieron a membrana de nailon. Como sonda de ADN se utilizó un fragmento de 1,49 kb obtenido y marcado por PCR con digoxigenina conjugada al nucleótido dUTP. Los oligonucleótidos utilizados en el marcaje de la sonda por PCR, OPRB5 (5'-AAAGAATTCGGCTCACTTCAAAGG-3') y OPRB3, hibridan con las secuencias que flanquean en 5' y 3', respectivamente, al gen *oprB*. El plásmido pCHESI-B se usó como control positivo del ensayo.

Posteriormente, se comparó el crecimiento del mutante *P. putida oprB* en medio mínimo M9 con distintas fuentes de carbono [benzoato (10 mM), fructosa (20 mM), glicerol (40 mM) o glucosa (20 mM)] con el de la cepa parental. Los tiempos de generación en fase de crecimiento exponencial tanto de la cepa mutante como de la silvestre, fueron de aproximadamente 60 ± 3 min en benzoato y glucosa, y de 135 ± 4 min en fructosa y glicerol (Fig. 5.2A). Los mutantes no polares de *P. putida* en los genes *tol-oprL* mostraron un tiempo de generación mucho mayor (aproximadamente 163 ± 8 min) que el de la cepa silvestre y el del mutante *oprB* cuando se cultivaron en medio mínimo con glucosa (Fig. 5.2B). Sin embargo, estos mutantes fueron incapaces de crecer en medio mínimo M9 con glicerol como fuente de carbono (Fig. 5.2C). Estos resultados sugieren que en *P. putida* la entrada de glucosa, fructosa y glicerol al espacio periplásmico puede ocurrir en ausencia de la porina OprB. En *P. aeruginosa* también se ha sugerido que estos compuestos pueden difundir a través de porinas inespecíficas de la membrana externa en ausencia de esta proteína (Wylie y Worobec, 1995). Sin embargo, la incapacidad de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* para crecer en glucosa o

glicerol podría deberse a un defecto más generalizado en la difusión de estos compuestos a través de la membrana externa o incluso en etapas posteriores de su transporte.



← **Figura 5.2.** Crecimiento de la cepa silvestre *P. putida* KT2440 y de su mutante isogénico *P. putida oprB* en medio mínimo con distintas fuentes de carbono (A), así como de los mutantes *tol-oprL* no polares de *P. putida* en glucosa (B) y glicerol (C). (A) Crecimiento de *P. putida* KT2440 y *P. putida oprB*. Células de *P. putida* KT2440 (símbolos cerrados) y del mutante *oprB* (símbolos abiertos) se cultivaron durante toda la noche en medio LB líquido. Una alícuota de estos cultivos se utilizó para inocular a una DO_{660} inicial de 0,02-0,04, medio mínimo M9 con benzoato 10 mM (cuadrados), fructosa 20 mM (círculos), glicerol 40 mM (triángulos) o glucosa 20 mM (rombos) como fuentes de carbono (el medio del mutante *P. putida oprB* se suplió con kanamicina 50 µg/ml). La turbidez de cada cultivo se determinó a los tiempos indicados. (B y C) Crecimiento de la cepa silvestre de *P. putida* y de una serie de mutantes isogénicos en el sistema Tol-OprL. Las cepas *P. putida* KT2440 (rombos cerrados), y los mutantes *P. putida* QX (cuadrados abiertos), RX (círculos abiertos), AX (triángulos cerrados), BX (cuadrados cerrados) y PX (círculos cerrados), se cultivaron durante toda la noche en medio LB líquido. Una alícuota de estos cultivos se utilizó para inocular, a una DO_{660} inicial de 0,02-0,04, medio mínimo M9 con glucosa 20 mM (B) o con glicerol 40 mM (C) como fuente de carbono, determinándose después la turbidez de cada cultivo a los tiempos indicados.

3. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA EXTERNA DE LOS MUTANTES *tol-oprL* de *P. putida*.

3.1. Estudio de la composición de proteínas de la membrana externa

Lazdunski y colaboradores (1998) han sugerido que el sistema Tol-PAL de *E. coli* podría intervenir en los procesos de exportación de porinas o/y en su ensamblaje en la membrana externa. Si esta fuese también una de las funciones del sistema Tol-OprL de *P. putida*, la incapacidad de los mutantes *tol-oprL* para utilizar diversas fuentes de carbono podría deberse a la ausencia de las porinas necesarias para su entrada o al ensamblaje inadecuado de las mismas en la membrana externa. Por esta razón decidimos analizar en primer lugar la composición de proteínas de la membrana externa en los mutantes *tol-oprL* de *P. putida*. Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes no polares en los genes *tol-oprL* se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial y se aisló la membrana externa tal y como se describe en el apartado 12.2 de la sección *Materiales y Métodos*. Con el fin de identificar la proteína OprF en el patrón de bandas de proteínas de la membrana externa de los mutantes *tol-oprL*, se aislaron también la membrana externa de mutantes de una cepa silvestre de *P. aeruginosa*, denominada H103, y de un mutante derivado de esta cepa que carece de la proteína OprF (*P. aeruginosa* H636). Las proteínas se separaron electroforéticamente en gel desnaturizante de poliacrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie. Los mutantes *tol-oprL* presentaron un patrón de bandas de proteínas de la membrana externa similar al de la cepa parental *P. putida* KT2440, en el cual se identificó claramente la proteína OprF de cada uno de los mutantes, así como las

lipoproteínas OprI y OprL (esta última, como era de esperar, estaba ausente en el mutante PX) (Fig. 5.3).

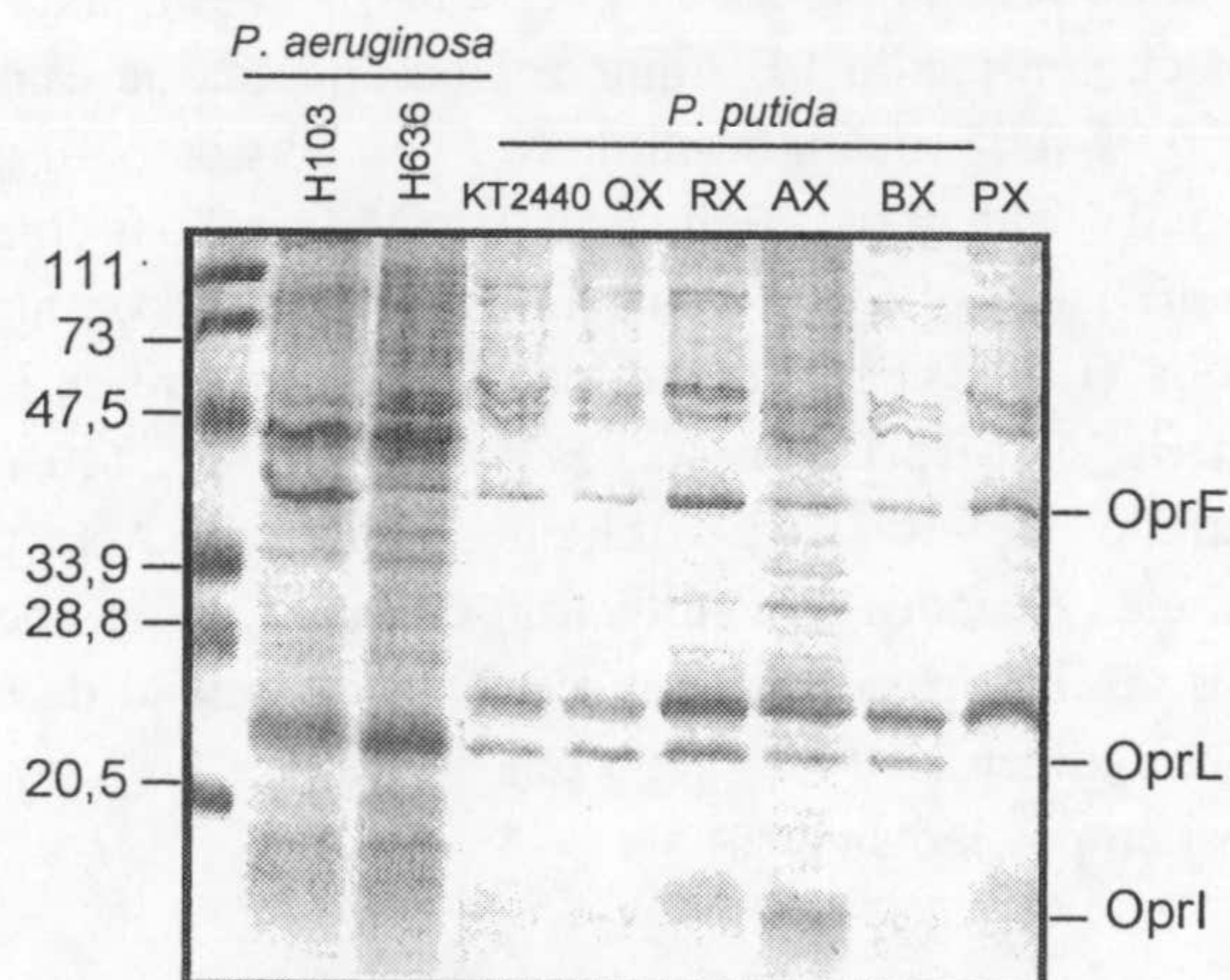


Figura 5.3. Análisis de las proteínas de la membrana externa de los mutantes *P. putida tol-oprL*. Células de *P. putida* KT2440, de los mutantes *P. putida* QX, RX, AX, BX y PX, y de *P. aeruginosa* H103 (cepa silvestre) y H636 (mutante *oprF*) se cultivaron en medio LB líquido con los antibióticos adecuados, hasta alcanzar una DO_{660} de 0,8-1. Entonces, se recogieron por centrifugación y se aislaron las proteínas de la membrana externa como se describió en el apartado 12.2 de la sección *Materiales y Métodos*. Las distintas muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 14% (p/v) con SDS y se tiñeron con azul de Coomassie. En el margen izquierdo de la figura se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular en kDa, y en el margen derecho la posición de algunas de las proteínas de la membrana externa.

3.1.1. Análisis de la proteína OprF de la membrana externa de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* KT2440

P. aeruginosa produce unas 2×10^5 copias por célula de OprF, una porina monomérica inespecífica de 35 kDa. Como se ha descrito en el capítulo de *Introducción*, OprF desempeña una importante función estructural en la membrana externa ya que su deficiencia produce células redondeadas, que crecen con dificultad en medio con baja osmolaridad, que presentan evaginaciones en su membrana externa y que liberan enzimas periplásmicas (Gotoh *et al.*, 1989). Aunque la función como porina de OprF aún sigue siendo materia de controversia (ver Hancock *et al.*, 1990; Nikaido *et al.*, 1991), se ha estimado que una pequeña proporción de moléculas de OprF (menos del 1% por célula) estaría formando poros grandes (de unos 2 nm), mientras que el resto formaría poros considerablemente menores (Woodruff *et al.*, 1986). Sin embargo, Bellido *et al.* (1992) han sugerido que la proteína OprF es la principal porina (aunque

no la única) involucrada en la difusión de disacáridos (como sacarosa y melibiosa), trisacáridos (como rafinosa) y tetrasacáridos a través de la membrana externa de *P. aeruginosa*, pero no de monosacáridos como la glucosa, y que por tanto OprF es la proteína predominante en la difusión de compuestos de gran tamaño (pero no de compuestos de menor tamaño) a través de la membrana externa de *P. aeruginosa*. Por estas razones, y dado que los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* fueron incapaces de crecer en medio mínimo con sacarosa como fuente de carbono, decidimos analizar la presencia de la proteína OprF, así como su correcta exposición, en la membrana externa de dichos mutantes.

Dada la disponibilidad un anticuerpo monoclonal generado contra un epítipo de superficie de la proteína OprF de *P. aeruginosa*, el anticuerpo MA7-1, que reconocía la misma proteína de *P. putida*, decidimos analizar la presencia de esta proteína, así como la correcta localización de dicho epítipo expuesto en los mutantes *tol-oprL* de *P. putida*. Se aislaron las proteínas de la membrana externa de células de la cepa parental y de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida*, y de células de *P. aeruginosa* H103 y H636 (un mutante en el gen *oprF*) cultivadas en medio LB líquido hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Las proteínas se separaron en gel desnaturalizante de poliacrilamida y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Se analizó la presencia de la proteína OprF mediante ensayos de inmunodetección con el anticuerpo monoclonal MA7-1. La proteína OprF se detectó en todos los mutantes *tol-oprL* con todos los anticuerpos utilizados, y en una cantidad similar a la encontrada en la cepa parental (Fig. 5.4A). En la cepa *P. aeruginosa* H636, utilizada como control negativo, no se detectó esta proteína de membrana externa (Fig. 5.4A).

Con el fin de determinar si OprF también estaba presente en los mutantes *P. putida tol-oprL* tras su crecimiento en glucosa, se analizó su presencia en la membrana externa de células cultivadas en medio mínimo con glucosa. La cantidad de proteína OprF detectada en los mutantes *P. putida tol-oprL* fue similar a la cantidad de proteína detectada en la cepa parental, excepto en el caso de los mutantes QX y BX donde la cantidad de OprF fue menor que la detectada en la cepa parental (Fig. 5.4B). Como controles positivo y negativo se utilizaron las cepas *P. aeruginosa* H103 y H636, respectivamente (Fig. 5.4B).

Para determinar si la proteína OprF estaba correctamente plegada y expuesta en la superficie celular de los mutantes *P. putida tol-oprL*, se analizó su exposición mediante inmunofluorescencia indirecta. Células de *P. putida* KT2440, de los mutantes *tol-oprL* y de las cepas *P. aeruginosa* H103 y H636, se cultivaron durante 12h en medio LB líquido. Alícuotas de cada uno de los cultivos se centrifugaron y se incubaron durante

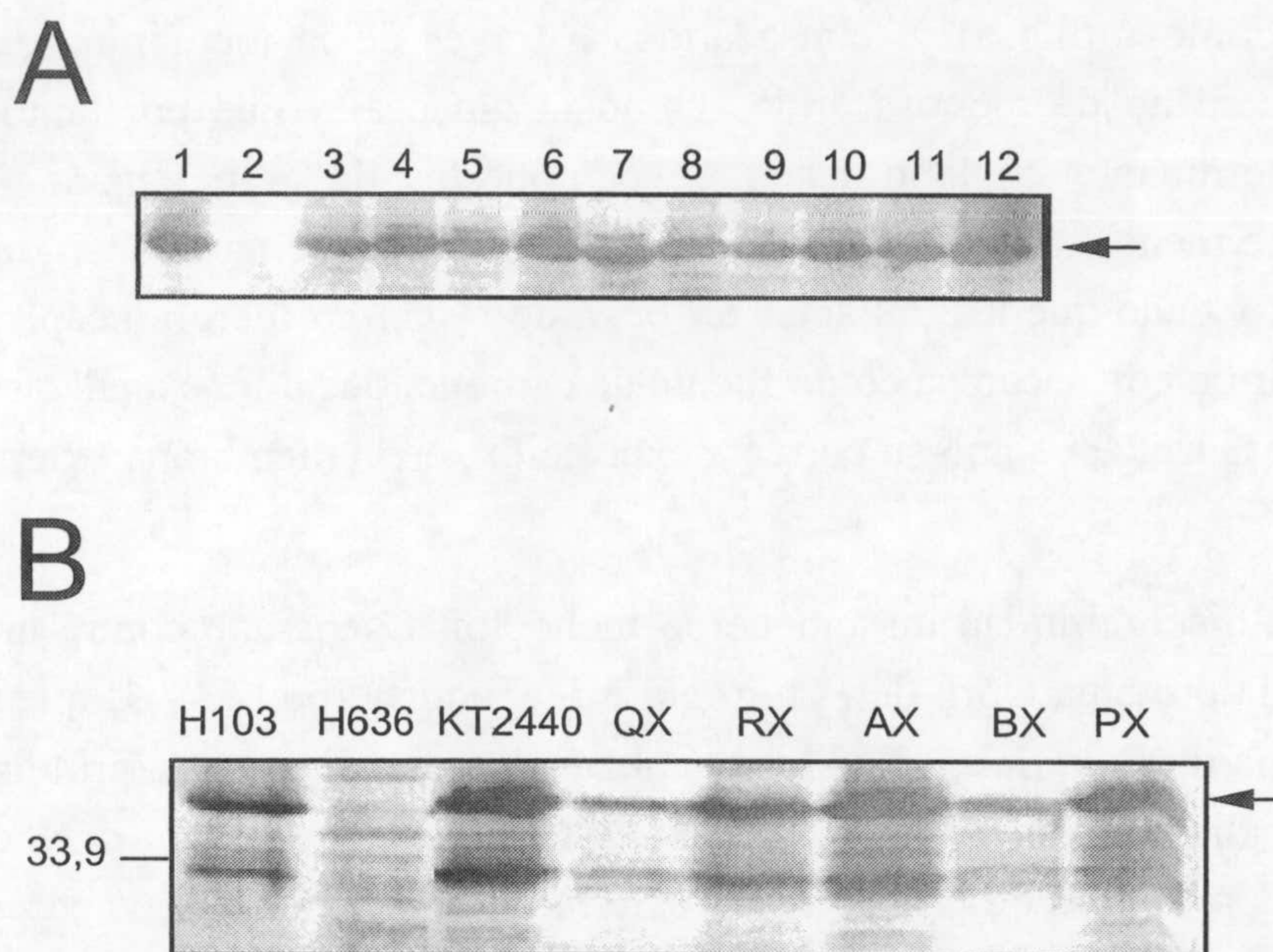


Figura 5.4. Análisis de la proteína OprF en la membrana externa de los mutantes *P. putida tol-oprL*. Células de *P. aeruginosa* H103 (cepa parental) (calle 1), *P. aeruginosa* H636 (mutante *oprF*) (calle 2), *P. putida* KT2440 (calle 3) y de los mutantes *P. putida* QX (calle 4), Q Ω (calle 5), RX (calle 6), R Ω (calle 7), AX (calle 8), A Ω (calle 9), BX (calle 10), B Ω (calle 11) y PX (calle 12) se cultivaron en medio LB líquido (A) o en medio mínimo M9 con glucosa 0,4% (p/v) como fuente de carbono (B) (con estreptomicina 500 μ g/ml en el caso de *P. aeruginosa* H636 y kanamicina 50 μ g/ml en el caso de los mutantes *tol::ΩKm*) hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0,8-1. Entonces, se recogieron por centrifugación y se prepararon extractos de proteínas de la membrana externa de cada una de las cepas. Aproximadamente 20 μ g de proteína de las distintas muestras se separaron electroforéticamente en gel de poliacrilamida al 12,5% (p/v) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se realizó una detección inmunológica usando el anticuerpo monoclonal MA7-1 generado contra la proteína OprF de *P. aeruginosa*. Los revelados se realizaron por métodos colorimétricos. La flecha situada en el margen izquierdo de las figuras indica la posición de la proteína OprF.

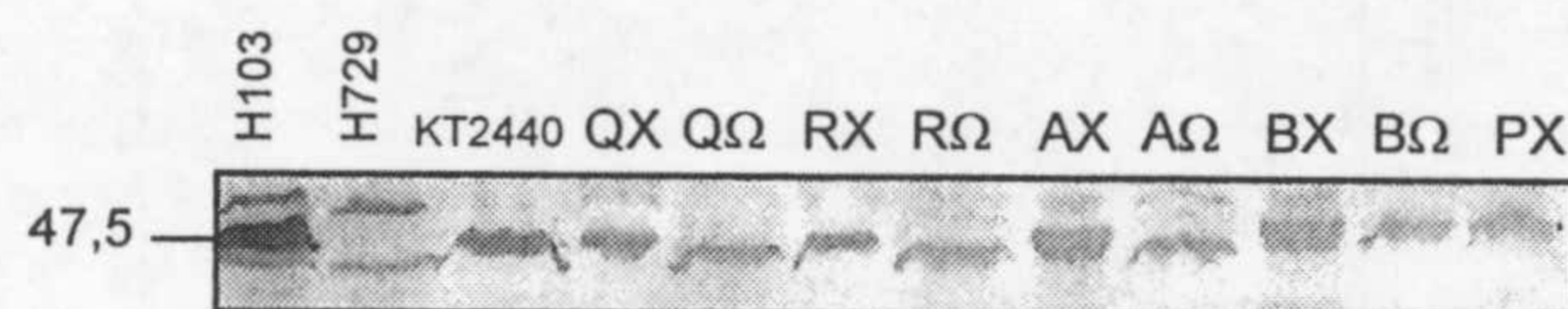
1h con el anticuerpo monoclonal MA7-1 en 100 μ l de una solución de 1% (p/v) de BSA en tampón PBS. Tras realizar 3 lavados con PBS, los sedimentos celulares se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a una molécula de FITC (ver apartado 18 de la sección *Materiales y Métodos*). Las células se visualizaron en un microscopio óptico de epifluorescencia. Todos los mutantes *P. putida tol-oprL* presentaron la proteína OprF correctamente expuesta en su superficie celular, como se deduce de la emisión de fluorescencia al irradiar la muestras con luz azul (no mostrado). Lo mismo ocurrió con la cepa *P. aeruginosa* H103 (no mostrado), pero no en el caso de *P. aeruginosa* H636 que carece de la proteína OprF (no mostrado). Como control negativo adicional del experimento, las células también se incubaron con el segundo anticuerpo sin ser

incubadas previamente con el primero. No se observó emisión de fluorescencia en ninguna de las cepas en estas condiciones (no mostrado).

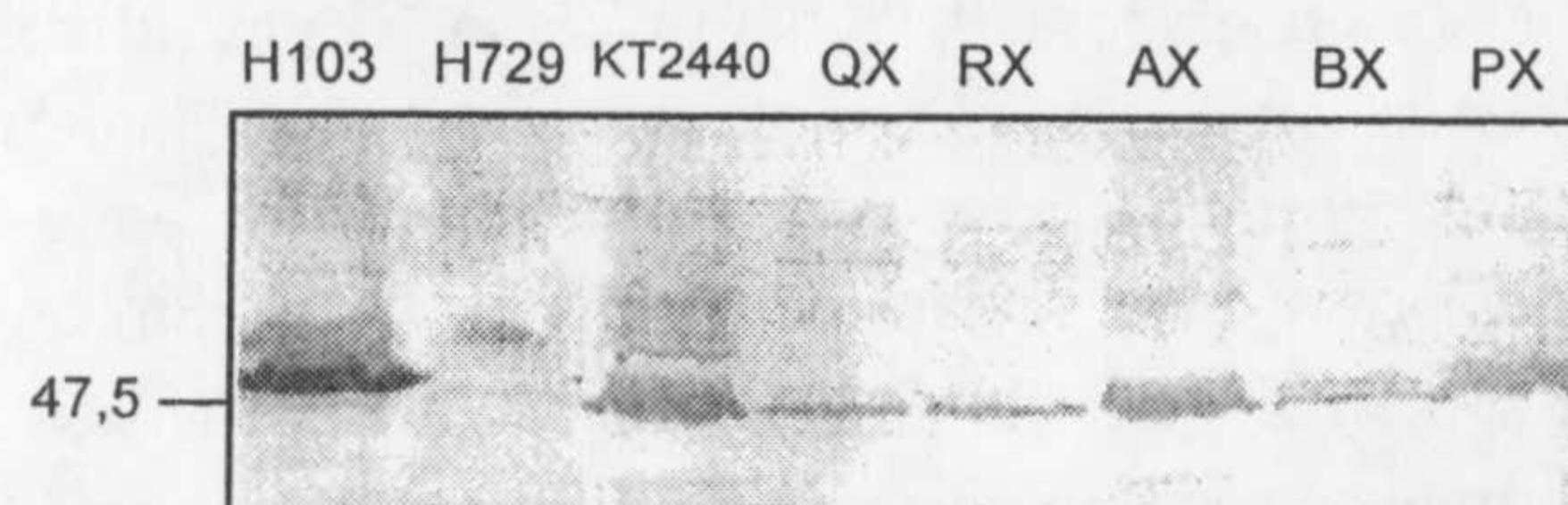
3.1.2. Análisis de la proteína OprD de la membrana externa de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* KT2440

En *P. aeruginosa* se ha descrito que la porina OprD facilita el transporte de péptidos y aminoácidos básicos como la arginina (Trias y Nikaido, 1990). Dado que los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* no son capaces de crecer en medio mínimo con arginina como fuente de carbono, decidimos analizar si la incapacidad de dichas cepas para crecer en este medio se debía a la ausencia de esta proteína. La presencia o ausencia de la proteína OprD se analizó mediante ensayos de inmunodetección en membrana de nitrocelulosa, a partir de preparaciones de proteínas de la membrana externa de células cultivadas tanto en medio LB líquido como en medio mínimo M9 con glucosa 0,4% (p/v). Para ello se utilizó un anticuerpo policlonal generado contra la proteína OprD de *P. aeruginosa* que también reconocía a la proteína OprD de *P. putida*. Como se muestra en la Figura 5.5, OprD se detectó en las preparaciones de proteínas de la membrana externa de todos los mutantes *tol-oprL* así como en la cepa parental, tanto en células cultivadas en LB líquido (Fig. 5.5A) como en medio mínimo con glucosa (Fig. 5.5B). La proteína OprD no se detectó en el mutante *P. aeruginosa* H729 que presenta una mutación en el gen que codifica para dicha proteína (Fig. 5.5A y B).

A



B



(Ver Leyenda en la página siguiente)

↑ **Figura 5.5. Análisis de la proteína OprD en la membrana externa de los mutantes *P. putida tol-oprL*.** Células de *P. aeruginosa* H103 (cepa parental) y H729 (mutante *oprD*), y de *P. putida* KT2440 y de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida*, se cultivaron en medio LB líquido (A) o en mínimo M9 con glucosa 0,4% (p/v) como fuente de carbono (B) (con kanamicina 300 µg/ml en el caso de *P. aeruginosa* H729, y kanamicina 50 µg/ml en el caso de los mutantes *tol::ΩKm*) hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0,8-1. Las preparaciones de proteínas de la membrana externa y el ensayo de inmunodetección se realizaron en las condiciones descritas en la leyenda de la Fig. 5.4, excepto que se utilizó un anticuerpo policlonal generado contra la proteína OprD de *P. aeruginosa*. En el margen izquierdo de la figura se indica la posición del marcador de peso molecular de 47,5 kDa.

3.1.3. Análisis de la proteína OprB de la membrana externa de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* KT2440

Células de *P. putida* KT2440, de los mutantes no polares *P. putida tol-oprL* y del mutante *P. putida oprB*, se cultivaron en medio mínimo M9 con glucosa para inducir la síntesis de la proteína OprB. Se prepararon extractos de proteína celular total de cada una de las cepas y se analizó la presencia de esta proteína mediante ensayos de inmunodetección en membrana de nitrocelulosa. El anticuerpo policlonal utilizado, generado contra la proteína OprB de *P. aeruginosa*, reconoció una proteína del tamaño esperado (45 kDa) en *P. putida* KT2440. Esta proteína no se detectó en el mutante *P. putida oprB*, lo que confirmaba que el producto detectado por el anticuerpo era la proteína OprB de *P. putida* (Fig. 5.6). La cantidad de OprB detectada en los mutantes *tol-oprL* fue similar a la detectada en la cepa parental (Fig. 5.6).

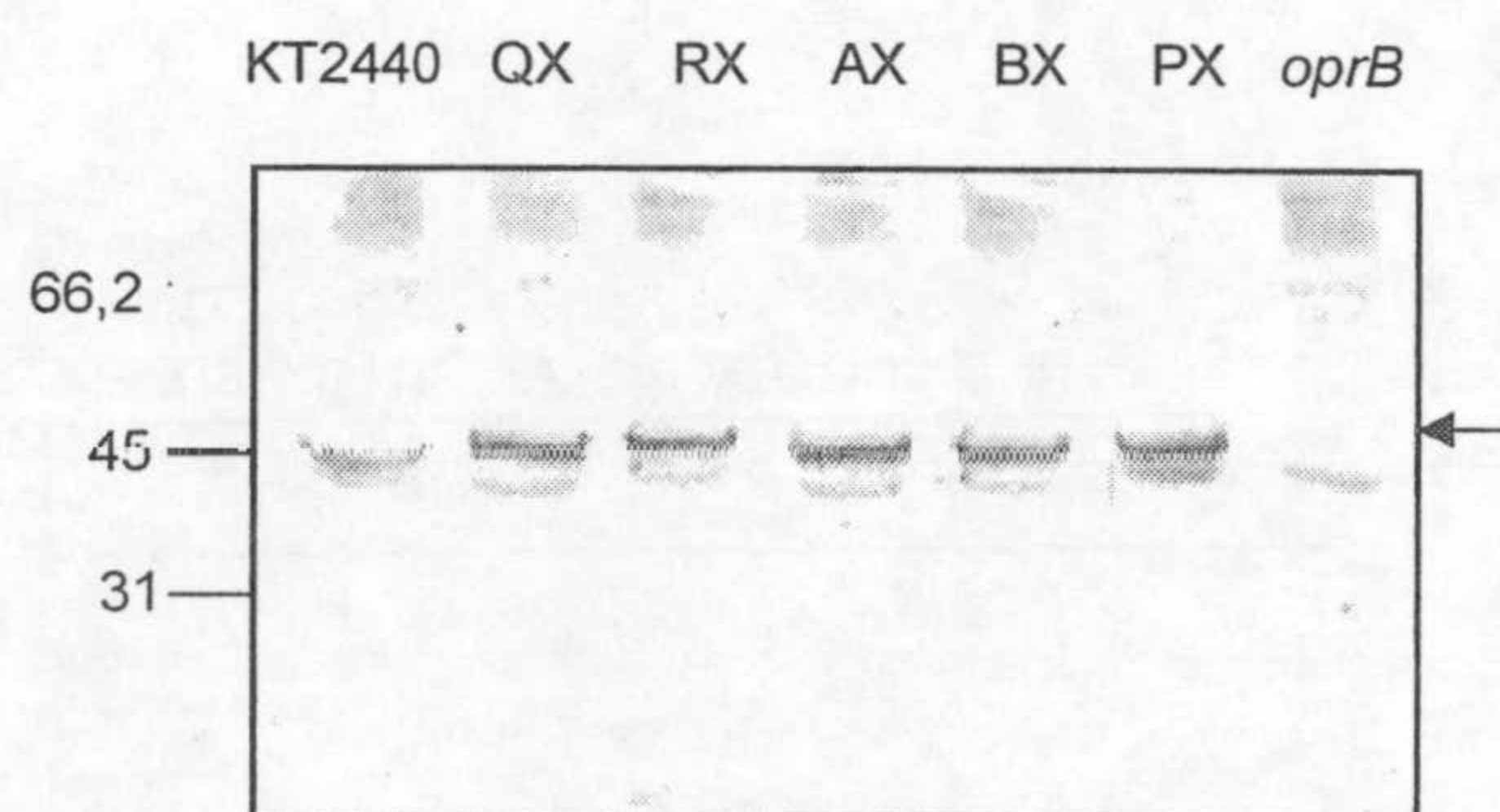


Figura 5.6. Análisis de la proteína OprB en la membrana externa de los mutantes *tol-oprL* no polares de *P. putida*. Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes QX, RX, AX, BX, PX y *oprB* se cultivaron en medio mínimo M9 con glucosa 0,4% (p/v) como fuente de carbono (y con kanamicina 50 µg/ml en el caso de *P. putida oprB*), y se recogieron por centrifugación en fase de crecimiento exponencial. Las preparaciones de proteínas de la membrana externa y el ensayo de inmunodetección se realizaron en las condiciones descritas en la leyenda de la Fig. 5.4, excepto que se utilizó un anticuerpo policlonal generado contra la proteína OprB de *P. aeruginosa*. En el margen izquierdo de la figura se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular en kDa. La flecha situada a la derecha de la figura indica la posición de la proteína OprB.

3.2. Análisis de la fracción de LPS de las cepas mutantes

Recientemente se ha descrito que la proteína TolA de *E. coli* está implicada en la biogénesis del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa (Gaspar *et al.*, 2000). Mediante electroforesis y tinción de plata específica para LPS, se analizó el posible efecto que las mutaciones en los genes *tol-oprL* ejercían sobre el LPS de la membrana externa de *P. putida*. Los mutantes *P. putida tol-oprL* mostraron el mismo patrón de bandas escalonado característico de la cadena lateral O del LPS que la cepa silvestre (Fig. 5.7). Como control, también se analizó la fracción de LPS de la cepa *P. putida* DOT-OX3, que presenta una mutación en el gen *wzy* que codifica para la polimerasa del antígeno O del LPS (Rodríguez-Herva *et al.*, 1999), por lo que no produce LPS con cadena lateral O. En esta cepa, el LPS no presentó el patrón de bandas de alto peso molecular característico de la cepa silvestre (Fig. 5.7).

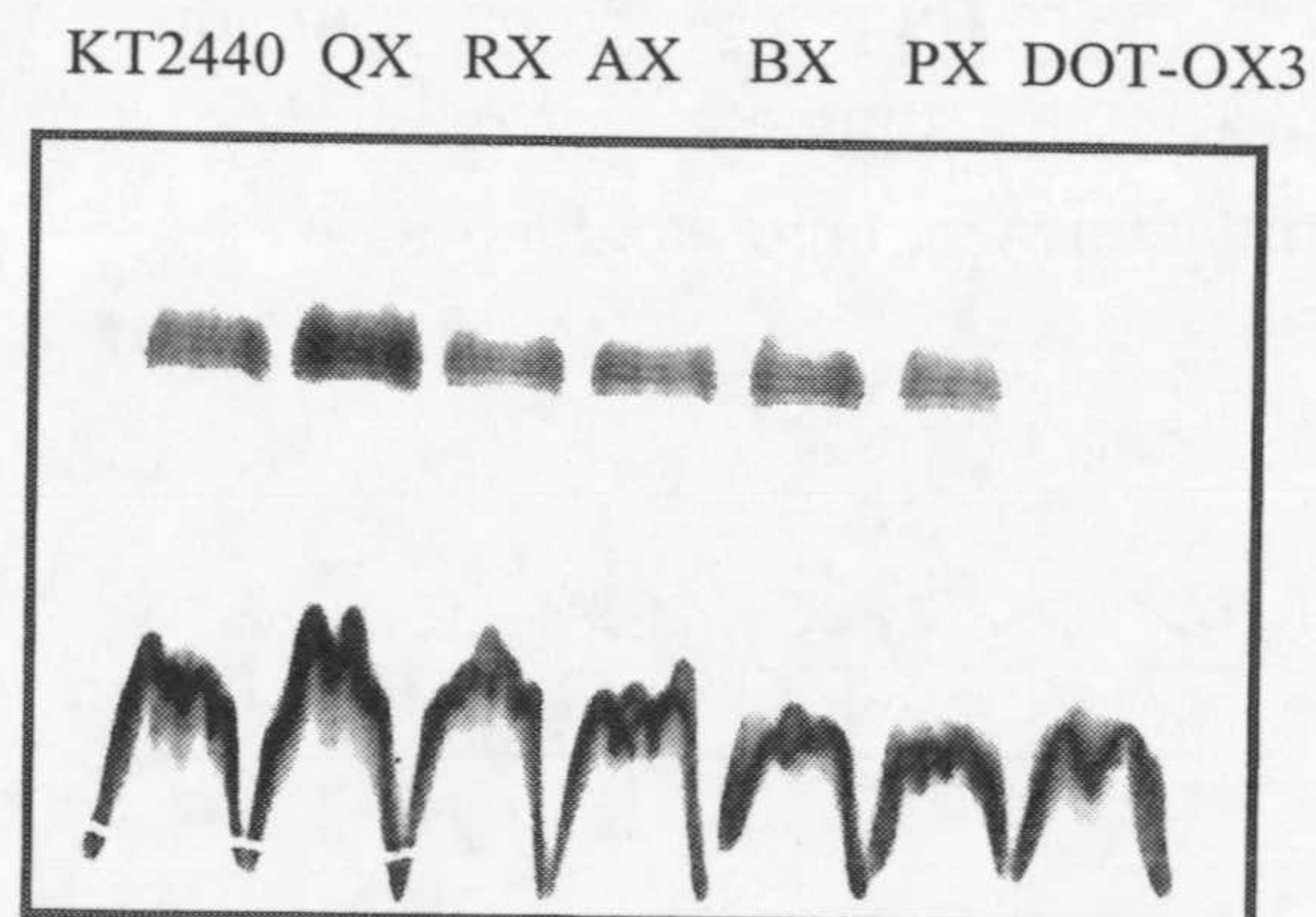


Figura 5.7. Análisis de la fracción de LPS de los mutantes *tol-oprL* no polares de *P. putida*. Células de *P. putida* KT2440, de los mutantes QX, RX, AX, BX, PX, y de DOT-OX3 (mutante incapaz de sintetizar el antígeno O del LPS), se cultivaron en medio LB líquido (con kanamicina 50 µg/ml y rifampicina 20 µg/ml en el caso de *P. putida* DOT-OX3) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Entonces, se recogieron por centrifugación y se prepararon las muestras de LPS, que se separaron mediante EGPA-SDS al 14% (p/v) y se visualizaron por tinción de plata, como se describió en el apartado 14 de la sección *Materiales y Métodos*.

4. LIBERACIÓN DE LA PROTEÍNA PERIPLÁSMICA DE UNIÓN A GLUCOSA (GBP) EN EL MEDIO EXTRACELULAR

En el Capítulo I se demostró que los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* liberan enzimas periplásmicos al medio extracelular. Con el fin de determinar si su defecto en la utilización de algunos carbohidratos se debía a la pérdida de las proteínas periplásmicas necesarias para el transporte de determinados compuestos, decidimos

analizar la posible presencia de la proteína periplásmica de unión a glucosa en el medio extracelular. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con glucosa 0,4% (p/v) como fuente de carbono para inducir la síntesis del sistema de transporte de glucosa y por tanto de la proteína periplásmica de unión a glucosa (GBP). La presencia de dicha proteína en el sobrenadante de cultivos celulares de la cepa silvestre y de los mutantes *P. putida tol-oprL*, se analizó mediante inmunodetección en membrana de nitrocelulosa con un anticuerpo policlonal generado contra la GBP de *P. aeruginosa*, que también reconocía la GBP de *P. putida*. Los mutantes no polares en los genes *tol-oprL* liberaron GBP al medio extracelular, como demostraba el hecho de que el anticuerpo anti-GBP reconociese a un producto de un tamaño similar al esperado (45 kDa) (Fig. 5.8). Por el contrario, en la cepa silvestre no se observó liberación de esta proteína, ni tampoco en el mutante *P. putida oprB* (Fig. 5.8). No obstante se debe indicar que la cantidad de GBP en los extractos de proteína celular total de los mutantes *tol-oprL* fue del orden del 90% de la detectada en la cepa silvestre (Fig. 5.8). Estos resultados sugieren que el defecto en la utilización de glucosa en los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* no se debe a la ausencia de la proteína periplásmica de unión a glucosa.

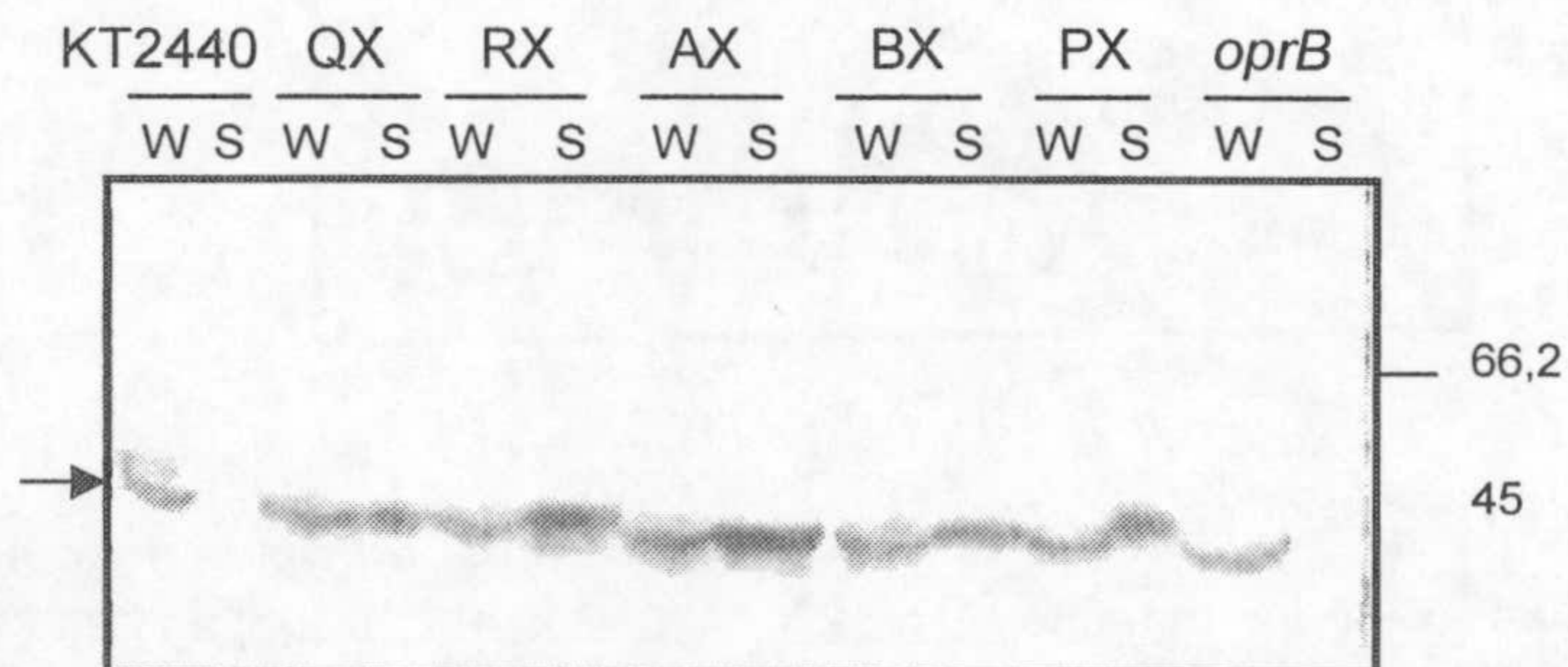


Figura 5.8. Liberación de la proteína periplásmica de unión a glucosa (GBP) en los mutantes no polares en los genes *tol-oprL* de *P. putida*. Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes QX, RX, AX, BX, PX y *oprB*, se cultivaron en medio mínimo M9 con glucosa 0,4% (p/v) como fuente de carbono (con kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de *P. putida oprB*) y se recogieron por centrifugación en fase de crecimiento exponencial. Se prepararon extractos de proteína celular total (W) y del sobrenadante (S) de dichos cultivos celulares como se indicó en el apartado 13 de la sección *Materiales y Métodos*. Las distintas muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (p/v) con SDS y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Se realizó una detección inmunológica usando un anticuerpo policlonal generado contra la enzima periplásmica GBP de *P. aeruginosa*. Los revelados se realizaron por métodos colorimétricos. Para el análisis de las muestras de sobrenadante celular se utilizaron 0,5 equivalentes de $\text{DO}_{660}\text{-ml/calle}$ y para el de los extractos de proteína celular total 0,3 equivalentes/calle. En el margen derecho de la figura se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular en kDa. La flecha situada en el margen izquierdo de la figura indica la posición de la proteína GBP.

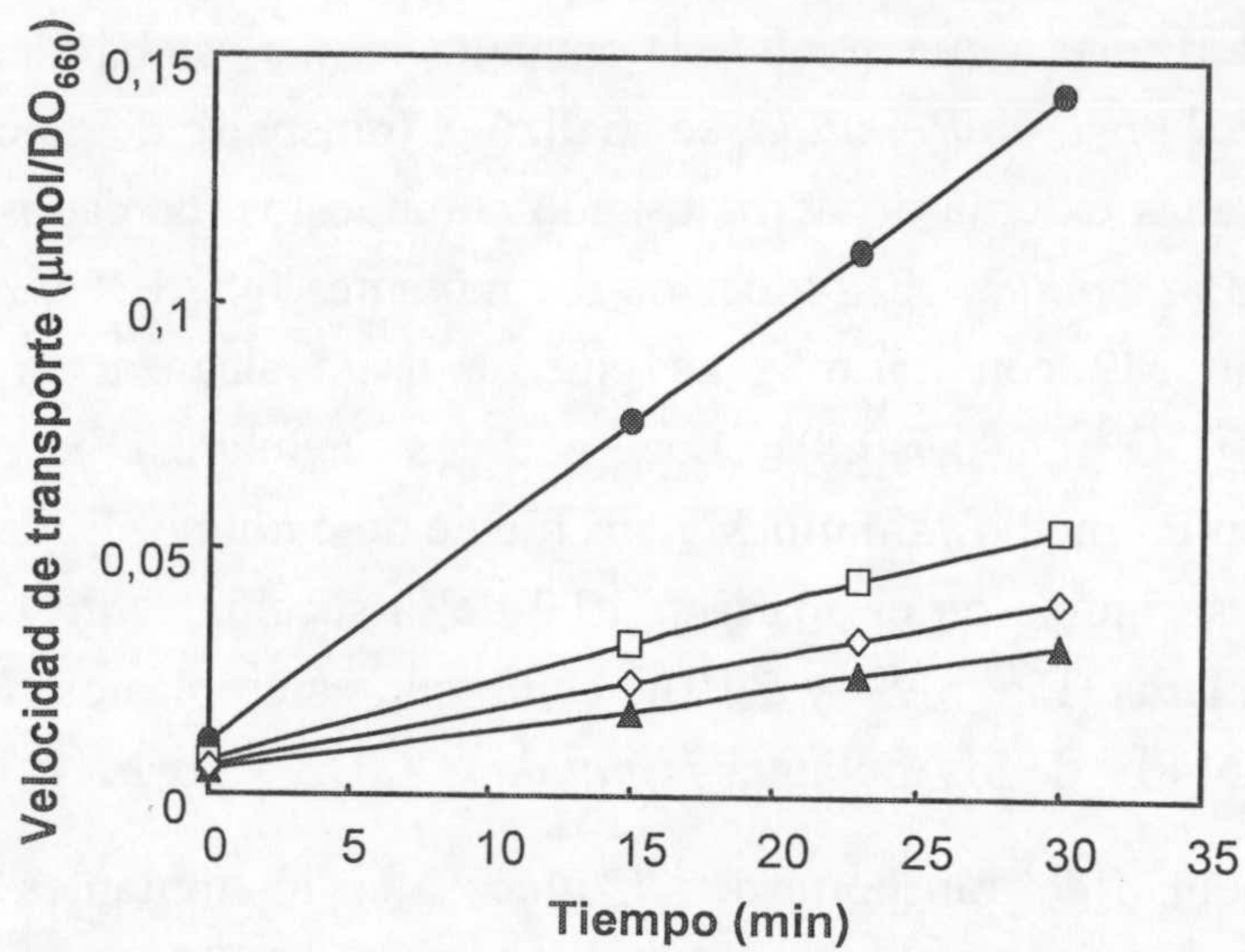
5. TRANSPORTE DE GLUCOSA Y GLICEROL A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS EXTERNA E INTERNA DE LOS MUTANTES *tol-oprL* DE *P. putida* KT2440

Para determinar a que nivel de la envuelta celular estaba afectado el transporte en los mutantes *tol-oprL* de *P. putida*, se analizó el transporte de glucosa y glicerol a nivel de las membranas externa e interna usando compuestos marcados radiactivamente con ^{14}C . Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes QX, BX y *oprB* se cultivaron en medio mínimo M9 con 25 mM de glucosa hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial ($\text{DO}_{660} \sim 0,7-0,8$). Los cultivos celulares se centrifugaron y se resuspendieron en medio mínimo M9 sin fuente de carbono. El ensayo de transporte se realizó como se indicó en el apartado 19.2 de la sección *Materiales y Métodos*, tanto con células enteras (Fig. 5.9A y 5.10A) como con esferoplastos (Fig. 5.9B y 5.10B) de *P. putida* KT2440 y de los mutantes *P. putida* QX, BX y *oprB*.

La velocidad de transporte de ^{14}C -glucosa en los mutantes QX y BX fue menor que en la cepa parental, tanto en células enteras (Fig. 5.9A) como a través únicamente de la membrana interna (Fig. 5.9B). En el caso del mutante *P. putida oprB*, la pérdida de la proteína OprB produce un descenso en la velocidad de entrada de glucosa a través de la membrana externa (Fig. 5.9A) pero no a través de la membrana interna como indica el hecho de que la velocidad de transporte de glucosa en esferoplastos de esta cepa sea igual a la de la cepa parental (Fig. 5.9B). Por otro lado, la velocidad de transporte de glucosa en esferoplastos de *P. putida* KT2440 (que carecen de membrana externa y de periplasma) fue menor que en células enteras (Fig. 5.9A y B). Esto indica que la entrada de glucosa a través de la envuelta celular de *P. putida* está significativamente favorecida por la presencia de la proteína periplásmica de unión a glucosa, y que en su ausencia se produce un descenso en la velocidad de transporte.

En el caso del glicerol, su velocidad de transporte también fue menor en los mutantes *P. putida* QX y BX que en la cepa parental, tanto a través de la envuelta celular (Fig. 5.10A) como a través sólo de la membrana interna (Fig. 5.10B). En el mutante *P. putida oprB*, la velocidad del transporte de glicerol fue similar a la de la cepa parental tanto en células enteras (Fig. 5.10A) como en esferoplastos (Fig. 5.10B). En este caso la pérdida de la proteína OprB no produjo un descenso en la velocidad del transporte de glicerol a través de la membrana externa (Fig. 5.10A). Esto parece indicar que en *P. putida* el glicerol no atraviesa la membrana externa a través de la proteína OprB, al contrario de lo que ocurre en *P. aeruginosa*, donde una mutación en el gen *oprB* produce un descenso en la velocidad del transporte de glicerol (Wylie y Worobec, 1995). Por otro lado, la velocidad de transporte de glicerol en *P. putida* KT2440 fue

A



B

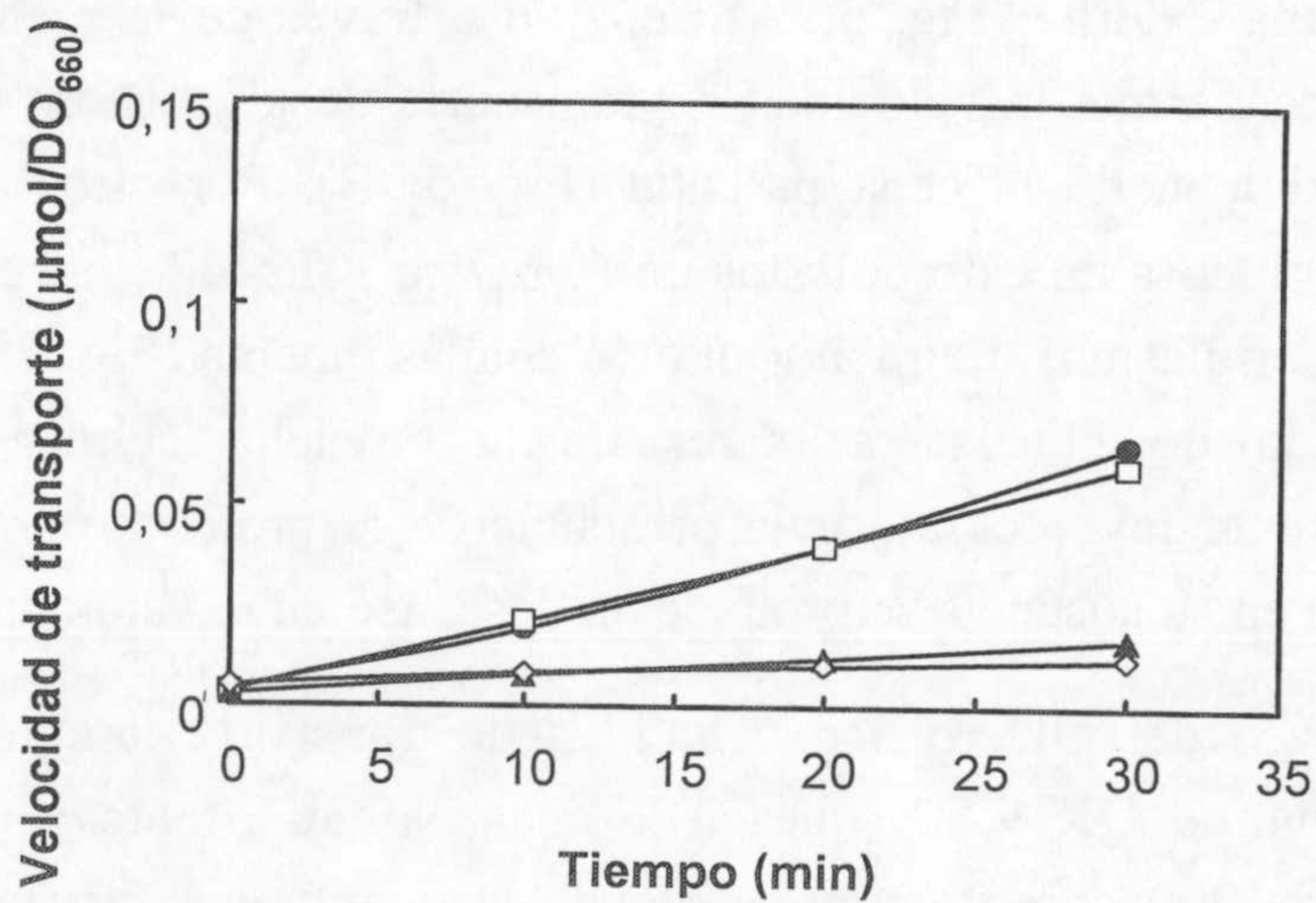


Figura 5.9. Transporte de ^{14}C -glucosa en *P. putida* KT2440 y en los mutantes *P. putida oprB*, QX y BX. Los ensayos se realizaron con células enteras (A) y con preparaciones de esferoplastos (B) de la cepa silvestre y cada uno de los mutantes. Células de *P. putida* KT2440 (círculos cerrados), QX (triángulos cerrados), BX (rombos abiertos) y *oprB* (cuadrados abiertos) se cultivaron en medio mínimo M9 con 25 mM de glucosa (y con kanamicina 50 µg/ml en el caso de *P. putida oprB*) hasta alcanzar una DO_{660} de 0,7-0,8. Las células se recogieron por centrifugación y el experimento de transporte se realizó como se describió en el apartado 19.2 de la sección *Materiales y Métodos*. En las gráficas se representan los valores medios obtenidos a partir de dos experimentos independientes. Los valores presentaron una desviación típica menor del 10% del valor dado.

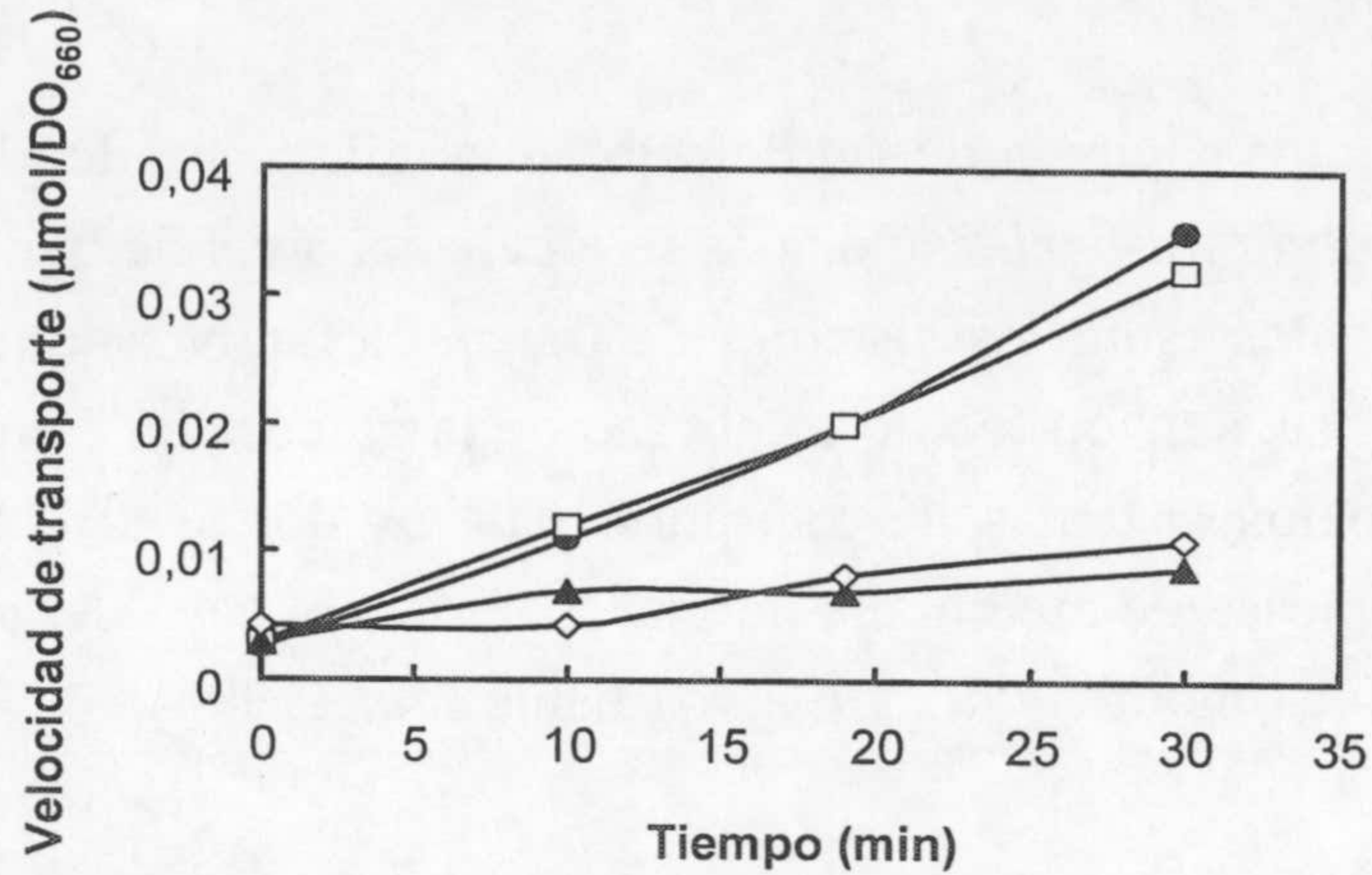
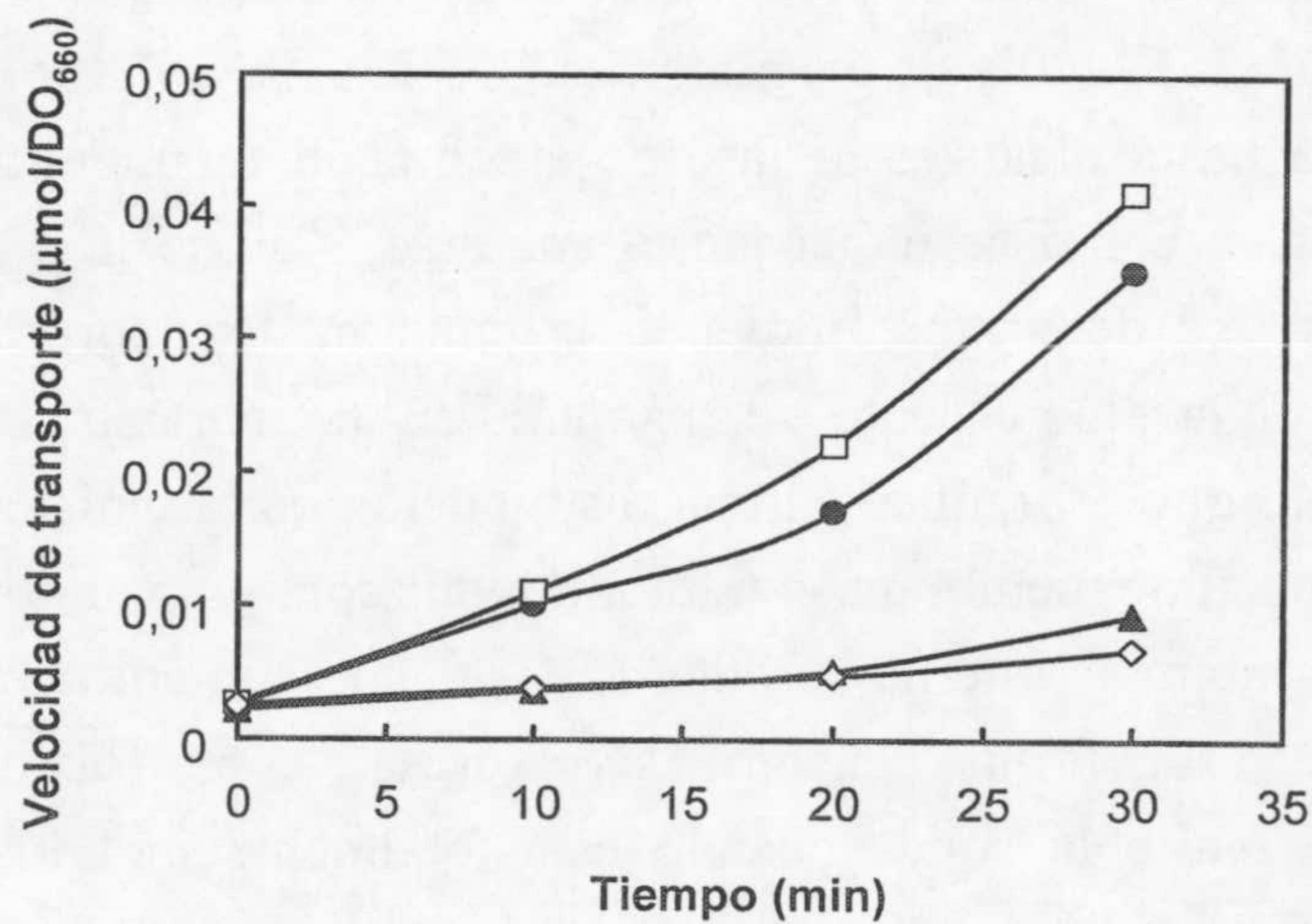
A**B**

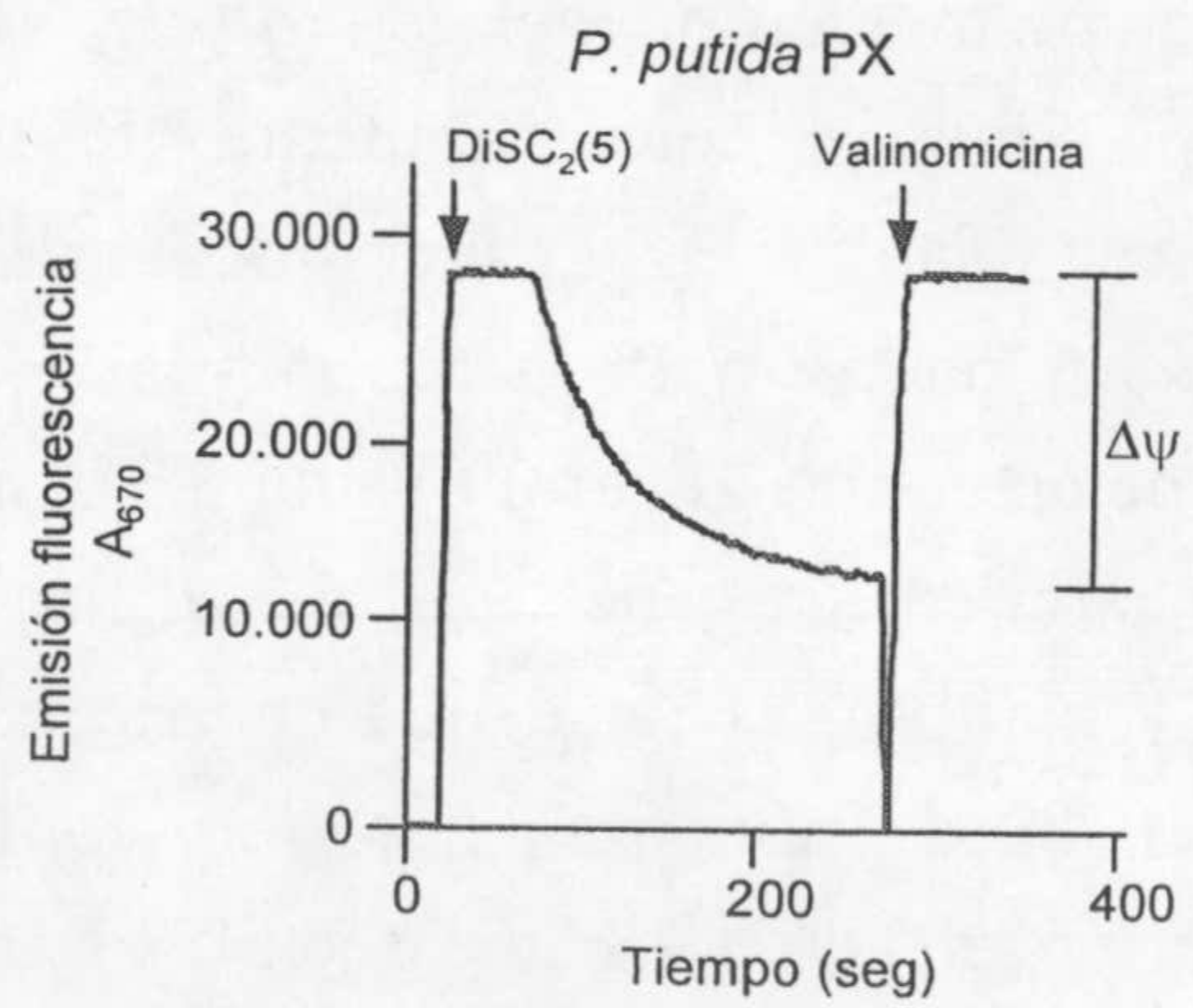
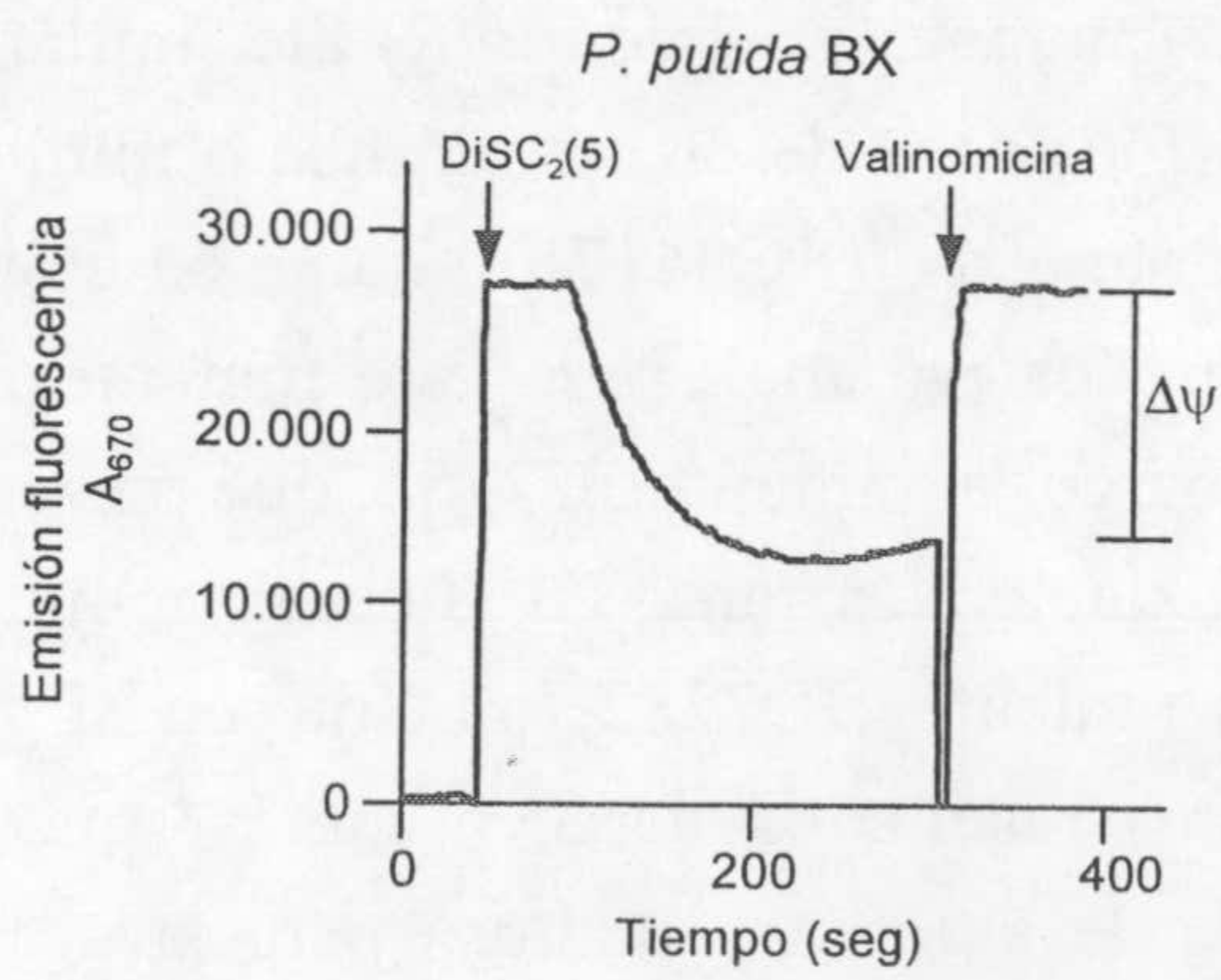
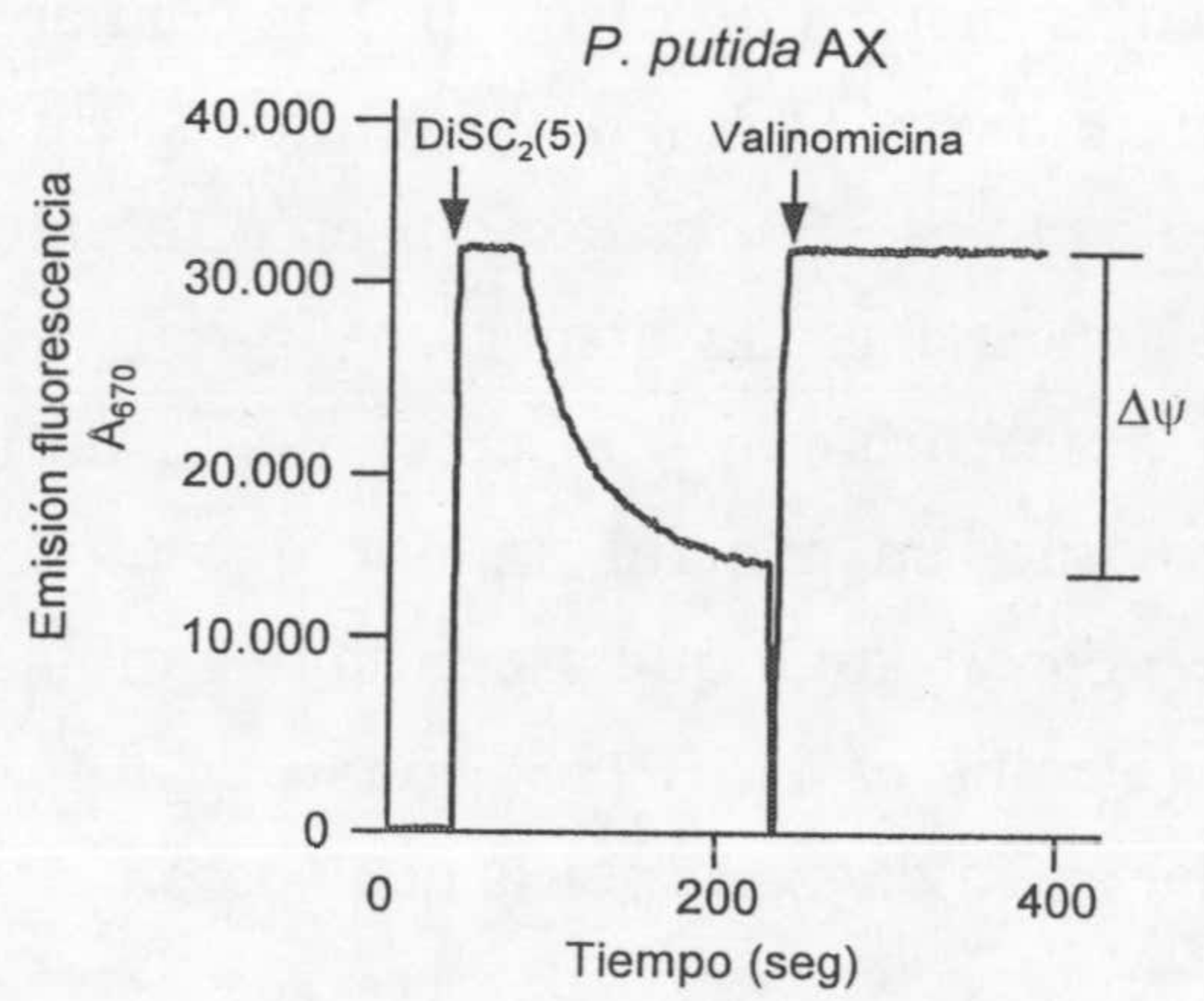
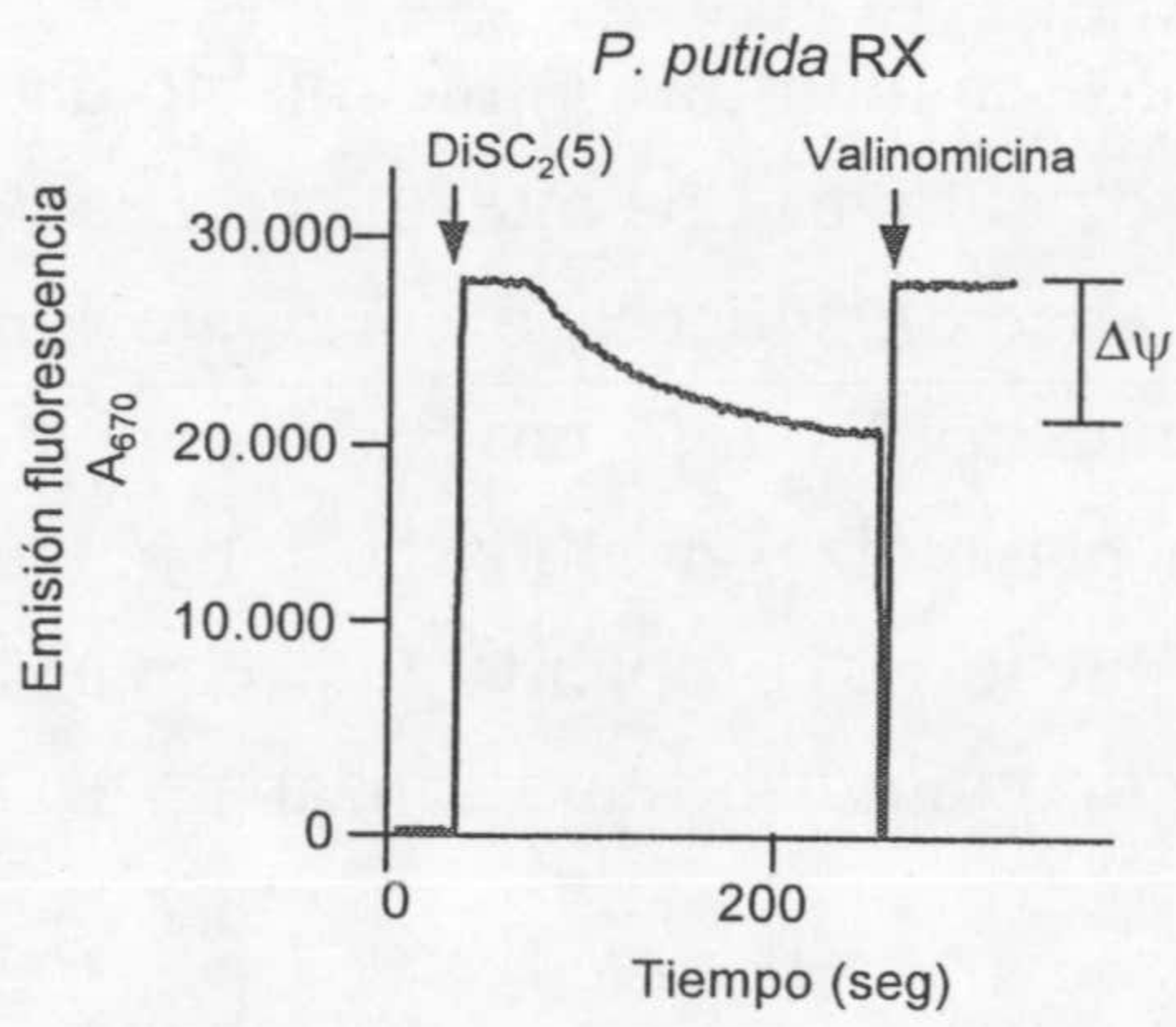
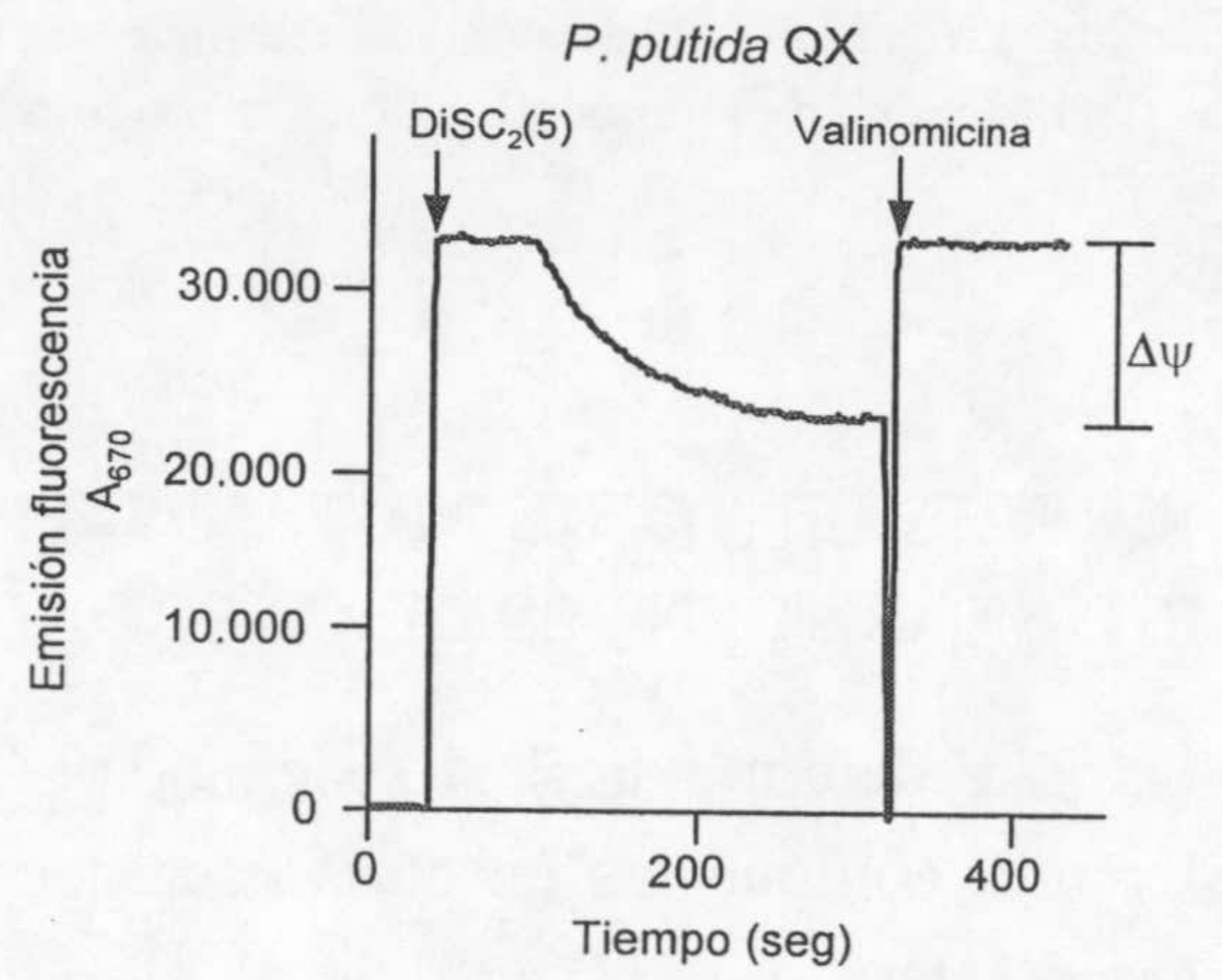
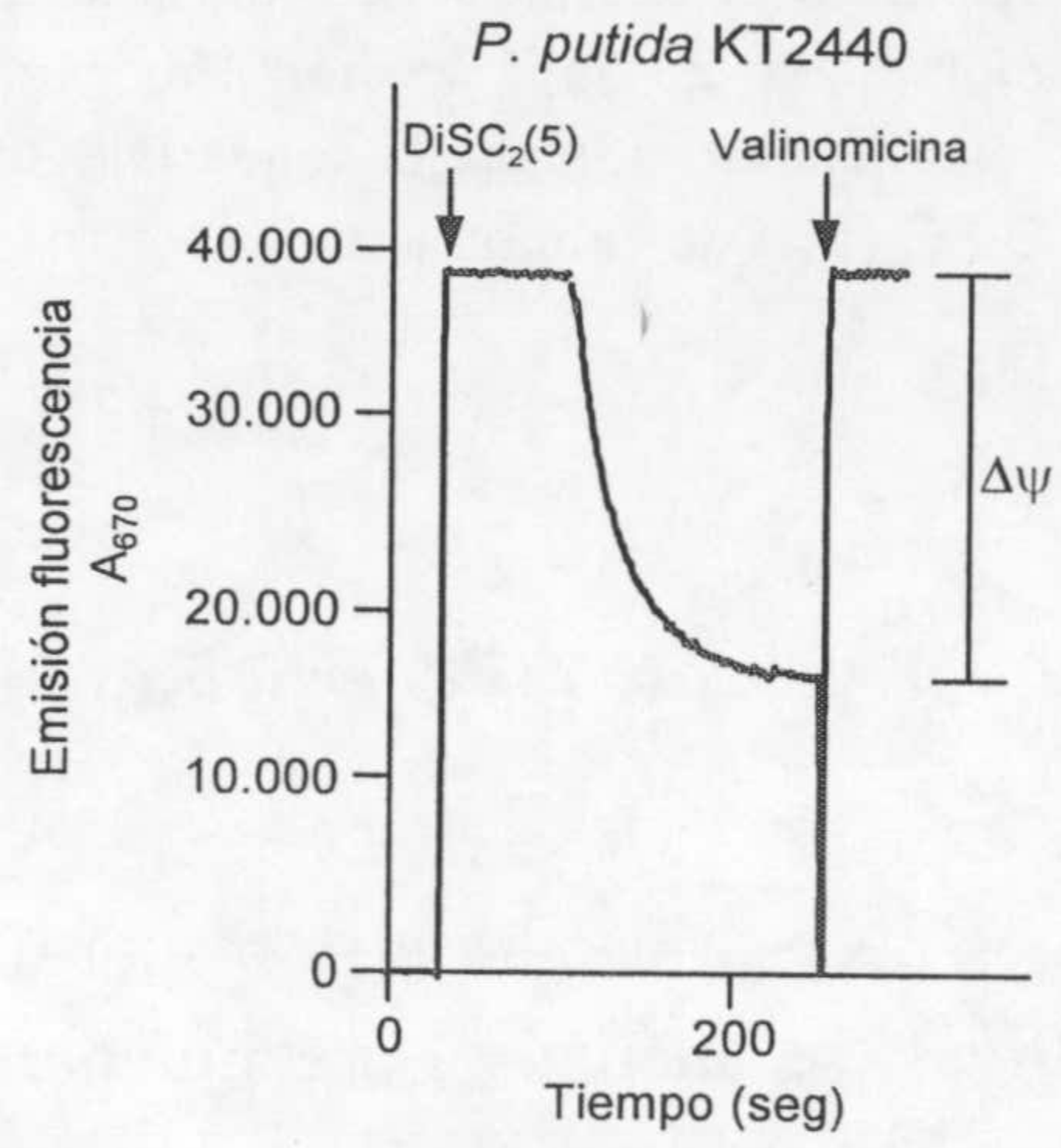
Figura 5.10. Transporte de ^{14}C -glicerol en *P. putida* KT2440 y en los mutantes *P. putida oprB*, QX y BX. Los ensayos se realizaron con células enteras (A) y con preparaciones de esferoplastos (B) de la cepa silvestre y de cada uno de los mutantes. Células de *P. putida* KT2440 (círculos cerrados), QX (triángulos cerrados), BX (rombos abiertos) y *oprB* (cuadrados abiertos) se cultivaron en medio mínimo M9 con 25 mM de glucosa (y con kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el caso de *P. putida oprB*) hasta alcanzar una DO_{660} de 0,7-0,8. Las células se recogieron por centrifugación y el experimento de transporte se realizó como se describió en el apartado 19.2 de la sección *Materiales y Métodos*. En las gráficas se representan los valores medios obtenidos a partir de dos experimentos independientes, siendo la desviación típica inferior al 10% del valor dado.

similar en esferoplastos y en células enteras (Fig. 5.10A y B), lo que sugiere que, al igual que ocurre en *P. aeruginosa* (Williams *et al.*, 1994) y *E. coli* (Weissenborn *et al.*, 1992), el transporte de glicerol en *P. putida* tampoco depende de una proteína de unión periplásmica (PBP).

Estos resultados sugieren que el defecto en la utilización de glucosa y glicerol en los mutantes *P. putida tol-oprL* estudiados se localiza a nivel de la membrana interna, y que estarían afectados tanto los sistemas de transporte activos, que requieren energía para llevar a cabo su función (como es el caso de la glucosa en *P. aeruginosa* [Sage *et al.*, 1996]), como los sistemas de transporte pasivos donde el compuesto difunde a través de una permeasa de membrana interna (como es el caso del glicerol en *E. coli* y *P. aeruginosa* [Weissenborn *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1994]).

6. DETERMINACIÓN DE LA FUERZA PROTÓN-MOTRIZ (pmf) EN LOS MUTANTES *tol-oprL* DE *P. putida* KT2440

Con el fin de determinar si la disminución en la velocidad de transporte de glucosa y glicerol a través de la membrana interna se debía a un problema energético, se analizó la generación de la fuerza protón-motriz en los mutantes *tol-oprL* de *P. putida*. Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes QX, RX, AX, BX y PX se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Las células se permeabilizaron tal y como se indicó en el apartado 19.1 de la sección *Materiales y Métodos*, y la pmf se determinó midiendo la emisión de fluorescencia de la sonda DiSC₂(5). Esta sonda fluorescente se acumula en membranas en las que se esté generando pmf y lo que se traduce en una disminución en la emisión de fluorescencia. Al disipar el potencial de membrana con un inhibidor como la valinomicina, la sonda se libera de la membrana interna produciéndose un aumento en la emisión de fluorescencia. De esta forma, la pmf se expresa como la diferencia entre la fluorescencia que emite la sonda cuando está totalmente incluida en la membrana interna y la que emite cuando es liberada. Según esto, la pmf en los mutantes *P. putida* AX, BX y PX, con respecto a la cepa silvestre, fue del 93,7%; 85,4% y 87,5%, respectivamente (Fig. 5.11). Es decir, en estos mutantes la pmf generada en la membrana interna fue similar a la de la cepa silvestre. Sin embargo, la pmf en los mutantes QX y RX fue algo menor que en la cepa parental (52,7% y 40,6%, respectivamente) (Fig. 5.11).



(Ver Leyenda en la página siguiente)

↑ **Figura 5.11. Medida de la fuerza protón-motriz ($\Delta\Psi$) en los mutantes *P. putida tol-oprL*.** Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes QX, RX, AX, BX y PX se cultivaron en medio LB líquido o en medio mínimo M9 con glucosa 0,4% (p/v) hasta alcanzar una DO_{660} de 0,3-0,4. Las células se recogieron por centrifugación y se prepararon esferoplastos como se describió en el apartado 19.1 de la sección *Materiales y Métodos*. El ensayo se realizó como se indicó en el apartado 20 de la sección *Materiales y Métodos*. La generación de $\Delta\Psi$ se determinó siguiendo la fluorescencia emitida por la sonda DiSC₂(5). Las flechas indican el momento en que se produjo la adición de DiSC₂(5) o de valinomicina.

7. CRECIMIENTO DE MUTANTES *tol-oprL(pal)* DE *E. coli* Y *P. aeruginosa* EN DISTINTAS FUENTES DE CARBONO

Para determinar si el sistema Tol-OprL(PAL) es necesario para el transporte de diferentes compuestos en otras bacterias gram negativas, se analizó el crecimiento de los mutantes *tol-oprL(pal)* de *P. aeruginosa* y *E. coli* en medio mínimo M9 con diferentes fuentes de carbono. Las células se incubaron durante 21h a 37°C tras lo cual se determinó la DO_{660} de los cultivos. En la Tabla 5.2 se muestra el crecimiento de los mutantes *tol* de *P. aeruginosa* en diferentes medio de cultivo. Los mutantes *tol1* y *tol2* fueron incapaces de crecer en arginina, fructosa, glicerol, glucosa o succinato como fuentes de carbono, y el crecimiento de los mutantes *tol4* y *tol6* en estos medios de cultivo fue, en general, menor que el de la cepa parental. Sin embargo, el mutante *P. aeruginosa tol5*, que presenta una mutación que puede ser complementada con el gen *tolQ* (Dennis *et al.*, 1996) creció en estos medios de cultivo hasta alcanzar un DO_{660} similar a la alcanzada por la cepa parental.

En el caso de *E. coli*, el crecimiento en glucosa o glicerol de los mutantes TPS13 (presenta una mutación en el gen *tolQ*) y TPS300 (mutante en el gen *tolR*) fue similar al de la cepa silvestre, pero el mutante TPS300 no fue capaz de crecer en medio mínimo con maltosa (Tabla 5.3). El crecimiento del mutante *E. coli* JC3417 (mutante en el gen *tolB*) en glucosa y maltosa fue similar al de la cepa parental, pero este mutante fue incapaz de crecer en glicerol (Tabla 5.3). Sin embargo, el mutante JC7752, que presenta una mutación en los genes *tolB* y *pal*, fue incapaz de crecer tanto en glicerol, como en glucosa y maltosa, al igual que ocurrió con los mutantes JC7782 (mutante en el gen *tolA*) y JC8031 (mutante en *tolR* y *tolA*). Estos resultados parecen indicar que la mutación en el gen *tolB* no afecta al transporte de glucosa y maltosa pero sí al del glicerol, mientras que las mutaciones que afectan a los genes *tolA* y *pal* producen un efecto más generalizado sobre el transporte de diferentes compuestos a través de la envuelta celular de *E. coli*.

TABLA 5.2. Crecimiento de los mutantes *tol-oprL* de *P. aeruginosa* en diferentes fuentes de carbono

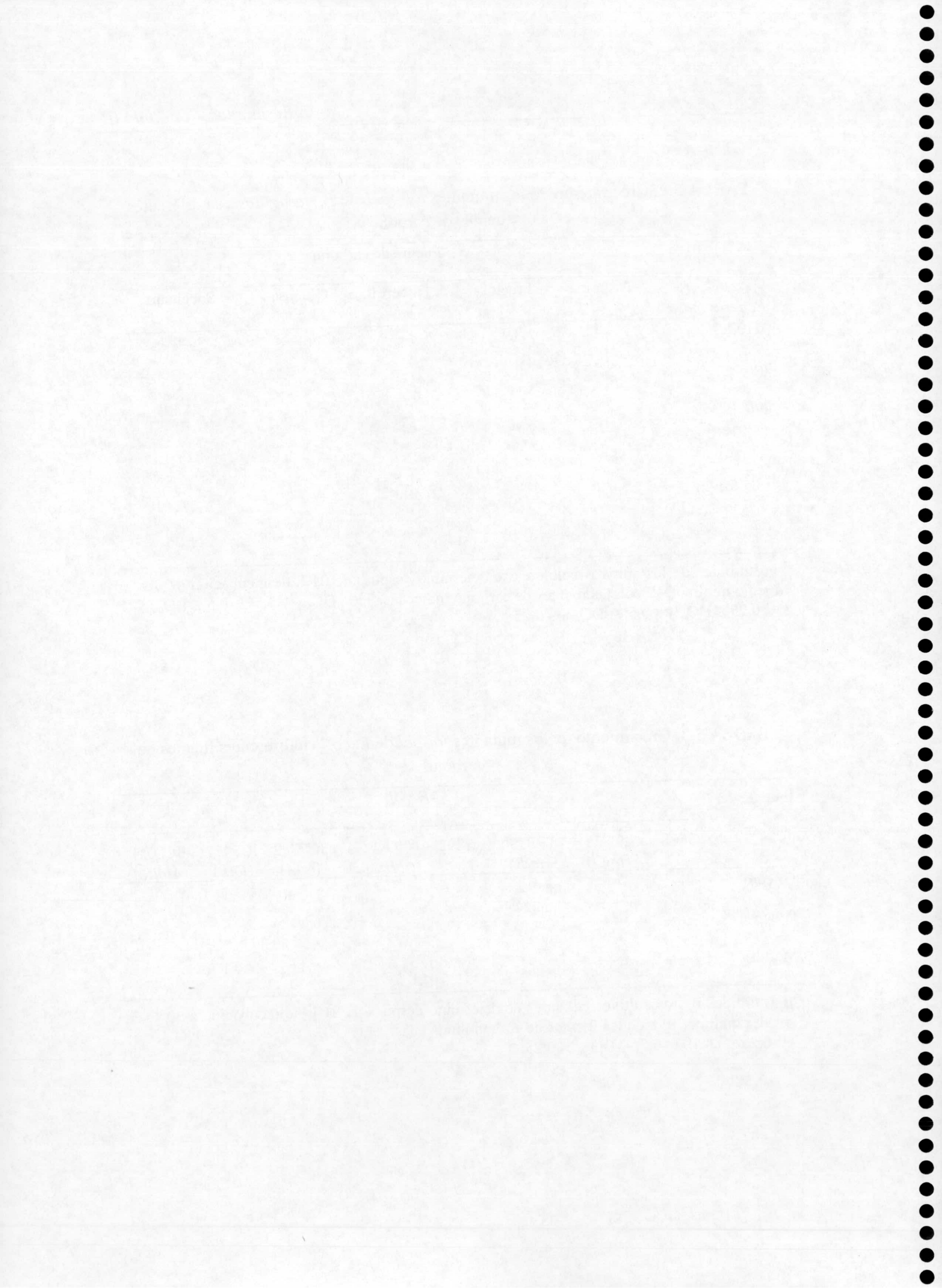
<i>P. aeruginosa</i>	^a Fuente de carbono				
	Arginina	Fructosa	Glicerol	Glucosa	Succinato
H103	++	+	+++	+++	++
<i>tol1</i>	-	-	-	-	-
<i>tol2</i>	-	-	-	+	+
<i>tol4</i>	-	-	+	+	++
<i>tol5 (tolQ)</i>	++	+	+++	+++	++
<i>tol6</i>	++	-	+	+++	++

^a La turbidez de los cultivos celulares se determinó después de 21 h de incubación a 30°C en medio mínimo M9 con las fuentes de carbono indicadas. +++, $DO_{660} \geq 1$; ++, $0,5 \leq DO_{660} < 1$; +, $0,25 \leq DO_{660} < 0,5$; -, $DO_{660} < 0,25$.

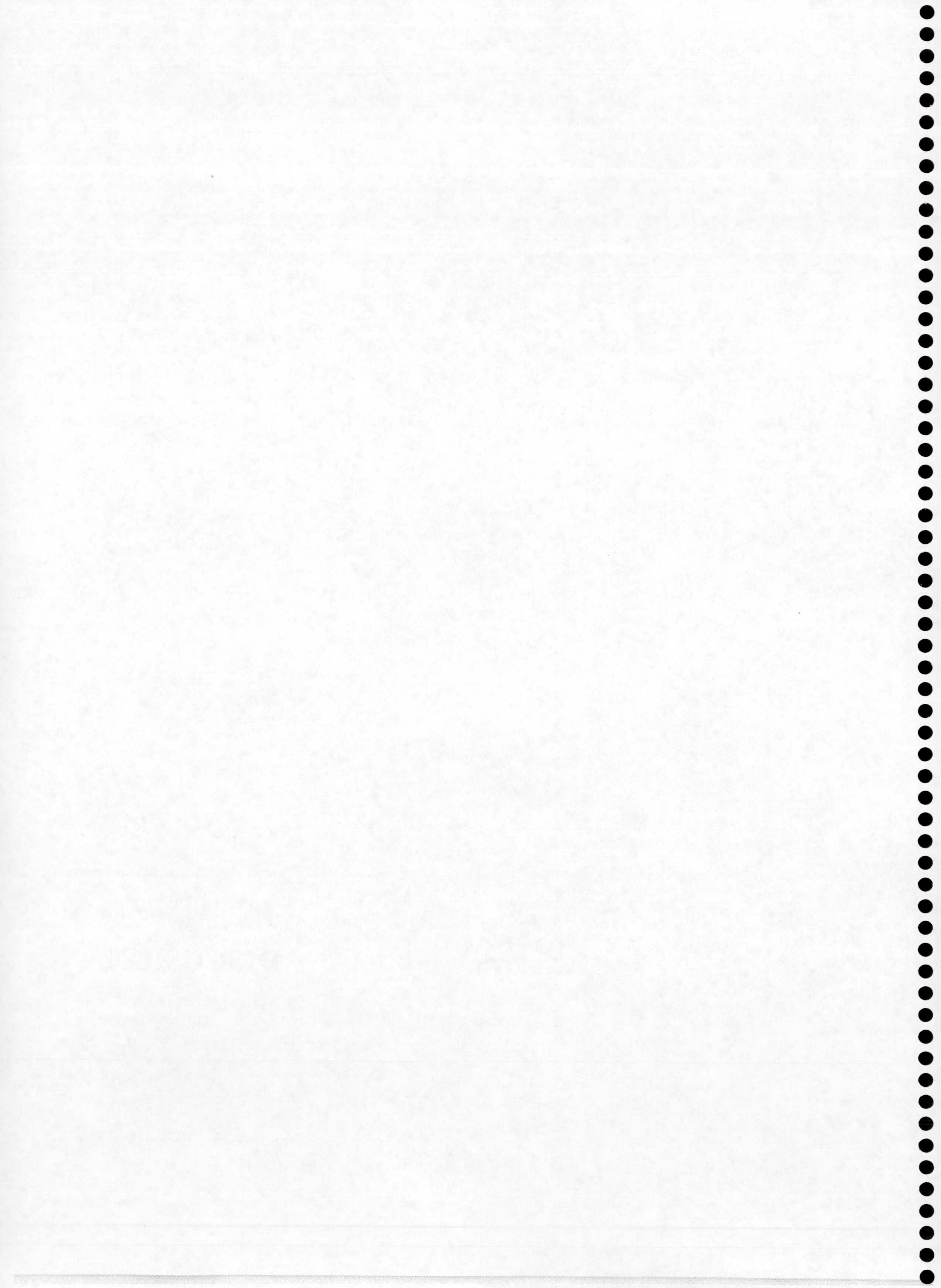
TABLA 5.3. Crecimiento de los mutantes *tol-pal* de *E. coli* en diferentes fuentes de carbono

^a Fuente de carbono	<i>E. coli</i>							
	GM1	TPS13 (<i>tolQ</i>)	TPS300 (<i>tolR</i>)	1292	JC7752 (<i>tolBΔpal</i>)	JC7782 (<i>tolA</i>)	JC3417 (<i>tolB</i>)	JC8031 (Δ <i>tolRA</i>)
Glicerol	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
Glucosa	+++	++	++	+++	+	-	+++	+
Maltosa	+++	+++	-	+++	-	-	+++	-

^a La turbidez de los cultivos celulares se determinó después de 21 h de incubación a 30°C en medio mínimo M9 con las fuentes de carbono indicadas. +++, $DO_{660} \geq 1$; ++, $0,5 \leq DO_{660} < 1$; +, $0,25 \leq DO_{660} < 0,5$; -, $DO_{660} < 0,25$.



DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

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

Dado que el contacto entre una célula bacteriana y su entorno tiene lugar a través de estructuras de la superficie celular, el estudio de la organización y la función de los distintos elementos que componen la envoltura celular es uno de los aspectos importantes para comprender como las bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de colonizar nichos ecológicos tan variados. Esta cuestión se ha estudiado con cierto detalle en el caso de algunas *Pseudomonas* patógenas, como *P. aeruginosa*, de la que se conoce la estructura y la función de muchos de los componentes de su envoltura celular, en particular los de la membrana externa (Burrows *et al.*, 1996; Hancock *et al.*, 1994; Nikaido y Hancock, 1986; Rivera y McGroarty, 1989). Sin embargo, *P. putida* apenas se ha estudiado a este nivel, habiéndose analizado hasta la fecha muy pocos genes que codifiquen proteínas de la envoltura celular.

Ramos-González y colaboradores (1992), en un estudio previo, generaron anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie de *P. putida* KT2440, y obtuvieron dos anticuerpos, denominados 7.3B y 7.5D. El anticuerpo 7.3B reconocía el antígeno O del LPS. Con el fin de identificar el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 7.5D, se generó, mediante mutagénesis por transposición al azar, un clon mutante que no expresaba dicho antígeno. Cuando se estudió la región de ADN interrumpida en este mutante, se encontró que el transposón se había insertado en el gen *oprL* de *P. putida*. Posteriormente, se secuenciaron las regiones de ADN adyacentes a dicho gen, encontrándose un conjunto de genes que mostraron gran similitud con los

denominados genes del sistema *tol-pal* de otras bacterias gram negativas. Este trabajo se ha centrado en la construcción y caracterización de cepas mutantes en los genes del sistema *tol-oprL* de *P. putida* KT2440, y en el análisis de su expresión génica, con objeto de dilucidar la función que este complejo proteico de membrana desempeña en *P. putida*.

I. SIMILITUDES ENTRE LOS SISTEMAS Tol-PAL(OprL) DE *E. coli* y de *P. putida*

En la Tabla 3.1 se resumieron las principales características de los genes del sistema *tol-oprL* (o “genes *tol-oprL*”) de *P. putida*, indicándose, además, el grado de identidad que dichos genes presentaron con los correspondientes genes *tol-pal* de *E. coli*, por ser éstos los más estudiados y los que van a servir de referencia constante a lo largo de esta discusión.

El primer gen de la agrupación *tol-oprL* de *P. putida* es *orf1*, que también está presente en el caso de otros sistemas *tol* secuenciados, aunque sólo se ha estudiado en el caso de *E. coli* (Sun y Webster, 1987; Vianney *et al.*, 1996) y recientemente en *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (Prouty *et al.*, 2002). Basándose en su localización citoplásmica y en la presencia de un supuesto motivo de “cremallera de leucina” de unión a ADN, se propuso en un principio que la proteína Orf1 de *E. coli* podía actuar como un regulador transcripcional de los genes *tol*. Sin embargo, pese a la alta similitud que presentan estas proteínas entre sí (Rodríguez-Herva, 1999; Sturgis, 2001), este supuesto motivo no se conserva en el resto de las proteínas Orf1, por lo que probablemente no tenga ningún significado. Además, se ha comprobado que un mutante *orf1::Cm* de *E. coli* (Clavel, 1996; Sun y Webster, 1987) no presenta el fenotipo típico de los mutantes Tol ni ningún otro fenotipo distintivo apreciable, por lo que su función aún no se ha podido establecer.

Corriente abajo de *orf1* se localizan los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA*. Los productos codificados por estos genes, ampliamente estudiados en *E. coli*, forman un complejo de membrana interna en el que las proteínas interaccionan entre sí a través de sus dominios transmembrana (Cascales *et al.*, 2001; Derouiche *et al.*, 1995; Germon *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1995). Estos dominios coinciden con las regiones más conservadas de las distintas proteínas (Cascales *et al.*, 2001). La similitud existente a nivel de estructura primaria entre las proteínas TolQ, TolR y TolA de *E. coli* y de *P. putida*, así como las predicciones de estructura secundaria para las mismas, sugieren que dichas proteínas adoptarían una conformación similar en ambos microorganismos. TolQ es la proteína más conservada de todas las del sistema *tol-oprL* (Rodríguez-Herva, 1999; Sturgis,

2001). Esto probablemente se deba al hecho de que TolQ es una proteína relativamente pequeña que posee tres segmentos transmembrana claves para su función (Cascales *et al.*, 2001) y que, por tanto, debe estar sometida a una fuerte presión selectiva. Sin embargo, pese a ser TolQ la proteína más conservada en su estructura primaria, la proteína TolQ de *P. putida* no consiguió complementar el defecto de tolerancia a colicinas de un mutante en el gen *tolQ* de *E. coli* (Rodríguez-Herva, 1999). Dado que TolQ juega un papel fundamental en el establecimiento de muchas de las interacciones necesarias para el funcionamiento del sistema Tol (Cascales *et al.*, 2000; Germon *et al.*, 1998), cabe la posibilidad de que el grado de homología requerido para la complementación sea aún mayor del existente. Así, por ejemplo, se ha propuesto mediante ensayos de supresión génica, que los residuos de las posiciones 26, 29 y 30 de TolQ de *E. coli* pueden interaccionar con el dominio transmembrana de TolA (Germon *et al.*, 1998), y curiosamente TolQ de *P. putida* y TolQ de *E. coli* difieren en los aminoácidos situados en estas tres posiciones. Por otro lado, usando un plásmido de alto número de copias se ha demostrado la existencia de complementación en el caso de la proteína TolR, ya que un mutante *tolR* de *E. coli* recuperó su fenotipo de sensibilidad a colicinas A y E3 tras transformarse con el gen *tolR* de *P. putida* (Rodríguez-Herva, 1999). Recientemente, Cascales y colaboradores. (2001) han demostrado la importancia del residuo 23 (D) de TolR en la interacción entre TolA y PAL. Este residuo del segmento transmembrana de TolR se encuentra altamente conservado entre las proteínas TolR de distintos microorganismos (Sturgis, 2001), incluido *P. putida* (Rodríguez-Herva, 1999). En el caso de TolA, el ensayo de complementación de un mutante de *E. coli* en el gen *tolA* con el gen *tolA* de *P. putida*, sólo se pudo realizar utilizando plásmidos de bajo número de copias y los resultados no mostraron ninguna complementación. Es posible que la proteína TolA de *P. putida* no pueda reemplazar a la proteína TolA de *E. coli* porque el tamaño de la de *P. putida* (372 aminoácidos) es considerablemente menor que la de *E. coli* (421 aminoácidos). Aún así, siempre queda la duda de si los genes *tol* de *P. putida* se están expresando o no adecuadamente en *E. coli*, especialmente tras observar los bajos valores de actividad β -galactosidasa de las fusiones traduccionales obtenidos en *E. coli* (Tabla 5.1). Dennis y colaboradores (1996) también estudiaron la capacidad de complementar mutaciones en *E. coli* con los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA* de *P. aeruginosa*, pero no lograron complementar ninguno de los mutantes de *E. coli* utilizados. En el caso de *tolR*, el diseño del ensayo de complementación fue inadecuado ya que utilizaron la colicina E1 para estudiar el fenotipo del mutante tras la complementación, y esta colicina no precisa de TolR para su entrada en la célula, por lo que un mutante *tolR* presentaría el mismo fenotipo que la cepa silvestre frente a esta colicina (James *et al.*, 1996). Un hecho interesante fue la capacidad de TolQ de *P. aeruginosa* para complementar un mutante *exbB* de *E. coli*

pero no un mutante *exbB* de *P. putida*. La explicación podría residir en el hecho de que incluso TolQ de *P. putida* (231 aminoácidos) guarda más similitud con ExbB de *E. coli* (244 aminoácidos) que con ExbB de *P. putida* (329 aminoácidos). Además, Bitter y colaboradores (1993) sugirieron que la causa de que un mutante *P. putida exbB* presentase un claro fenotipo *tonB* (una vez descartado un efecto polar de la mutación), mientras que un mutante *exbB* de *E. coli* presentaba tan sólo un fenotipo *tonB* parcial, podría ser la incapacidad de TolQ de *P. putida* para complementar parcialmente esta mutación, complementación que en cambio sí se producía en *E. coli* (Braun, 1989).

Corriente abajo del gen *tolA* se localizan los genes *tolB* y *oprL*. El producto del gen *tolB* de *P. putida* es una proteína de 433 aminoácidos para lo que se predice un péptido señal de 21 aminoácidos y presenta un 43,4% de identidad con la proteína TolB de *E. coli*. Se sabe que la proteína TolB de *E. coli*, una vez procesada, se localiza en el periplasma (Isnard *et al.*, 1994). La similitud existente a nivel de estructura primaria con TolB de *E. coli* y la predicciones de topología de esta proteína de *P. putida* (Rodríguez-Herva, 1999), sugieren que TolB de *P. putida* también es una proteína periplásmica, aunque en este trabajo no se aportan pruebas experimentales al respecto. Como se mencionó en la *Introducción*, se ha demostrado tanto la interacción *in vitro* de TolB de *E. coli* con las proteínas de la membrana externa OmpF, OmpC, PhoE y LamB (Rigal *et al.*, 1997), como su interacción *in vivo* con PAL, OmpA y Lpp (Bouveret *et al.*, 1995; Clavel *et al.*, 1998). En relación a ésta última, se han estudiado distintas proteínas mutantes TolB de *E. coli* afectadas en su estabilidad o en su capacidad de interacción con las proteínas mencionadas, y se han definido los aminoácidos responsables (Clavel *et al.*, 1998). De esta forma, cambios como el de la histidina 125 a asparagina, o la serina 384 a fenilalanina (numerados sobre la forma madura de la proteína), producen una proteína TolB altamente inestable, mientras que otros como el cambio de la alanina 227 a valina, o la inserción de dos aminoácidos (EL) en la posición 135 de la proteína, provocan la pérdida de las interacciones con Lpp, OmpA y PAL, o sólo con las dos primeras, respectivamente. Estas posiciones, tan importantes para la función de TolB de *E. coli*, se conservan totalmente en TolB de *P. putida*. Por otro lado, la proteína OprL de *P. putida*, mostró una alta similitud a nivel de estructura primaria con las lipoproteínas asociadas al peptidoglicano (PAL) de otras bacterias gram negativas, así como una similitud parcial con los dominios carboxilo terminales de proteínas asociadas al peptidoglicano, como OmpA de distintos microorganismos y OprF de varias pseudomonádaceas (Rodríguez-Herva *et al.*, 1996; Rodríguez-Herva, 1999). El análisis electroforético de la fracción de proteínas asociadas al peptidoglicano de la cepa *P. putida* KT2440 y el mutante *P. putida* PX, demostró la interacción de la proteína OprL de *P. putida* con el peptidoglicano (Rodríguez-Herva y Ramos, 1996). Además, la naturaleza lipoproteica de esta proteína se confirmó usando el antibiótico

globomicina, que es un inhibidor específico de la enzima peptidasa señal II que reconoce específicamente el péptido señal de lipoproteínas (Rodríguez-Herva, 1999). Experimentos de fraccionamiento subcelular han demostrado además, que las proteínas PAL de *E. coli* y *H. influenzae*, y la proteína OprL de *P. aeruginosa*, están situadas en la membrana externa (Chen y Henning, 1987; Lim *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 1988). En el curso de este trabajo se ha demostrado que la proteína OprL de *P. putida*, también se localiza en la membrana externa como se observa al comparar el análisis electroforético de las proteínas de la membrana externa del mutante *P. putida* PX con las de su cepa parental (Fig. 5.1). Además, en ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo monoclonal MA1-6, se ha podido detectar la proteína OprL expuesta en la superficie de la membrana externa de la cepa DOT-OX3 (que carece del antígeno O del LPS) (no mostrado), lo que confirma observaciones previas de Mutharia y Hancock (1985). Paralelamente al estudio por mutagénesis de TolB de *E. coli*, Clavel y colaboradores (1998) también han analizado los residuos de la proteína PAL que influyen en su interacción con TolB. Así, se ha determinado que cambios como el de la treonina 93 a isoleucina, o el glutámico 102 a lisina, provocan una pérdida completa de la interacción, mientras que los de glicina 101 a aspártico, y glutámico 130 a lisina, la disminuyen enormemente. Los aminoácidos de estas posiciones se encuentran relativamente conservados en todas las proteínas PAL, siendo idénticos entre PAL de *E. coli* y OprL de *P. putida* (Rodríguez-Herva, 1999). Clavel y colaboradores (1998) sugieren que existe un solapamiento entre los dominios de PAL que interaccionan con TolB y con el peptidoglicano. Sin embargo, una vez más, dichos estudios no demuestran que estos aminoácidos intervengan directamente en la unión. Probablemente, en muchos casos, su función sea la de mantener la conformación necesaria para que se produzcan los contactos adecuados, de ahí la presión selectiva que parece existir para conservar la estructura de este dominio carboxilo terminal. En referencia al posible solapamiento entre las regiones de PAL implicadas en la interacción con TolB y el peptidoglicano, es interesante destacar el hecho de que en los experimentos de entrecruzamiento con formaldehído realizados por Bouveret y colaboradores (1995) donde demuestran la interacción *in vivo* entre PAL y TolB, los complejos PAL-TolB se consiguieron solubilizar a 37°C en presencia de SDS, a pesar de que PAL necesita temperaturas muy superiores para disociarse del peptidoglicano. Esto podría significar que la fracción de PAL que interacciona con TolB no lo hace simultáneamente con el peptidoglicano o, al menos, no interaccionaría de una forma tan firme.

El último gen de la agrupación *tol-oprL* encontrado en *P. putida* es *orf2*. Experimentos de fraccionamiento subcelular han demostrado que en *E. coli* la proteína Orf2 es una proteína periplásmica, pero hasta el momento no se conoce su función

puesto que un mutante *orf2::Km* de *E. coli* no posee ningún fenotipo obvio que lo diferencie de la cepa silvestre (Clavel, 1996; Vianney *et al.*, 1996). Sin embargo, resultados preliminares no publicados, del grupo de J. C. Lazzaroni, sugieren que este mutante está algo alterado en el contenido en porinas de la membrana externa. Estos autores también han sugerido una posible interacción de la proteína Orf2 con PAL y TolB, pese a que experimentos previos de entrecruzamiento con formaldehído habían resultado negativos (Lazdunski *et al.*, 1998; Vianney *et al.*, 1996). Experimentos de fusión de *orf2* de *P. putida* con '*phoA*, (Rodríguez-Herva, 1999) han demostrado que dicha región realmente codifica un producto que se exporta a través de la membrana interna y que probablemente se localice enteramente en el periplasma. Es probable que este gen no sea muy relevante para el funcionamiento del sistema Tol, porque en *H. influenzae* no existe, al menos corriente abajo de PAL (Fleischmann *et al.*, 1995), y en algunas cepas de *P. aeruginosa* está interrumpido por un elemento de inserción (Lim *et al.*, 1997).

II. LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA ESTÁ ALTERADA EN LOS MUTANTES *tol-oprL* DE *P. putida*

En este trabajo, hemos construido mutantes polares (mediante la inserción de un interposón de Km flanqueado por los terminadores transcripcionales del gen 32 del fago T4) y mutantes no polares (mediante la inserción del gen *xylE* sin promotor ni secuencias de terminación de la transcripción) de cada uno de los genes de la agrupación *tol-oprL* de *P. putida*. La eficacia de estas secuencias del fago T4 como terminadores de la transcripción ha sido demostrada previamente tanto *in vivo* como *in vitro* por otros investigadores (Prentki y Krisch, 1984). Aunque a lo largo de este trabajo se ha intentado en numerosas ocasiones complementar dichas mutaciones usando diferentes vectores de expresión (tanto de medio como de bajo número de copias) que contenían todos los genes del sistema, los genes *orf1*, *tolQ* y *tolR*, o sólo el gen *tolB*, nunca se han obtenido transconjugantes (o transformantes) capaces de mantener esos plásmidos, ni siquiera en el caso de la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de las proteínas Tol-OprL podría resultar tóxica para *P. putida*, lo cual apoyaría la hipótesis de que el mantenimiento de la estequiometría del complejo Tol es fundamental para su estabilidad, como habían sugerido previamente otros autores (Bernadac *et al.*, 1998; Lazzaroni y Portalier, 1981). Esta hipótesis también explicaría porque todos los mutantes caracterizados en este trabajo, tanto polares como no polares, presentan un fenotipo similar, ya que la pérdida de cualquiera de los componentes del sistema Tol-OprL bastaría para desestabilizar todo el complejo proteico.

Por otra parte, en contraste con *P. aeruginosa*, en la que se ha sugerido que la inactivación de los genes *tolQ* o *tolA* es letal para la bacteria (Dennis *et al.*, 1996), en *P. putida* todas las cepas mutantes en los genes *tol-oprL* han sido viables, aunque su supervivencia a corto y a largo plazo fue menor que la de la cepa silvestre. Mientras que en placas de LB sólido a 4°C la cepa parental es viable durante 3 meses y durante varios años en glicerol 40% (v/v) a -80°C, ninguno de los mutantes *tol-oprL* construidos en este trabajo sobrevivió más de un mes en placas de LB a 4°C, y ninguno fue viable tras un año de almacenamiento a -80°C. Esta menor viabilidad de los mutantes podría estar relacionada con las alteraciones que presentan en su envuelta celular. Estas alteraciones se hicieron evidentes al analizar los mutantes *tol-oprL* mediante microscopía electrónica de barrido. Dichos mutantes presentaban con frecuencia vesículas de membrana en su superficie celular. Con el microscopio electrónico de transmisión no se pudo observar, sin embargo, la presencia de estas vesículas de membrana, debido probablemente a que éstas se rompen en los pasos de centrifugación a los que se someten los cultivos celulares durante la recogida y lavado de las células durante el proceso de fijación, lo que ha sido también descrito en el caso de mutantes *lpo* de *E. coli* (Fung *et al.*, 1978). La formación de estas vesículas de membrana fue más frecuente en los mutantes *tolQ*, *tolR* y *tolA* que en los mutantes *tolB* y *oprL*, lo que coincide con las observaciones realizadas previamente en *E. coli*, donde la formación de vesículas también fue más frecuente en los mutantes en los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA* que en los mutantes en *tolB* o *pal* (Bernadac *et al.*, 1998).

En este estudio, también hemos analizado el patrón de resistencia/sensibilidad a varios antibióticos y otros agentes químicos (como SDS, DOC y EDTA) de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida*, como método para estudiar si la permeabilidad de la membrana externa estaba alterada. En general, todos los mutantes fueron más sensibles que la cepa parental a todos los compuestos probados, aunque los mutantes BX (contiene una mutación en el gen *tolB*) y PX (contiene una mutación en el gen *oprL*) fueron los más sensibles a estos compuestos. Mills y Holloway (1976) describieron un posible mutante *tol* de *P. aeruginosa* (seleccionado por su tolerancia a la piocina AP41) que mostraba una hipersensibilidad específica a aminoglicósidos pero no a otros compuestos. Sin embargo, en *P. putida* las mutaciones en los genes *tol-oprL* producen un patrón de sensibilidad a antibióticos más amplio. Puesto que los mecanismos de resistencia hacia varios de los compuestos probados poseen una base fisiológica diferente, la mayor sensibilidad a estos compuestos de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* construidos en este trabajo no puede ser atribuida específicamente a un defecto en la función de la membrana externa como barrera hidrofóbica, a la inactivación de sus bombas de eflujo, o a otra deficiencia particular de la misma. Más

bien parece que los mutantes *tol-oprL* muestran una alteración generalizada en la permeabilidad de su membrana externa.

Otro de los fenotipos que presentan todos los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* es el de la filamentación. Esta característica también se observó en el caso de un presunto mutante *tol* de *P. aeruginosa* (seleccionado como un mutante espontáneo tolerante a la piocina AP41) y en los mutantes *tol* de *V. cholerae* (Heilpern y Waldor, 2000; Holloway *et al.*, 1973). Meury y Devilliers (1999) han descrito un mutante en el gen *tolA* de *E. coli* que forma filamentos celulares aunque sólo cuando es cultivado en medios con baja o alta osmolaridad. Junto a este fenómeno de filamentación, en estas condiciones de cultivo estos autores también observaron la presencia de células con un tabique oblicuo de septación y de numerosas células sin núcleo. Basándose en estos resultados, estos autores han sugerido que la proteína TolA podría desempeñar un papel en la formación del tabique de división entre las células. Nuestros análisis al microscopio electrónico de transmisión de los mutantes en el gen *tolA* no apoyan esta teoría en el caso de *P. putida*. De hecho, todos los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* forman filamentos relativamente cortos en los que las células parecen encontrarse en un estadio bastante avanzado del proceso de división celular. Por tanto, las proteínas del sistema Tol-OprL podrían estar directa o indirectamente implicadas en las últimas fases del proceso de división celular, aunque no parecen ser esenciales para completar dicho proceso.

Por otra parte, uno de los fenotipos más característicos de los mutantes *tol-pal* de *E. coli* es la liberación de enzimas periplásmicos y de proteínas de la membrana externa al medio extracelular (Bernadac *et al.*, 1998). De hecho, muchos de estos mutantes se aislaron originariamente como mutantes “excretores” y se denominaron *exc* o *lky* (Bernadac *et al.*, 1998; Fognini-Lefebvre *et al.*, 1987; Lazzaroni y Portalier, 1981; Lazzaroni y Portalier, 1992). En el presente trabajo se ha demostrado que los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* liberan al medio de cultivo la enzima β -lactamasa de codificación plasmídica y la proteína periplásmica de unión a la glucosa (GBP) (Fig. 3.5B y 5.8, respectivamente), así como la proteína de membrana externa OprF (Fig. 3.5C). Sin embargo, en el caso de *P. putida* los mutantes *tol* no liberaron la proteína OprL al medio extracelular, mientras que su homóloga PAL de *E. coli* sí se detectó en las vesículas de la membrana externa liberadas por los mutantes *tol* de *E. coli* (Bernadac *et al.*, 1998). Estas liberaciones afectaron exclusivamente a proteínas periplásmicas y a algunas proteínas de la membrana externa, ya que nunca se detectó la presencia en el medio de cultivo de la proteína RpoS, usada como marcador citoplásmico (no mostrado). En conjunto, nuestros resultados demuestran que las cepas de *P. putida* con mutaciones en

los genes *tol-oprL* son viables aunque presenten defectos en su morfología celular y una membrana externa alterada, tanto en su estructura como en su función.

III. LOS GENES *tol-oprL* DE *P. putida* ESTÁN ORGANIZADOS EN DOS UNIDADES TRANSCRIPCIONALES.

Los genes del sistema Tol-PAL(OprL) están muy conservados en las bacterias gram negativas (Sturgis, 2001), pero su organización transcripcional sólo se ha estudiado en algunos casos (Duan *et al.*, 2000; Lafontaine y Sokol, 1998; Muller y Webster, 1997; Sen *et al.*, 1996; Vianney *et al.*, 1996), y la mayor parte de esos estudios se han basado en el análisis de fusiones génicas. Además, la mayoría de los intentos para determinar los sitios de iniciación de la transcripción de los promotores de los genes *tol-oprL(pal)* en esos microorganismos nunca han tenido éxito, debido principalmente a su bajo nivel de expresión, y quizá también a la inestabilidad o rápida degradación de sus ARNm (Duan *et al.*, 2000; Muller y Webster, 1987; Vianney *et al.*, 1996). El uso de otras estrategias para caracterizar el ARNm de estos genes, como por ejemplo su análisis a partir de su sobreexpresión desde plámidos, ha conducido a interpretaciones erróneas de los resultados obtenidos (Duan *et al.*, 2000; Lafontaine y Sokol, 1998). Por esta razón en este estudio decidimos usar, como fuente para nuestros análisis, el ARNm total aislado de la cepa silvestre. De esta forma hemos demostrado que los genes *tol-oprL* de *P. putida* están agrupados en dos unidades transcripcionales, *orf1-tolQ-tolR-tolA-tolB* y *oprL-orf2*, y hemos identificado los sitios de iniciación de la transcripción de los promotores de ambas unidades transcripcionales (llamados P₁ y P_L, respectivamente). En el primer operón, los genes *orf1* y *tolQ* están separados por 2 pb, y *tolQ* y *tolR* por 14 pb, mientras que *tolA* solapa con *tolR* y *tolB* (en 1 y 4 pb, respectivamente) (Tabla 3.1). En el segundo operón, *oprL* está separado de *orf2* por 6 pb, y la distancia que separa las secuencias codificantes de ambos operones es de 54 pb (Fig. 6.1A). Esta organización es prácticamente idéntica a la de los genes *tol-oprL* de *P. aeruginosa*, pero sorprendentemente, la organización transcripcional es diferente en ambas bacterias. En *P. aeruginosa*, basándose en el análisis de diversas fusiones transcripcionales, se ha propuesto la existencia de tres regiones promotoras: P₁, P_B y P_P situadas delante de *orf1*, *tolB* y *oprL*, respectivamente (Duan *et al.*, 2000) (Fig. 6.1B). En *E. coli*, sólo se ha propuesto la existencia de dos unidades transcripcionales: *orf1-tolQ-tolR-tolA* y *tolB-pal-orf2* (Muller y Webster, 1997; Vianney *et al.*, 1996), lo que coincide con el hecho de que en esta bacteria los genes *tolA* y *tolB* son los que se encuentran más alejados dentro de la agrupación (separados por 129 pb) (Fig. 6.1D). En *V. cholerae* los únicos datos disponibles, basados en estudios de complementación de

mutaciones en los genes *tol-pal*, sugieren que *tolQ* y *tolR* se cotranscriben pero que *tolA* podría tener su propio promotor (Heilpern y Waldorn, 2000).

Por otro lado, en los análisis de inmunodetección, la cantidad de proteína OprL detectada en el mutante *P. putida* BΩ, que contiene la inserción del interposón Ω-Km 245 pb corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción del gen *oprL*, fue significativamente menor que en la cepa parental (Fig. 4.1). Este descenso se correlacionó con una bajada de la actividad del promotor P_L en este mutante, como se deduce del análisis del ARNm de *oprL* en esta cepa (Fig. 4.3), lo que parece indicar que la región de ADN que se encuentra alrededor del sitio de inserción del interposón Ω-Km ejerce algún tipo de influencia en la regulación de la expresión desde ese promotor, aunque hasta el momento no hemos estudiado el papel específico que podría desempeñar dicha región. En cuanto a la expresión de la proteína TolA de *P. putida*, cuando se analizó mediante inmunodetección en membrana de nitrocelulosa, la cantidad de TolA presente en los mutantes polares *P. putida* QΩ y RΩ está por debajo de nuestro límite de detección, al igual que ocurrió en los mutantes no polares QX y RX (Fig. 4.2). Aunque en un principio pensamos que esta menor cantidad de TolA en los mutantes QΩ y RΩ podía deberse al efecto polar que la inserción del interposón Ω-Km en estos genes podía tener sobre la transcripción del gen *tolA*, esta suposición ha resultado ser incorrecta. Tras determinar la organización transcripcional y traduccional de toda la agrupación génica, y basándonos en la pérdida de la proteína TolA en el mutante *tolQ::xylE*, parece evidente que es necesaria la presencia de la proteína TolQ para estabilizar a la proteína TolA, y no es posible obtener ninguna conclusión sobre la organización transcripcional de los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA* a partir de los ensayos de inmunodetección de TolA. Podría incluso darse el caso de que la proteína TolQ fuera necesaria para estabilizar a la proteína TolR, y que fuese TolR, y no directamente TolQ, la proteína necesaria para la estabilidad de TolA, o que ambas lo fuesen conjuntamente. En *E. coli*, TolA es la proteína clave para mantener la estructura del sistema de membrana Tol-PAL ya que está involucrada en una gran variedad de interacciones con la mayoría de las proteínas del complejo. Así, se ha demostrado que TolA interacciona con las proteínas TolQ y TolR en la membrana interna (Derouiche *et al.*, 1995), con PAL (Cascales *et al.*, 2000) e incluso con TolB (Lloubès *et al.*, 2001). Sin embargo, en *E. coli* se ha observado que la pérdida de las proteínas TolQ o TolR no afecta a la estabilidad de TolA (Cascales *et al.*, 2001; Germon *et al.*, 2001), aunque sí es más inestable en un mutante $\Delta tolBpal$ (Germon *et al.*, 2001).

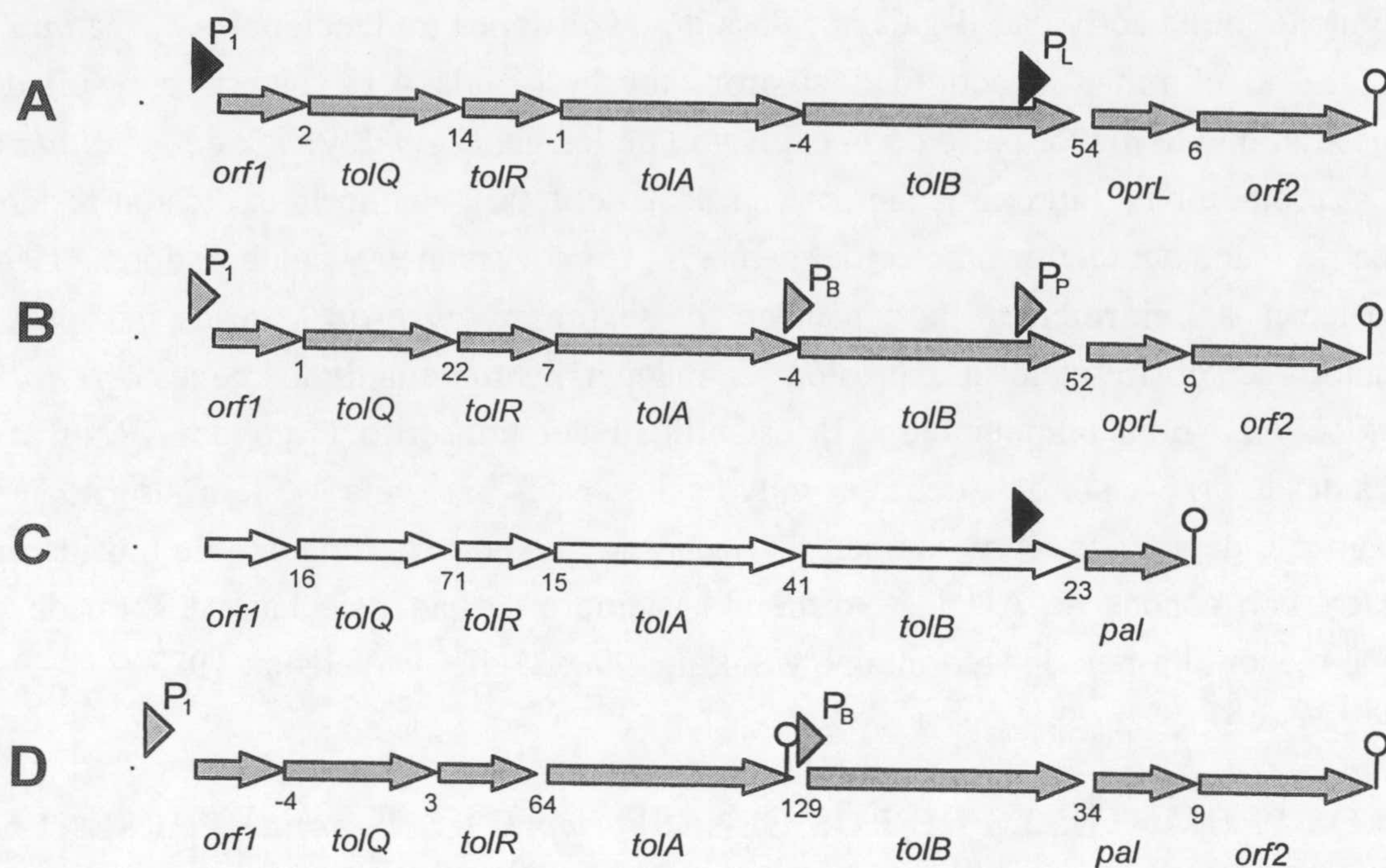


Figura 6.1. Esquema de la organización génica y transcripcional de los distintos sistemas *tol* estudiados hasta el momento. A. *P. putida* KT2440; B. *P. aeruginosa* PAO1; C. *H. influenzae* NTHI; D. *E. coli* K-12. En color gris se indican aquellos genes en los que se ha estudiado la organización transcripcional, y en blanco los que aún no se han estudiado. Los triángulos sombreados sobre las secuencias indican posibles promotores deducidos mediante pruebas experimentales indirectas (estudios de complementación, "Northern"). Los triángulos de color negro indican promotores en los que se ha determinado el punto de iniciación de la transcripción mediante análisis de extensión a partir de un cebador. Por último, el símbolo "⊙" señala la posición de distintos terminadores transcripcionales teóricos, predichos a partir de los análisis de la secuencia de ADN. Bajo cada figura, en las regiones intergénicas, se indica la distancia en pares de bases existente entre genes contiguos (un número negativo significa que los genes solapan en la cantidad de pares de bases indicada).

Por otra parte, en *E. coli* y *P. aeruginosa* se ha propuesto la existencia de un transcrito de ARNm que abarcaría toda la región *tol-pal(oprL)* (Duan *et al.*, 2000; Muller y Webster, 1997; Vianney *et al.*, 1996). Ésta parece ser también la situación en el caso de los genes *tol-oprL* de *P. putida*. Aparte del terminador transcripcional independiente del factor Rho predicho 25 pb corriente abajo del gen *orf2* (Fig. 4.7A) (Rodríguez-Herva *et al.*, 1996), el cual parece ser funcional tal y como indican nuestros resultados de RT-PCR (Fig. 4.6B), no hemos podido identificar ningún otro terminador transcripcional dentro de esta agrupación génica. La ausencia de terminadores haría posible la existencia de un transcrito de ARNm que abarcara todos los genes de la agrupación. Los resultados obtenidos a partir del experimento de RT-PCR apoyan esta posibilidad, ya que se ha detectado un ARNm que contiene la región que separa los

genes *tolB* y *oprL* (Fig.4.5B, calle 5). Esta hipótesis también está apoyada por la disminución de la actividad β -galactosidasa de las fusiones traduccionales *oprL::lacZ* y *orf2::lacZ* al eliminar la actividad el promotor P₁ (Tabla 4.1). Nuestros resultados demuestran que la mayor parte de la expresión de los genes *oprL* y *orf2* de *P. putida* se debe al promotor P_L (aproximadamente un 85% del total), siendo la expresión restante debida probablemente al promotor del gen *orf1*. Como Vianney y colaboradores (1996) propusieron anteriormente, la capacidad de expresar *oprL-orf2* desde su propio promotor hace posible que su expresión sea independiente de la de los genes *orf1-tolQ-tolR-tolA-tolB*. En cualquier caso, la estabilidad del transcrito largo de ARNm que abarca desde *orf1* hasta *orf2* debe ser muy baja en estas bacterias y este transcrito sería rápidamente degradado, como sugiere el hecho de que en experimentos de hibridación de ARN con sondas de ADN ("Northern"), siempre se han detectado ARNm de un tamaño menor al esperado (Lafontaine y Sokol, 1998; Muller y Webster, 1997).

VI. LOS PROMOTORES DE LOS GENES *tol-oprL* DE *P. putida* PRESENTAN LAS SECUENCIAS CONSENSO DE PROMOTORES DEPENDIENTES DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN σ^{70} .

El sitio de iniciación de la transcripción del gen *orf1* de *P. putida* está localizado 91 pb corriente arriba de su codón de iniciación de la traducción. En esta región se han identificado las posibles zonas -10 y -35 del promotor que presentaron similitud con las secuencias consenso de promotores reconocidos por el factor de transcripción σ^{70} . Este promotor solapa con el codón de terminación de la traducción del gen *ruvB* (situado corriente arriba de *orf1*) (Fig. 4.4). Por otro lado, se ha determinado que el promotor del gen *oprL* de *P. putida* se localizaba dentro del gen *tolB*, a 120 pb corriente arriba de su codón de terminación de la traducción. Este promotor también presenta las secuencias -10 y -35 típicas de promotores reconocidos por ARN polimerasas con σ^{70} (Fig. 4.3). En este sentido debemos decir que en *Haemophilus influenzae*, el análisis transcripcional del gen *P6(pal)* también sitúa el sitio de iniciación de su transcripción dentro de *tolB*, a 83 pb de su codón de terminación de la transducción, y dicho promotor también presenta las secuencias típicas de promotores reconocidos por el factor σ^{70} (Sen *et al.*, 1996) (Fig. 6.1C). Las regiones -10 (5'-TAATCT-3') y -35 (5'-CTGTTG-3') del promotor *oprL* de *P. putida*, comparten una gran similitud con las secuencias -10 y -35 propuestas para los promotores de los genes *pfrA* de *P. putida* WCS358 (Venturi *et al.*, 1993) y *algQ* de *P. aeruginosa* (Konyecsni y Deretic, 1990), los cuales presentan las mismas secuencias -10 (5'-TAATCT-3') y -35 (5'-TTGATG-3') y se expresan constitutivamente. En este sentido también es interesante resaltar que la región de ADN donde se encuentra el promotor P_L de *P. putida* presenta gran similitud con esa misma

secuencia dentro del gen *tolB* de *P. aeruginosa* y *P. syringae* (Fig. 6.2). La secuencia de la región -10 del promotor P_L de *P. putida* presenta más similitud con la secuencia consenso de promotores reconocidos por σ^{70} que la del promotor P_1 de *P. putida* (Fig 4.3 y 4.4). Esto podría explicar tanto la menor actividad del promotor P_1 con respecto al promotor P_L , como las diferencias observadas en el nivel de expresión al analizar las fusiones transcripcionales al gen *lacZ* de estos promotores (Fig. 4.8). En *P. aeruginosa*, el nivel de expresión de la fusión transcripcional *oprL::lacZ* es también mayor que el observado para la fusión *orf1::lacZ* (Duan *et al.*, 2000). Lo mismo ocurre en el caso de *E. coli*, donde la cantidad de ARNm correspondiente al gen *orf1* detectada en análisis de ARNm mediante hibridación con una sonda de ADN (“Northern”) es bastante menor que la cantidad de ARNm detectada para el gen *tolB* (Muller y Webster, 1997). En un trabajo reciente, Cascales *et al.* (2002) han estimado que en *E. coli* la lipoproteína PAL se encuentra en mayor cantidad (30.000-40.000 copias por célula) que las proteínas TolA (400-800 copias por célula) o TolR (2.000-3.000 copias por célula), lo cual corroboraría lo mencionado anteriormente.

	10	20	30	40	50	60
<i>tolB P. putida</i>	TCAAAGTGGCGGCACAGGACTTGCAACGCGGAAGTGTAAGATTCTGTCTGAAACAAGTC					
<i>tolB P. aeruginosa</i>	TCCAGATCGCCGCCAGGACCTCCAGCGCGGCAATCTGCGGGTGCTGTGCAACACCACTC					
<i>tolB P. syringae</i>	TCAAGGTGGCAGTGCAGGATTTGGCCCCGCGGTAGCGTAAAAATCCTCACAGATAGCAACC					
	** *					
Consenso	TC A T GC G CAGGA T CGCGG A T T CT C A A A C					
	70	80	90	100	110	120
<i>tolB P. putida</i>	TTGATGAGTCTCCCACTGTTGCGCCAAACGGCACCATGCTAATCTACGCCACCCGCCAGC					
<i>tolB P. aeruginosa</i>	TGGACGATTCGCCCACTGTTGCGCCAATGGCACCATGCTAATCTACGCCACCCGCCAGC					
<i>tolB P. syringae</i>	TTGATGAGTGCCTACTGTTGCGCCAACGGCACCATGGTAATCTACGCCACCCGCCAGC					
	* *					
Consenso	T GA GA TC CC ACTGTTGCGCC AA GGCACCATG TAATCTACGCCACCCGCCAGC					
	130	140	150	160	170	180
<i>tolB P. putida</i>	AGGGCCGGGGAGTCTTGATGCTCGTGTGCTGTAACGGCCGCGTGAGGCTCCCACTTCCTA					
<i>tolB P. aeruginosa</i>	AGGACCGGGGCGTGCTGATGCTCGTATCCATCAACGGACGCGTACGGATACCTCTCCCTA					
<i>tolB P. syringae</i>	AGGGCCGGGGAGTCTTGATGCTCGTGTCCATCAATGGACGCGTAAGGCTCCCGCTTCCTA					
	*** ***** ** ***** ** *					
Consenso	AGG CCGGGG GT TGATGCTCGT TC T AA GG CGCGT GG T CC CT CTA					

Figura 6.2. Alineamiento de la región de ADN donde se encuentra el promotor del gen *oprL* de *P. putida* con las regiones homólogas de *P. aeruginosa* y *P. syringae*. El alineamiento entre la secuencia de ADN del final del gen *tolB* de *P. putida* y estas mismas secuencias de *P. aeruginosa* y *P. syringae*, se realizó con el programa Clustal W (ver apartado 21 de la sección *Materiales y Métodos*). Para que una base forme parte de la secuencia consenso debe estar presente en las 3 secuencias alineadas. Las secuencias sombreadas indican las regiones -10 y -35 propuestas para el promotor P_L de *P. putida*. En negrita se indica el punto de iniciación de la transcripción del gen *oprL* de *P. putida*.

6. Discusión

En lo que se refiere a la regulación de los genes *tol-oprL*, se ha descrito que la expresión de los genes *tol-oprL* de *P. aeruginosa* está regulada por hierro (Duan *et al.*, 2000). En el caso del operón *orf1-tolQ-tolR-tolA*, cuya expresión está regulada por hierro a lo largo de toda la curva de crecimiento, se ha demostrado que la proteína Fur (proteína reguladora del transporte de hierro) está directamente implicada en esta regulación, ya que el promotor del gen *orf1* presenta una secuencia consenso para la unión de esta proteína (Ochsner y Vasil, 1996) (Fig. 6.3). Sin embargo, el efecto del hierro en la expresión de los genes de los otros dos operones parece ser indirecto ya que no se han encontrado estas regiones consenso para la unión de la proteína Fur ni en el promotor del gen *tolB* ni en el de *oprL* (Duan *et al.*, 2000) (Fig. 6.2). En el caso de *P. putida* KT2440, no hemos observado ninguna influencia de la concentración de

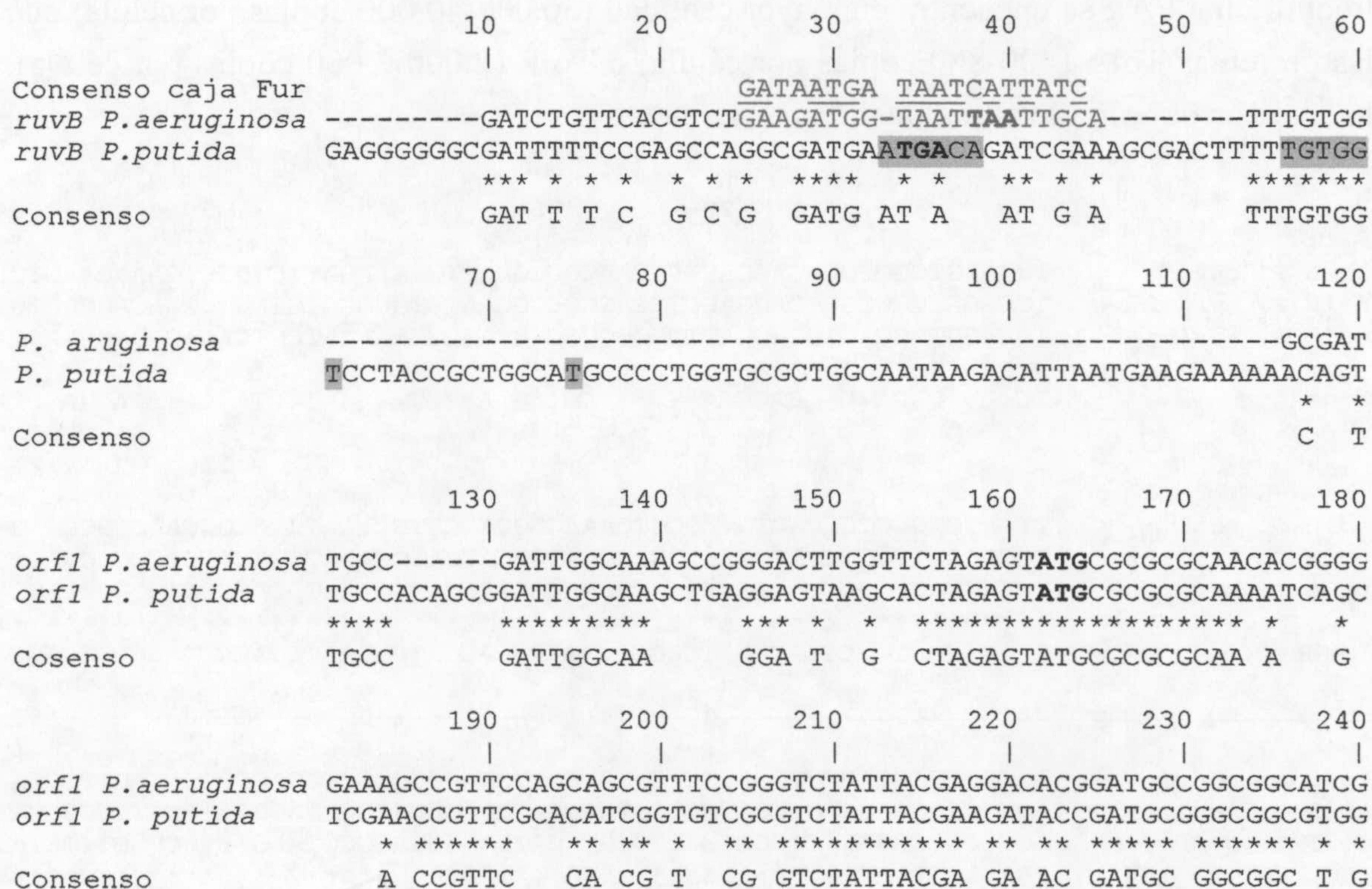


Figura 6.3. Alineamiento de las regiones de ADN situadas corriente arriba de *orf1* de *P. putida* y *P. aeruginosa*. El método seguido para generar el alineamiento es el mismo que se indicó en la Figura 6.2. Las secuencias sombreadas indican las regiones -10 y -35 propuestas para el promotor P₁ de *P. putida*, y el punto de iniciación de la transcripción del gen *orf1*. En color azul se indican la secuencia consenso propuesta para promotores reconocidos por la proteína reguladora Fur y dicha secuencia en *P. aeruginosa*. Las bases de esta secuencia consenso que aparecen subrayadas son las que se encuentran conservadas en *P. aeruginosa*. En negrita se indica la posición de los codones de terminación de la traducción de los genes *ruvB* de ambas bacterias, así como la de los codones de iniciación de la traducción de los genes *orf1*.

hierro en el medio de cultivo sobre la expresión de los genes *tol-oprL*, y de acuerdo con esto, tampoco hemos encontrado un motivo de unión de la proteína Fur en las correspondientes regiones promotoras (Fig. 6.2 y 6.3). Existen, además, otras diferencias entre la expresión de los genes *tol-oprL* de ambas bacterias. Mientras que la expresión de dichos genes en *P. aeruginosa* tiende a aumentar en la fase estacionaria del crecimiento (Duan *et al.*, 2000), en *P. putida* ocurre lo contrario, y la expresión de estos genes tiende a disminuir en las fases tardías del crecimiento, aunque las diferencias de expresión en ambos casos no son excesivamente marcadas.

En conjunto, estos resultados indican que a pesar de que las proteínas del sistema Tol-OprL están muy conservadas en las bacterias gram negativas, la organización transcripcional de los genes que codifican dichas proteínas, así como su nivel de expresión en respuesta a diferentes condiciones ambientales, difieren mucho entre estos microorganismos. Estas variaciones podrían estar relacionadas con las preferencias que estos microorganismos presentan en relación a la colonización de diferentes ecosistemas.

V. LOS GENES *tolR* Y *tolA*, Y *oprL* Y *orf2*, RESPECTIVAMENTE, ESTÁN ACOPLADOS TRADUCCIONALMENTE.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran la existencia de acoplamiento traduccional entre los genes *tolR* y *tolA* de *P. putida*, así como entre *oprL* y *orf2* (Tabla 4.1). Una situación similar se ha descrito en el caso de los genes *tolQ* y *tolR* de *E. coli* (Vianney *et al.*, 1996). El análisis de la secuencia situada corriente arriba del gen *tolR* en esta bacteria, reveló la presencia de una fuerte estructura secundaria en dicha región del ARNm. Esta estructura incluía el codón de terminación de la traducción del gen *tolQ*, el posible sitio de unión al ribosoma y el codón de iniciación de la traducción de *tolR*. El análisis detallado de esta secuencia sugería que el gen *tolR* carece de una secuencia eficiente para el reconocimiento por parte del ribosoma y que, por tanto, su traducción dependería de que se produjese la traducción previa del gen *tolQ* (Vianney *et al.*, 1996). Este tipo de regulación podría ser importante para un control adecuado de la síntesis de estas proteínas, y por tanto para el mantenimiento de la estequiometría de este sistema proteico. Aunque no hemos analizado en detalle el mecanismo molecular en el que se basan los acoplamientos traduccionales en nuestro caso, la presencia de sitios de unión al ribosoma adecuados corriente arriba de los genes *tolA* y *orf2* (Fig. 4.9), sugiere que la inhibición de la traducción de estos genes podría deberse a la inaccesibilidad del ribosoma a dichas secuencias, que estarían ocultas formando parte de una estructura secundaria estable de ARNm, como se han predicho

(Fig. 4.9), haciendo la traducción de los mismos dependiente de la traducción previa del correspondiente gen situado corriente arriba.

VI. EL SISTEMA Tol-OprL DE *P. putida* NO ESTÁ IMPLICADO EN LA EXPORTACIÓN Y EL CORRECTO ENSAMBLAJE DEL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) Y LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA

Desde hace bastantes años se viene barajando la hipótesis, aún no demostrada, de que el sistema Tol-PAL es necesario para el correcto ensamblaje de algunos componentes de la membrana externa. Ya en 1986, Lazzaroni y colaboradores determinaron que la expresión de las porinas OmpF y LamB disminuía en un mutante *lkyB* de *E. coli* (mutante en el gen *tolA*). Estos autores sugirieron que el producto de este gen ejercía un control positivo a nivel transcripcional sobre la expresión de los genes *ompF* y *lamB*. Además, encontraron una menor cantidad de la proteína LamB en la membrana externa de este mutante. En base a esto, y al hecho de que se ha demostrado la interacción *in vitro* de las proteínas TolA y TolB con porinas triméricas de la membrana externa (Derouiche *et al.*, 1996; Rigal *et al.*, 1997), se ha propuesto que una de las funciones del sistema Tol-PAL de *E. coli* podría ser la de intervenir en el proceso de translocación de las proteínas de la membrana externa a través del periplasma y/o en su correcto ensamblaje en la membrana (Lazdunski *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1999; Llobès *et al.*, 2001). Para estudiar esta hipótesis en el caso de *P. putida*, y también con el fin de determinar si la peor utilización de distintos compuestos como fuente de carbono por parte de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* se debía a un problema en su transporte a través de su membrana externa, se analizó la composición de la misma en dichos mutantes. En este trabajo, hemos analizado la presencia de distintas porinas necesarias para la entrada de algunos de estos compuestos, como son las proteínas triméricas OprB y OprD, y la proteína monomérica OprF. Como se ha descrito en la *Introducción*, la proteína OprD de *P. aeruginosa* forma un canal específico para la entrada de aminoácidos y péptidos básicos, como la arginina, a través del cual puede penetrar también el antibiótico β -lactámico imipenem (Trias y Nikaido, 1990). Esta proteína también se encuentra en *P. putida* KT2440, como demuestra el hecho de que un anticuerpo generado contra la proteína OprD de *P. aeruginosa* reconoce un producto de un tamaño similar al esperado en *P. putida* (Fig. 5.5). Por otro lado, homólogos de las proteínas OprB, que presenta un sitio de unión específico para glucosa y otros carbohidratos (Trias *et al.*, 1988; Wylie *et al.*, 1993), y OprF, que parece estar implicada en la entrada de compuestos de mayor tamaño, tales como di-, tri- y tetrasacáridos, al espacio periplásmico (Bellido *et al.*, 1992), también se hallan presentes en *P. putida* y

otras pseudomonádaceas (Hancock *et al.*, 1990; Wylie y Worobec, 1994). Aunque en este trabajo no hemos estudiado la expresión a nivel transcripcional de estas porinas de la membrana externa en los mutantes *tol-oprL* de *P. putida*, los análisis por inmunodetección de las mismas demuestran que estas proteínas no se encuentran en menor cantidad en la membrana de los mutantes que en la de la cepa parental (ver Figuras 5.3-5.6). Además, se ha demostrado mediante inmunofluorescencia indirecta que la proteína OprF está también expuesta en la membrana externa de los mutantes, lo que coincide con el hecho de que en los mutantes *tol-pal* de *E. coli* las porinas estén expuestas a pesar de haber encontrado una menor cantidad de la proteína LamB en la membrana externa de un mutante TolA (Lazdunski *et al.*, 1998). Por otro lado, también se ha propuesto que la proteína TolA de *E. coli* es necesaria para el correcto ensamblaje del antígeno O del LPS, posibilitando probablemente la transferencia del polisacárido O al núcleo (o *core*) del LPS, o bien interviniendo en la translocación de las subunidades del antígeno O a través de la membrana citoplásmica (Gaspar *et al.*, 2000). En el caso de *P. putida* no se han encontrado diferencias entre la cantidad de antígeno O del LPS presente en los mutantes *tol-oprL* y en la cepa parental, ni siquiera en el mutante en el gen *tola* (Fig. 5.7). En principio, este resultado parece indicar que en *P. putida*, las proteínas de este sistema no intervienen en procesos relacionados con la exportación y el ensamblaje del antígeno O en la membrana externa.

En resumen, todo este conjunto de resultados sugiere que en *P. putida*, las proteínas del sistema Tol-OprL no están implicadas en la exportación y el correcto ensamblaje de los mencionados componentes de la membrana externa y que este sistema proteico no parece intervenir en los procesos de biogénesis de la membrana externa en esta bacteria. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que algunos componentes de dicha membrana no sean funcionales en los mutantes *tol-oprL*, dado que la estabilidad de la misma está seriamente afectada en dichos mutantes.

VII. LOS MUTANTES *tol-oprL* DE *P. putida* ESTÁN AFECTADOS EN EL TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS Y AMINOÁCIDOS A TRAVÉS DE LA MEMBRANA INTERNA.

Una de las aportaciones más interesantes de este trabajo es que, por primera vez, hemos demostrado que los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* están afectados en el transporte de glucosa y glicerol a nivel de la membrana interna. En *P. aeruginosa* existen dos sistemas inducibles para el transporte de glucosa (Midgley y Dawes, 1973). El primero es un sistema de transporte de baja afinidad en el cual la glucosa es oxidada hasta gluconato o 2-cetogluconato antes de ser transportada al citoplasma. El segundo es

un sistema de transporte de alta afinidad, en el cual la glucosa es transportada al citoplasma a través de un sistema dependiente de una proteína de unión periplásmica asociada a un sistema de transporte tipo ABC (Adewoye y Worobec, 2000). Este sistema de transporte se induce mediante cultivando las células en presencia de glucosa (Guymon y Eagon, 1974) y en estas condiciones, en *P. aeruginosa*, la proteína de membrana externa OprB y la proteína periplásmica de unión a glucosa (GBP) también se inducen (Hancock y Carey, 1980; Stinson *et al.*, 1976), interviniendo en este último sistema de transporte. En *P. aeruginosa*, la porina OprB es la principal proteína implicada en la entrada de carbohidratos a través de la membrana externa (Wylie y Worobec, 1995), y se ha demostrado que esta porina es selectiva para el transporte de dichos compuestos, facilitando tanto la difusión de glucosa, como de xilosa, fructosa, manitol y glicerol (Trias *et al.*, 1988; Saravolac *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1994; Wylie y Worobec, 1993). Wylie y Worobec (1994) demostraron que las *Pseudomonas* del grupo I, incluyendo *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* y *P. stutzeri*, producen una proteína homóloga a la proteína OprB de *P. aeruginosa*. Análisis genéticos e inmunológicos sugieren que las proteínas OprB de *P. putida* y *P. chlororaphis* son las más parecidas a la de *P. aeruginosa* (Wylie y Worobec, 1994). Aunque los genes que codifican para esta proteína en *P. putida* y *P. aeruginosa* no presentan mucha homología (Palleroni *et al.*, 1973), las proteínas OprB de estas dos especies presentan una composición de aminoácidos y una movilidad electroforética similar (Saravolac *et al.*, 1991). Sin embargo, a pesar de esta similitud, en este trabajo hemos demostrado que la proteína OprB de *P. putida*, en contraste con la de *P. aeruginosa*, no está implicada en el transporte del glicerol a través de la membrana externa, ya que la velocidad de transporte de dicho compuesto en el mutante *P. putida oprB* es similar a la de la cepa parental (Fig. 5.10). Adewoye y colaboradores (1998) han sugerido que la interacción de la porina OprB con los componentes del sistema de transporte de glucosa de alta afinidad, probablemente modifique el sitio de unión a carbohidratos de dicha proteína. Esto está apoyado por el hecho de que en *E. coli*, el patrón de azúcares que difunden a través de la proteína LamB es distinto en ensayos de difusión en los que la proteína aislada se reconstituye en vesículas de membrana que en ensayos con células intactas, en los que probablemente se produzca la interacción entre la porina LamB y la proteína periplásmica de unión a maltosa (Bavoil y Nikaido, 1981). Estudios realizados con las proteínas de membrana externa inducibles por glucosa en *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* y *P. cepacia* demuestran que esta proteína forma un canal de difusión que presentan una alta especificidad y selectividad por glucosa pero varían en su especificidad por otros carbohidratos (Adewoye *et al.*, 1998). En base a esto, estos autores proponen que el sistema de transporte de glucosa está muy conservado dentro del género *Pseudomonas* con respecto a su preferencia por glucosa,

pero su especificidad por otros carbohidratos varía considerablemente dentro de cada especie, debido probablemente a la existencia de diferentes conformaciones del sitio de unión a carbohidratos de las porinas inducibles por glucosa. Por otro lado, aunque el sistema de transporte de glucosa sólo se ha estudiado en *P. putida* a nivel de la proteína OprB, el hecho de que un anticuerpo policlonal generado contra la GBP de *P. aeruginosa* reconozca un producto del tamaño esperado en *P. putida* (Fig. 5.8) y que la velocidad del transporte de glucosa de la cepa silvestre sea menor en esferoplastos que en células enteras (Fig. 5.9A y B), demuestran la intervención de una proteína de unión periplásmica en el sistema de transporte de glucosa de *P. putida*. Además, también se ha identificado en *P. putida* la presencia de un homólogo del gen *gltK* de *P. aeruginosa*, que codifica para uno de los componentes de membrana interna del sistema tipo ABC para el transporte de glucosa en esta bacteria (Adewoye y Worobec, 2000).

El transporte y catabolismo del glicerol se ha estudiado fundamentalmente en *E. coli*, y en esta bacteria se sabe que está mediado por los componentes de la agrupación génica *glp*. El operón *glpFK* codifica una proteína de membrana interna que facilita la difusión del glicerol desde el espacio periplásmico y la enzima glicerol quinasa citoplásmica, respectivamente (Weissenborn *et al.*, 1992). En *P. aeruginosa*, una serie de datos bioquímicos y genéticos sugerían originalmente la presencia de un sistema de transporte de alta afinidad, dependiente de energía y asociado a una proteína de unión periplásmica para el transporte de glicerol (Siegel y Phibbs, 1979; Tsay *et al.*, 1971). Sin embargo, estudios posteriores sugieren que el glicerol se transporta al citoplasma a través de un sistema de alta afinidad por difusión facilitada e independientemente de una proteína de unión periplásmica (Williams *et al.*, 1994). Estos estudios están apoyados por la clonación y secuenciación del operón *glpFK* de *P. aeruginosa*, cuyos productos génicos presentan un 80% de identidad con la permeasa de membrana interna que facilita la difusión del glicerol y con la enzima glicerol quinasa, respectivamente, de *E. coli* (Schweizer y Po, 1996; Schweizer *et al.*, 1997). En *P. putida*, el transporte de glicerol no se ha estudiado. Los ensayos realizados en este trabajo demuestran que dicho transporte no está asociado a una proteína de unión periplásmica, ya que la velocidad de acumulación de glicerol en la cepa parental en los experimentos de transporte con ^{14}C -glicerol es la misma en células enteras que en esferoplastos (Fig. 5.10), al contrario de lo que ocurre con la glucosa (Fig. 5.9). Además, el análisis del genoma de *P. putida* KT2440 pone de manifiesto la presencia del operón *glpFK* cuyos productos génicos presentan una alta homología con las proteínas GlpF y GlpK de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Todos estos datos sugieren que en *P. putida* el glicerol es transportado a través de la membrana interna por una proteína de difusión que facilita su entrada al citoplasma y no necesita energía para el proceso.

Debido a la incapacidad de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* de utilizar glicerol como fuente de carbono, los ensayos de transporte con ^{14}C -glicerol se realizaron con células cultivadas en glucosa. En estas condiciones, no podemos estar seguros de que se estén expresando adecuadamente los componentes necesarios para el transporte de glicerol y ésta puede ser la causa de que el nivel de acumulación de ^{14}C -glicerol en la cepa silvestre sea menor que el de ^{14}C -glucosa. Sin embargo, el hecho de que en la cepa parental sí se produzca acumulación de ^{14}C -glicerol indica que este compuesto está entrando en la célula, lo que implicaría la presencia de su sistemas de transporte. Esto no ocurre en los mutantes QX y BX en los que la acumulación de glicerol es considerablemente más baja que en la cepa parental por lo que podemos concluir que estos mutantes están afectados en el transporte de este compuesto a nivel de la membrana interna. Un fenotipo similar se ha descrito en el caso de un mutante $\Delta\text{glpFK}::\Omega\text{Gm}$ de *P. aeruginosa* (Schweizer *et al.*, 1997). Este mutante fue incapaz de utilizar 10mM de glicerol como fuente de carbono y de acumular glicerol en los ensayos de transporte con ^{14}C -glicerol a través de células enteras. El transporte de glicerol a través de la proteína GlpF es uno de los pocos ejemplos que se conocen de proteínas transportadoras de solutos que catalizan la difusión facilitada del compuesto a través de la membrana interna. Otro ejemplo es el de la prolina que es transportada al citoplasma a través de una permeasa de membrana interna, denominada PutP, aunque en este caso dicho transporte está acoplado a la entrada de iones sodio (Cairney *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1985; Jung, 2001; Jung *et al.*, 1998; Wengender y Miller, 1995). El crecimiento de los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* en medio mínimo con prolina fue, en general, menor que el de la cepa parental (ver Tabla 5.1). En el caso de la prolina, dicho defecto parece deberse específicamente a la ausencia de la proteína TolB, ya que el crecimiento en prolina de los mutantes no polares QX, RX, AX y PX fue sólo ligeramente menor que el de la cepa parental, mientras que los mutantes polares Q Ω , R Ω , A Ω y el mutante no polar BX no fueron capaces de crecer. Dado que los genes *tolQ*, *tolR*, *tolA* y *tolB* de *P. putida* forman un operón, este resultado parece indicar que la incapacidad de los mutantes polares, así como del mutante no polar *tolB::xylE*, para crecer en medio mínimo con prolina se debe a la ausencia de la proteína TolB en la envuelta celular de *P. putida*.

Por otro lado, el análisis de la fuerza protón motriz (pmf) en los mutantes *tol-oprL* no polares de *P. putida* demuestra que, en dichos mutantes, la generación de la misma en la membrana interna no está afectada y que, por tanto, esta no es la causa final de este defecto en el transporte de estos compuestos a través de la membrana interna. Esto coincidiría con el hecho de que los mutantes *tol-oprL* no son capaces de transportar glicerol, cuya entrada se produce a través de una permeasa de membrana interna que

facilita su difusión a favor de un gradiente de concentración y que no requiere la generación de energía para dicho proceso.

Recientemente, se ha descrito en *P. aeruginosa* un sistema de dos componentes que regula la utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Este sistema está formado por las proteínas CbrA, una proteína de membrana interna que presenta actividad histidín-quinasa en su extremo carboxilo terminal citoplásmico, y CbrB, que es el componente citoplásmico que actúa como regulador induciendo la expresión de diferentes genes tras ser fosforilado por la enzima histidina quinasa (Nishijyo *et al.*, 2001). Mutantes en los genes que codifican estas proteínas son incapaces de utilizar arginina, histidina, ornitina o prolina como fuentes de carbono y nitrógeno (aunque sí fueron capaces de utilizar estos compuestos cuando se añadió succinato como fuente de carbono), ni tampoco glicerol, manitol y lactato. La capacidad de estos mutantes para utilizar glucosa, fructosa o benzoato, entre otros compuestos, fue sólo ligeramente menor que la de la cepa silvestre. Estos autores sugieren que este sistema de dos componentes regula la relación carbono:nitrógeno intracelular, y en este sentido demuestran su implicación en la regulación de la expresión de los genes del catabolismo de la arginina (el operón *aot-argR*) y de la histidina (operón *hiu*) de *P. aeruginosa*. En nuestro caso, se podría sugerir que las mutaciones en los genes *tol-oprL* ejercen un efecto indirecto en el funcionamiento correcto de estos sistemas que sensan y regulan la utilización de distintos compuestos como fuente de carbono y/o nitrógeno, aunque como demuestran los experimentos de transporte, este efecto por sí solo no explicaría completamente el fenotipo de los mutantes *tol-oprL* y se sumaría al hecho de que estos compuestos no son transportados a través de la membrana interna de estos mutantes.

VIII. POSIBLES FUNCIONES DEL SISTEMA Tol-PAL(OprL).

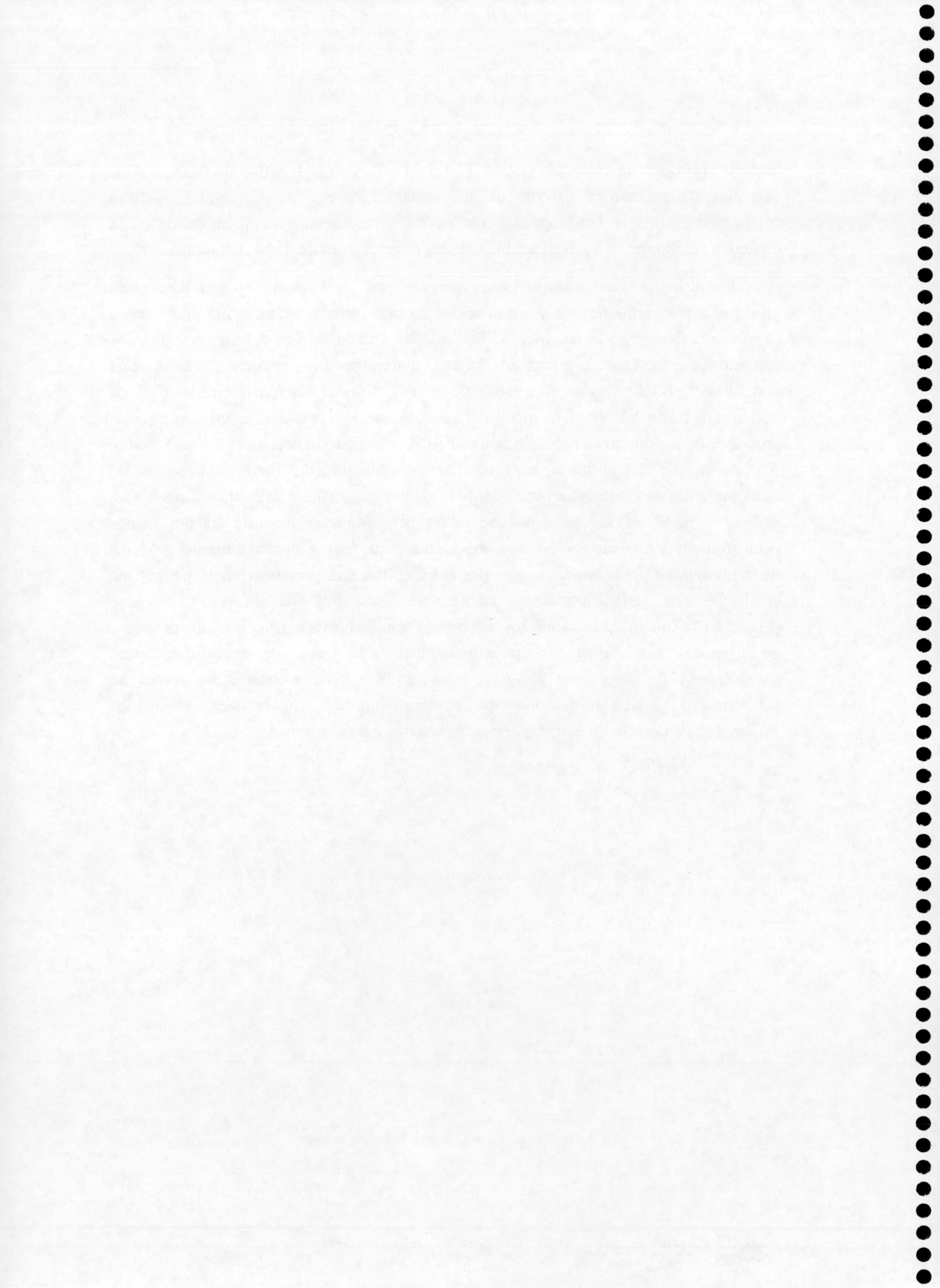
Se han propuesto varias funciones para el sistema Tol-PAL(OprL). La más evidente es la función estructural, interviniendo en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa. En este sentido, se sabe que la proteína TolB, además de interaccionar con porinas triméricas, interacciona con las principales proteínas de la membrana externa asociadas al peptidoglicano, Lpp, OmpA y PAL, y que esta última a su vez interacciona con OmpA (Bouveret *et al.*, 1995; Clavel *et al.*, 1998; Rigal *et al.*, 1997). También se ha demostrado que OmpA y Lpp poseen un papel estructural, entre otras posibles funciones (Sonntag *et al.*, 1978). En el género *Pseudomonas*, la proteína OprF, que también está asociada con el peptidoglicano, desempeña una función equivalente a la de OmpA (Woodruff y Hancock, 1989). De esta forma todas estas

proteínas, y quizá también Orf2 (Lazdunski *et al.*, 1998), formarían un complejo que uniría el peptidoglicano con la membrana externa. Esto concuerda en parte con el hecho de que una mutación en cualquiera de estas proteínas produce un fenotipo similar. Además de este complejo de membrana externa, también existe otro en la membrana interna formado por las proteínas TolQ, TolR y TolA (Derouiche *et al.*, 1995; Germon *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1995). Las mutaciones en estos genes también causan el mismo fenotipo de pérdida de integridad de la membrana externa. Se sabe que la proteína TolA interacciona a través de su dominio central con porinas de la membrana externa (Derouiche *et al.*, 1996), y recientemente se ha demostrado que estos complejos de membrana interna y externa están asociados a través de la interacción del dominio C-terminal de TolA con PAL y con TolB (Cascales *et al.*, 2000; Llobès *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que TolA es una proteína anclada a la membrana interna que transmite la energía almacenada en la membrana interna a los componentes de la membrana externa con los que interacciona, y que la interacción TolA-PAL, que une las dos membranas, depende de la fuerza protón motriz (pmf) y de las proteínas TolQ y TolR (Cascales *et al.*, 2000; 2001; Germon *et al.*, 2001). Todos estos datos prueban claramente que el complejo Tol-PAL interviene en algún tipo de asociación entre las membranas interna, externa y el peptidoglicano. De hecho, las proteínas del complejo Tol se localizan principalmente en los “sitios de contacto” entre las membranas externa e interna (Guihard *et al.*, 1994). De esta forma, las proteínas Tol-PAL formarían un complejo proteico a través de la envoltura celular que posiblemente acerque en cierta medida ambas membranas. En este sentido, la estequiometría del complejo Tol parece que es clave para su estabilidad (Llobès *et al.*, 2001), lo que podría explicar, como se ha mencionado anteriormente, porqué ha sido imposible sobreexpresar todos los genes del sistema en *P. putida* KT2440.

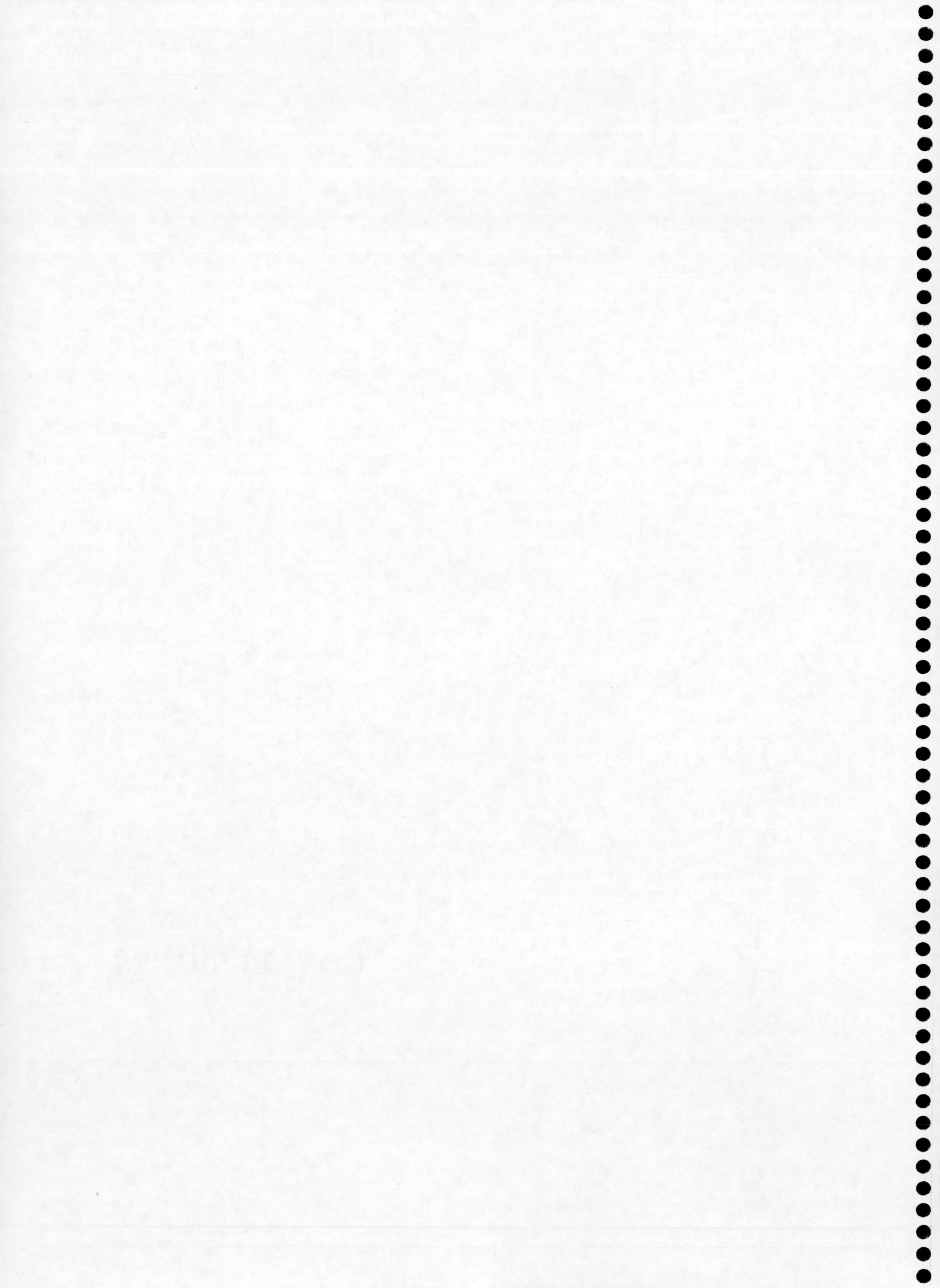
Otra de las funciones que se han sugerido para este sistema, es la de contribuir a la integración de nuevos componentes en la membrana externa. En este sentido, se ha mencionado que la proteína TolA de *E. coli* podría conducir a través del periplasma a los componentes de la membrana externa recién sintetizados (Levengood-Freyermuth *et al.*, 1993). Esta hipótesis se reforzó con las observaciones realizadas *in vitro* de que las proteínas TolA y TolB interaccionaban con porinas triméricas de la membrana externa (Derouiche *et al.*, 1996; Rigal *et al.*, 1997). Sin embargo, las mutaciones en los genes del sistema Tol-PAL(OprL) no parecen impedir por completo este proceso, ya que dichos mutantes presentan las porinas correctamente expuestas en su membrana externa (Lazdunski *et al.*, 1998), tal y como se ha demostrado también en este trabajo. Como se ha indicado anteriormente, recientemente se ha sugerido que la proteína TolA de *E. coli* es necesaria para la expresión del antígeno O del LPS en la superficie celular y para la síntesis del núcleo del LPS (Gaspar *et al.*, 2000). Sin embargo, este no fue el caso de los

mutantes *tol-oprL* de *P. putida* (Fig. 5.7). En relación con el fenotipo de formación de vesículas de membrana externa de los mutantes *tol-pal* de *E. coli*, Llobès y colaboradores (2001) han sugerido que podría ser consecuencia de interferir en la dinámica de exportación y/o ensamblaje de los componentes de dicha membrana.

Por último, el hecho de que los mutantes *tol-oprL* de *P. putida* no sean capaces de utilizar ciertos carbohidratos y aminoácidos cuando éstos se suministran como única fuente de carbono, y que esta incapacidad se deba a un defecto en el transporte de estos compuestos a través de la membrana interna, sugiere que las proteínas de este sistema podrían estar implicadas en el ensamblaje o en el correcto funcionamiento de algunos sistemas de transporte de dicha membrana. En este sentido, esta es la primera vez que se propone que las proteínas del sistema Tol-PAL(OprL) podrían desempeñar esta función. A pesar de que el fenotipo de no crecimiento en determinadas fuentes de carbono de estos mutantes se venía observando desde hacia tiempo, siempre se había atribuido a un defecto a nivel de las proteínas de unión periplásmicas. En este trabajo hemos demostrado que esta suposición era errónea puesto que pese a que los mutantes *tol-oprL* liberan enzimas periplásmicos al medio extracelular, aún presentan en el periplasma cantidades de estas proteínas comparables con las de la cepa silvestre (Fig. 5.8) y, además, no sólo los sistemas dependientes de este tipo de proteínas periplásmicas están afectados en estos mutantes. El hecho de que los mutantes *tol-pal(oprL)* de *E. coli* y *P. aeruginosa* también sean incapaces de crecer en determinadas fuentes de carbono, apoya nuestra hipótesis. Sin embargo, las causas finales de este defecto en el transporte están todavía por determinar.



CONCLUSIONES



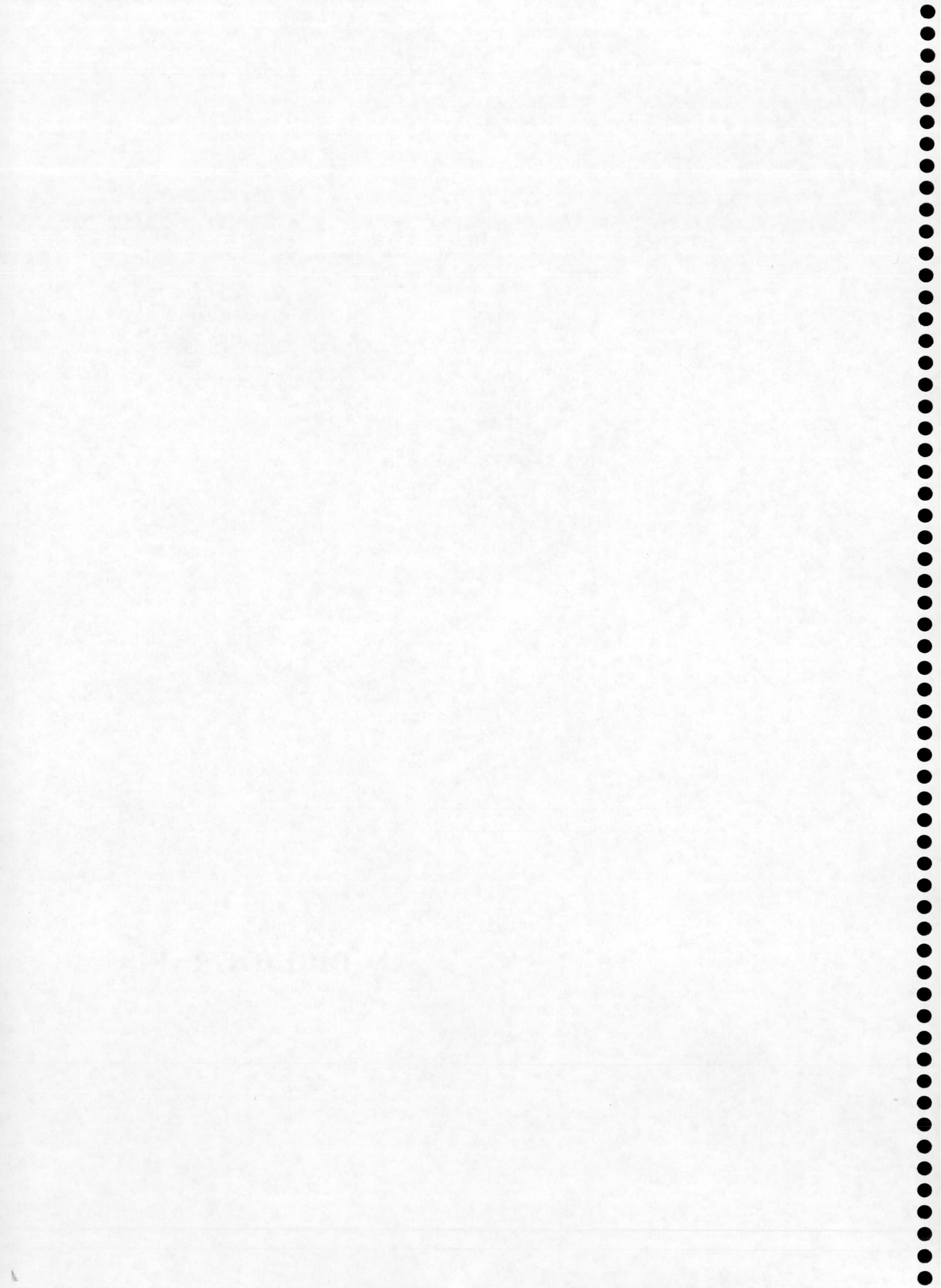
CONCLUSIONES

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

1. Las proteínas Tol-OprL no son esenciales para la supervivencia de *Pseudomonas putida*, puesto que los mutantes *tolQ*, *tolR*, *tolA*, *tolB* y *oprL* fueron viables.
2. La ausencia de las proteínas del sistema Tol-OprL en *Pseudomonas putida* produce un aumento en la sensibilidad celular a diversos compuestos químicos junto con la liberación de proteínas periplásmicas al medio extracelular, lo que implica que este sistema proteico posee una función estructural, participando en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa. Además, la presencia de estas proteínas también es importante, de manera directa o indirecta, durante los estadios finales de la división celular.
3. Los genes del sistema Tol-OprL de *Pseudomonas putida* están organizados en dos unidades transcripcionales: *orf1-tolQ-tolR-tolA-tolB* bajo el control del promotor P₁, situado corriente arriba del gen *orf1*, y *oprL-orf2* bajo el control del promotor P_L, localizado al final del gen *tolB*. Estos promotores presentan las secuencias consenso de promotores reconocidos por el factor de transcripción sigma 70.
4. Debido a la ausencia de parada de la transcripción entre los genes *tolB* y *oprL* se ha puesto de manifiesto que desde el promotor P₁ se sintetiza un transcrito que abarca todo el conjunto de genes de la agrupación *tol-oprL*, de manera que un 15% de la expresión de los genes *oprL* y *orf2* se debe a la actividad de este promotor mientras que un 85% se debe a la actividad del promotor P_L situado corriente arriba del gen *oprL*.
5. La expresión de los genes *tol-oprL* se ve influenciada ligeramente por la fase de crecimiento celular, siendo mayor en fase de crecimiento estacionaria que en fase de crecimiento exponencial, y su expresión no se ve influenciada por la concentración de hierro existente en el medio de cultivo.

6. Los genes *tolR* y *tolA*, y los genes *oprL* y *orf2*, están acoplados traduccionalmente siendo necesaria la traducción de *tolR* y *oprL* para que los genes *tolA* y *orf2*, respectivamente, se traduzcan de manera eficiente.
7. En *Pseudomonas putida*, el ensamblaje del LPS y de las proteínas OprF, OprD y OprB en la membrana externa de la célula no parece estar influenciado por la ausencia de las proteínas del sistema Tol-OprL.
8. El sistema Tol-OprL de *Pseudomonas putida* es necesario para el transporte de glucosa y glicerol a nivel de la membrana interna, pero no influyen en la generación de la fuerza protón motriz.

BIBLIOGRAFÍA



- Abergel C., A. Walburger, S. Chenivresse y C. Lazdunski. 2001a. Crystallization and preliminary crystallographic study of the peptidoglycan-associated lipoprotein from *Escherichia coli*. *Acta Cryst. D57*:317-319.
- Abergel, C., E. Bouveret, J. -M. Claverie, K. Brown, A. Rigal, C. Lazdunski y H. Bénédicti. 1999. Structure of the *Escherichia coli* TolB protein determined by MAD methods at 1.95 Å resolution. *Struct. Fold. Des.* 7:1291-1300.
- Abergel C., L. Journet, S. Chenivresse, M. Gavioli y R. Llòubes. 2001b. Crystallization and preliminary crystallographic study of the periplasmic domain of the *Escherichia coli* TolR protein. *Acta Cryst. D57*:317-319.
- Abril, M. A., C. Michán, K. N. Timmis y J. L. Ramos. 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* 171:6782-6790.
- Adewoye, L. O y E. A. Worobec. 2000. Identification and characterization of the *gltK* gene encoding a membrane-associated glucose transport protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 253:323-330.
- Adewoye, L. O., L. Tschetter, J. O'Neil y E. A. Worobec. 1998. Channel specificity and secondary structure of the glucose-inducible porins of *Pseudomonas* spp. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30:257-267.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Amsterdam, D. 1991. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, p. 72-78. En V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Anderson, T. F. 1951. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 13:130.
- Antoine, R. y C. Locht. 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol. Microbiol.* 6:1785-1799.
- Aono, R., N. Tsukagoshi y M. Yamamoto. 1998. Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the *mar-sox* regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 180:938-944.
- Ariza, R. F., S. P. Cohen, N. Bachhawat, S. B. Levy y B. Demple. 1994. Repressor mutations in the *marRAB* operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176:143-148.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl (eds.) 1999. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Bauer, K., M. Struyve, D. Bosch, R. Benz y J. Tommassen. 1989. One single lysine residue is responsible for the special interaction between polyphosphate and the outer membrane porin PhoE of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 264:16393-16398.
- Bavoil, P. y H. Nikaido. 1981. Physical interaction between the phage lambda receptor protein and the carrier-immobilized maltose-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 256:11385-11388.
- Bayer, M. E. 1968. Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 53:395-404.
- Bayer, M. E. 1991. Zones of membrane adhesion in the cryofixed envelope of *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* 107:268-280.

- Bayer, M. E. y J. L. Sloyer. 1990. The electrophoretic mobility of gram-negative and gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis. *J. Gen. Microbiol.* **136**:867-874.
- Becker, A., H. Kuster y A. Puhler. 1995. Extension of the *Rhizobium meliloti* succinoglycan biosynthesis gene cluster: identification of the *exsA* gene encoding an ABC transporter protein, and the *exsB* gene which probably codes for a regulator of succinoglycan biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **249**:487-497.
- Bellido, F., N. L. Martin, R. J. Siehnel y R. E. W. Hancock. 1992. Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* **174**:5196-5203.
- Bénédicti, H., C. Lazdunski y R. Llobès. 1991. Protein import into *Escherichia coli*: colicins A and E1 interact with a component of their translocation system. *EMBO J.* **10**:1989-1995.
- Bénédicti, H., R. Llobès, C. Lazdunski y L. Letellier. 1992. Colicin A unfolds during its translocation in *Escherichia coli* cells and spans the whole cell envelope when its pore has formed. *EMBO J.* **11**:441-447.
- Bernadac, A., M. Gavioli, J. -C. Lazzaroni, S. Raina y R. Llobès. 1998. *Escherichia coli* *tol-pal* mutants form outer membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **180**:4872-4878.
- Bitter, W., J. Tommassen y P. J. Weisbeek. 1993. Identification and characterization of the *exbB*, *exbD* and *tonB* genes of *Pseudomonas putida* WCS358: their involvement in ferric-pseudobactin transport. *Mol. Microbiol.* **7**:117-130.
- Blatny, J. M., T. Brautaset, H. C. Winther-Larsen, K. Haugan y S. Valla. 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:370-379.
- Bouveret, E., A. Rigal, C. Lazdunski y H. Bénédicti. 1997. The N-terminal domain of colicin E3 interacts with TolB which is involved in the colicin translocation step. *Mol. Microbiol.* **23**:909-920.
- Bouveret, E., A. Rigal, C. Lazdunski y H. Bénédicti. 1998. Distinct regions of the colicin A translocation domain are involved in the interaction with TolA and TolB proteins upon import into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **27**:143-157.
- Bouveret, E., H. Bénédicti, A. Rigal, E. Loret y C. Lazdunski. 1999. In vitro characterization of peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL)-peptidoglycan and PAL-TolB interactions. *J. Bacteriol.* **181**:6306-6311.
- Bouveret, E., R. Derouiche, A. Rigal, R. Llobès, C. Lazdunski y H. Bénédicti. 1995. Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. *J. Biol. Chem.* **270**:11071-11077.
- Boyer, H. W. y D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472.
- Bradbeer, C. 1993. The proton motive force drives de outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:3146-3150.
- Braun, M., H. Killmann y V. Braun. 1999. The β -barril domain of FhuA Δ 5-160 is sufficient for TonB-dependent FhuA activities of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**:1037-1049.
- Braun V. y C. Herrmann. 1993. Evolutionary relationship of uptake systems for biopolymers in *Escherichia coli*: cross-complementation between the TonB-ExbB-ExbD and the TolA-TolQ-TolR proteins. *Mol. Microbiol.* **8**:261-268.
- Braun, V. 1989. The structurally related *exbB* and *tolQ* genes are interchangeable in conferring *tonB*-dependent colicin, bacteriophage, and albomycin sensitivity. *J. Bacteriol.* **171**:6387-6390.

- Braun, V. 1997. Surface signaling: novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface. *Arch. Microbiol.* **167**:325-331.
- Braun, V. y H. C. Wu. 1994. Lipoproteins, structure, function, biosynthesis and model for protein export, p.319-341. En J.-M. Ghuyssen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*, Elsevier, Amsterdam.
- Braun, V. y K. Rehn. 1969. Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur. J. Biochem.* **10**:426-438.
- Bremer, E., J. Middendorf, J. Martinussen y P. Valentin-Hansen. 1990. Analysis of the *tsx* gene, which encodes a nucleoside-specific channel-forming protein (Tsx) in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene.* **96**:59-65.
- Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blocker y L. A. Marky. 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:3746-3750.
- Brinkman, F. S. L., M. Bains y R. E. W. Hancock. 2000. The amino terminus of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF forms channels in lipid bilayer membranes: correlation with a three-dimensional model. *J. Bacteriol.* **182**:5251-5255.
- Buchanan, S. K., B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm y J. Deisenhofer. 1999. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**:56-63.
- Burrows, L. L. y J. S. Lam. 1999. Effect of *wzx* (*rfbX*) mutations on A-band and B-band lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* O5. *J. Bacteriol.* **181**:973-980.
- Burrows, L. L., D. F. Charter y J. S. Lam. 1996. Molecular characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 (PAO1) B-band lipopolysaccharide gene cluster. *Mol. Microbiol.* **22**:481-495.
- Cairney, J., C. F. Higgins y I. R. Booth. 1984. Proline uptake through the major transport system of *Salmonella typhimurium* is coupled to sodium ions. *J. Bacteriol.* **160**:22-27.
- Carr, S., C. N. Penfold, V. Bamford, R. James y A. M. Hemmings. 2000. The structure of TolB, an essential component of the *tol*-dependent translocation system, and its protein-protein interaction with the translocation domain of colicin E9. *Struct. Fold. Des.* **8**:57-66.
- Cascales, E., A. Bernadac, M. Gavioli, J. C. Lazzaroni y R. Lloubès. 2002. Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J. Bacteriol.* **184**:754-759.
- Cascales, E., M. Gavioli, J. N. Sturgis y R. Lloubès. 2000. Proton motive force drives the interaction of the inner membrane TolA and outer membrane Pal proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **38**:904-915.
- Cascales, E., R. Lloubès y J. N. Sturgis. 2001. The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB. *Mol. Microbiol.* **42**:795-807
- Chen, C. C., T. Tsuchiya, Y. Yamane, J. M. Wood y T. H. Wilson. 1985. Na⁺ (Li⁺)-proline cotransport in *Escherichia coli*. *J. Membr. Biol.* **84**:157-164.
- Chen, R. y U. Henning. 1987. Nucleotide sequence of the gene for the peptidoglycan-associated lipoprotein of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **163**:73-77.
- Chen, R. y U. Henning. 1996. A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **19**:1287-1294.

- Choi, D. -S., H. Yamada, T. Mizuno y S. Mizushima. 1987. Molecular assembly of the lipoprotein trimer on the peptidoglycan layer of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **102**:975-983.
- Chomczynski, P. y N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *BioTechniques* **162**:156-159.
- Clavel, T. 1996. Le système Tol-Pal d'*Escherichia coli* K12: organisation génétique et relation avec la synthèse de la capsule bactérienne. Tesis doctoral. Université Claude Bernard, Lyon, France.
- Clavel, T., J. C. Lazzaroni, A. Vianney y R. C. Portalier. 1996. Expression of the *tolQRA* genes of *Escherichia coli* K-12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis. *Mol. Microbiol.* **19**:19-25.
- Clavel, T., P. Germon, A. Vianney, R. Portalier y J. C. Lazzaroni. 1998. TolB protein of *Escherichia coli* K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan-associated proteins Pal, Lpp and OmpA. *Mol. Microbiol.* **29**:359-367.
- Click, E. M. y R. E. Webster. 1997. Filamentous phage infection: required interactions with the TolA protein. *J. Bacteriol.* **179**:6464-6471.
- Click, E. M. y R. E. Webster. 1998. The TolQRA proteins are required for membrane insertion of the major capsid protein of the filamentous phage f1 during infection. *J. Bacteriol.* **180**:1723-1728.
- Cornelis, P., A. Bouia, A. Belarbi, A. Guyonvarch, B. Kammerer, V. Hannaert y J. C. Hubert. 1989. Cloning and analysis of the gene for the major outer membrane lipoprotein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **3**:421-428.
- Cowan, S. W. y T. Schirmer. 1994. Structures of non-specific diffusion pores from *Escherichia coli*, p. 353-362. En J.-M. Ghuyssen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam.
- Cowan, S. W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R. A. Pauptit, J. N. Jansonius y J. P. Rosenbusch. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**:727-733.
- Dar, G. H., R. C. Anand y P. K. Sharma. 1993. Genetically engineered microorganisms to rescue plant from frost injury. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**:1-19.
- de Cock, H., U. Schäfer, M. Potgeter, R. Demel, M. Müller y J. Tommassen. 1999. Affinity of the periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* for phospholipids, lipopolysaccharides and non-native outer membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **259**:96-103.
- de Lorenzo, V. y K. N. Timmis. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**:386-405.
- de Weger, L. A., A. J. van der Bij, L. C. Dekkers, M. Simons, C. A. Wijffelman y B. J. J. Lugtenberg. 1995. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**:221-228.
- Death, A., L. Notley y T. Ferenci. 1993. Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress. *J. Bacteriol.* **175**:1475-1483.
- Delcour, A. H. 1997. Function and modulation of bacterial porins: insights from electrophysiology. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**:115-123.
- Dennis, J. J., E. R. Lafontaine y P. A. Sokol. 1996. Identification and characterization of the *tolQRA* genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **178**:7059-7068.

- Derouiche, R., R. Lloubes, S. Sasso, H. Bouteille, R. Oughideni, C. Lazdunski y E. Loret. 1999. Circular dichroism and molecular modeling of the *E. coli* TolA periplasmic domains. *Biospectroscopy* 5:1-9.
- Derouiche, R., G. Zeder-Lutz, H. Bénédicti, M. Gavioli, A. Rigal, C. Lazdunski y R. Lloubès. 1997. Binding of colicins A and E1 to purified TolA domains. *Microbiology* 143:3185-3192.
- Derouiche, R., H. Bénédicti, J. C. Lazzaroni, C. Lazdunski y R. Lloubès. 1995. Protein complex within *Escherichia coli* inner membrane. *J. Biol. Chem.* 270:11078-11084.
- Derouiche, R., M. Gavioli, H. Bénédicti, A. Prilipov, C. Lazdunski y R. Lloubès. 1996. TolA central domain interacts with *Escherichia coli* porins. *EMBO J.* 15:6408-6415.
- Duan, K., E. R. Lafontaine, S. Majumdar y P. A. Sokol. 2000. RegA, iron, and growth phase regulate expression of the *Pseudomonas aeruginosa tol-oprL* gene cluster. *J. Bacteriol.* 182:2077-2087.
- Duché, D., D. Baty, M. Chartier y L. Letellier. 1994. Unfolding of colicin A during its translocation through the *Escherichia coli* envelope as demonstrated by disulfide bond engineering. *J. Biol. Chem.* 269:24820-24825.
- Eick-Helmerich, K. y V. Braun. 1989. Import of biopolymers into *Escherichia coli*: nucleotide sequences of the *exbB* and *exbD* genes are homologous to those of the *tolQ* and *tolR* genes respectively. *J. Bacteriol.* 171:5117-5126.
- Elkins, P. A., A. Bunker, W. A. Cramer y C. V. Stauffacher. 1997. A mechanism for toxin insertion into membranes is suggested by the crystal structure of the channel-forming domain of colicin E1. *Structure* 5:443-458.
- Enderle, P. J. y M. A. Farwell. 1998. Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *BioTechniques* 25:954-958.
- Faude, U. C. y M. G. Höfle. 1997. Development and application of monoclonal antibodies for in situ detection of indigenous bacterial strains in aquatic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4534-4542.
- Fedi, S., D. Brazil, D. N. Dowling y F. O'Gara. 1996. Construction of a modified mini-Tn5 *lacZY* non-antibiotic marker cassette: ecological evaluation of a *lacZY* marked *Pseudomonas* strain in the sugarbeet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* 135:251-257.
- Fellay, R., J. Frey y H. Krisch. 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.
- Ferguson, A. D., E. Hofmann, J. W. Coulton y K. Diederichs. 1998. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* 282:2215-2220.
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. -F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, K. McKenney, G. Sutton, W. FitzHugh, C. Fields, J. D. Gocayne, J. Scott, R. Shirley, L. -I. Liu, A. Glodek, J. M. Kelley, J. F. Weidman, C. A. Phillips, T. Spriggs, E. Hedblom, M. D. Cotton, T. R. Utterback, M. C. Hanna, D. T. Nguyen, D. M. Saudek, R. C. Brandon, L. D. Fine, J. L. Fritchman, J. L. Fuhrmann, N. S. M. Geoghagen, C. L. Gnehm, L. A. McDonald, K. V. Small, C. M. Fraser, H. O. Smith y J. C. Venter. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496-512.
- Fognini-Lefebvre, N., J. C. Lazzaroni y R. C. Portalier. 1987. *tolA*, *tolB*, and *excC*, three cistrons involved in the control of pleiotropic release of periplasmic proteins by *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 209:391-395.

Bibliografía

- Forst, D., K. Schulein, T. Wacker, K. Diedrichs, W. Kreutz, R. Benz y W. Welte. 1993. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of ScrY, a specific bacterial outer membrane porin. *J. Mol. Biol.* **229**:258-262.
- Franklin, F. C. H., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian y K. N. Timmis. 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of the genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:7458-7462.
- Freudl, R., H. Schwarz, Y.-D. Stierhof, K. Gamon, I. Hindennach y U. Henning. 1986. An outer membrane protein (OmpA) of *Escherichia coli* K-12 undergoes a conformational change during export. *J. Biol. Chem.* **261**:11355-11361.
- Fung, J., T. J. MacAlister y L. I. Rothfield. 1978. Role of murein lipoprotein in morphogenesis of the bacterial division septum: phenotypic similarity of *lkyD* and *lpo* mutants. *J. Bacteriol.* **133**:1467-1471.
- García-Valdés, E., E. Cózar, R. Rotger, J. Lalucat y J. Ursing. 1988. New naphthalene-degrading marine *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2478-2485.
- Gaspar, J. A., J. A. Thomas, C. L. Marolda y M. A. Valvano. 2000. Surface expression of O-specific lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the function of the TolA protein. *Mol. Microbiol.* **38**:262-275.
- Germon, P., M. C. Ray, A. Vianney y J.C. Lazzaroni. 2001. Energy-dependent conformational change in the TolA protein of *Escherichia coli* involves its N-terminal domain, TolQ, and TolR. *J. Bacteriol.* **183**:4110-4114.
- Germon, P., T. Clavel, A. Vianney, R. Portalier y J. C. Lazzaroni. 1998. Mutational analysis of the *Escherichia coli* K-12 TolA N-terminal region and characterization of its TolQ-interacting domain by genetic suppression. *J. Bacteriol.* **180**:6433-6439.
- Ghrayeb, J. y M. Inouye. 1984. Nine amino acid residues at the NH₂-terminal of lipoprotein are sufficient for its modification, processing, and localization in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**:463-467.
- Gibson, D. T. y V. Subramanian. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. En D. T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Gibson, D. T., G. J. Zylstra y S. Chauhan. 1990. Biotransformations catalyzed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1, p.121-132. En S. Silver, A.M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C..
- Gotoh, N., H. Wakebe, E. Yoshihara, T. Nakae y T. Nishino. 1989. Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *J. Bacteriol.* **171**:983-990.
- Graeme-Cook, K. A., G. May, E. Bremer y C. F. Higgins. 1989. Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **3**:1287-1294.
- Gromiha, M. M., R. Majumdar y P. K. Ponnuswamy. 1997. Identification of membrane spanning strands in bacterial porins. *Protein Eng.* **10**:497-500.
- Guihard, G., P. Boulanger, H. Bénédicti, R. Llobès, M. Besnard y L. Letellier. 1994. Colicin A and the Tol proteins involved in its translocation are preferentially located in the contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **269**:5874-5880.
- Guymon, L. F. y R. G. Eagon. 1974. Transport of glucose, gluconate, and methyl alpha-D-glucoside by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **117**:1261-1269.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.

- Hancock, R. E. W. 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.* 5:37-42.
- Hancock, R. E. W. y A. M. Carey. 1979. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.* 140:902-910.
- Hancock, R. E. W. y A. M. Carey. 1980. Protein D1-a glucose-inducible, pore-forming protein from the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 8:105-109.
- Hancock, R. E. W. y D. S. Chapple. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1317-1323.
- Hancock, R. E. W. y R. Benz. 1986. Demonstration and chemical modification of a specific phosphate binding site in the phosphate-starvation-inducible outer membrane porin protein P of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 860:699-707.
- Hancock, R. E. W., A. A. Wieczorek, L. M. Mutharia y K. Poole. 1982a. Monoclonal antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane antigens: isolation and characterization. *Infect. Immun.* 37:166-171.
- Hancock, R. E. W., C. Egli, R. Benz y R. J. Siehnel. 1992. Overexpression in *Escherichia coli* and functional analysis of a novel PPI-selective porin, OprO, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 174:471-476.
- Hancock, R. E. W., D. N. Karunaratne y C. Bernegger-Egli. 1994. Molecular organization and structural role of outer membrane macromolecules, p.263-279. En J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*, Elsevier, Amsterdam.
- Hancock, R. E. W., K. Poole y R. Benz. 1982b. Outer membrane protein P of *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by phosphate deficiency and formation of small anion-specific channels in lipid bilayer membranes. *J. Bacteriol.* 150:730-738.
- Hancock, R. E. W., R. Siehnel y N. Martin. 1990. Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 4:1069-1075.
- Hancock, R. E. W., R. Siehnel y N. Martin. 1990. Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 4:1069-1075.
- Hattermann, D. R. y S. M. Ries. 1989. Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in infection. *Phytopathology* 79:284-289.
- Hayashi, S. y H. C. Wu. 1990. Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22:451-471.
- Heilpern, A. J. y M. K. Waldor. 2000. CTX ϕ infection of *Vibrio cholerae* requires the *tolQRA* gene products. *J. Bacteriol.* 182:1739-1747.
- Heinrichs, D. E., J. A. Yethon y C. Whitfield. 1998. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 30:221-232.
- Henning, U. y R. Koebnik. 1994. Outer membrane proteins of *Escherichia coli*: mechanism of sorting and regulation of synthesis, p.381-395. En J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*, Elsevier, Amsterdam.
- Herrero, M., V. de Lorenzo y K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172:6557-6567.
- Higgs, P. I., P. S. Myers y K. Postle. 1998. Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J. Bacteriol.* 180:6031-6038.

- Hitchcock, P. J. y T. M. Brown. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**:269-277.
- Hofstra, H., M. J. D. van Tol y J. Dankert. 1979. Immunofluorescent detection of the major outer membrane protein II in *Escherichia coli* O₂₆K₆₀. *FEMS Microbiol. Lett.* **6**:147-150.
- Holloway, B. W., H. Rossiter, D. Burgess y J. Dodge. 1973. Aeruginocin tolerant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet. Res. Camb.* **22**:239-253.
- Huang H. y R. E. Hancock. 1993. Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**:7793-7800.
- Ichihara, S., M. Hussain y S. Mizushima. 1982. Mechanism of export of outer membrane lipoproteins through the cytoplasmic membrane in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257**:495-500.
- Inoue, A. y K. Horikoshi. 1989. A *Pseudomonas* that thrives in high concentration of toluene. *Nature (London)* **338**:264-266.
- Inoue, H., H. Nojima y H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
- Isnard, M., A. Rigal, J. C. Lazzaroni, C. Lazdunski y R. Lloubès. 1994. Maturation and localization of the TolB protein required for colicin import. *J. Bacteriol.* **176**:6392-6396.
- James, R., C. Kleanthous y G. R. Moore. 1996. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology* **142**:1569-1580.
- Jeanteur, D., J. H. Lakey y F. Pattus. 1991. The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol. Microbiol.* **5**:2153-2164.
- Jeanteur, D., J. H. Lakey y F. Pattus. 1994. The porin superfamily: diversity and common features, p.363-380. En J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*, Elsevier, Amsterdam.
- Journet, L., A. Rigal, C. Lazdunski y H. Bénédicti. 1999. Role of TolR N-terminal, central, and C-terminal domains in dimerization and interaction with TolA and TolQ. *J. Bacteriol.* **181**:4476-4484.
- Journet, L., E. Bouveret, A. Rigal, R. Lloubès, C. Lazdunski y H. Benedetti. 2001. Import of colicins across the outer membrane of *Escherichia coli* involves multiple protein interactions in the periplasm. *Mol. Microbiol.* **42**:331-344.
- Jung, H. 2001. Towards the molecular mechanism of Na⁽⁺⁾/solute symport in prokaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **1505**:131-143.
- Jung, H., R. Rübenhagen, S. Tebbe, K. Leifker, N. Tholema, M. Quick y R. Schmid. 1998. Topology of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273**:26400-26407.
- Kado, C. I. y S. T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**:1365-1373.
- Kamio, Y. y H. Nikaido. 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase C and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry* **15**:2561-2570.
- Kaniga, K., I. Delor y G. R. Cornelis. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137-141.

- Kessler, B., V. de Lorenzo y K. N. Timmis. 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the *P_m* promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* **233**:293-301.
- Kleanthous, C., A. M. Hemmings, G. R. Moore y R. James. 1998. Immunity proteins and their specificity for endonuclease colicins: telling right from wrong in protein-protein recognition. *Mol. Microbiol.* **28**:227-233.
- Koebnik, R. 1995. Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins. *Mol. Microbiol.* **16**:1269-1270.
- Koebnik, R. 1999a. Membrane assembly of the *Escherichia coli* outer membrane protein OmpA: exploring sequence constraints on transmembrane β -strands. *J. Mol. Biol.* **285**:1801-1810.
- Koebnik, R. 1999b. Structural and functional roles of the surface-exposed loops of the beta-barrel membrane protein OmpA from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:3688-3694.
- Koebnik, R., K. P. Locher y P. Van Gelder. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**:239-253.
- Konyecsni, W. M. y V. Deretic. 1990. DNA sequence and expression analysis of *algP* and *algQ*, components of the multigene system transcriptionally regulating mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: *algP* contains multiple direct repeats. *J. Bacteriol.* **172**:2511-2520.
- Koster, M., W. van Klompenburg, W. Bitter, J. Leong y P. Weisbeek. 1994. Role for the outer membrane ferric siderophore receptor PupB in signal transduction across the bacterial cell envelope. *EMBO J.* **13**:2805-2813.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II y K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-176.
- Kreusch, A., A. Neubuser, E. Schlitz, J. Weckesser y G. E. Schulz. 1994. Structure of the membrane channel porin from *Rhodopseudomonas blastica* at 2.0 Å resolution. *Protein Sci.* **3**:58-63.
- Krisch, H. M. y G. Selzer. 1981. Construction and properties of a recombinant plasmid containing gene 32 of bacteriophage T4D. *J. Mol. Biol.* **148**:199-218.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. **227**:680-685.
- Lafontaine, E. R. y P. A. Sokol. 1998. Effects of iron and temperature on expression of the *Pseudomonas aeruginosa tolQRA* genes: role of the ferric uptake regulator. *J. Bacteriol.* **180**:2836-2841.
- Laird, M. W., A. W. Kloser y R. Misra. 1994. Assembly of LamB and OmpF in deep rough lipopolysaccharide mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **176**:2259-2264.
- Larsen, R. A., M. G. Thomas y K. Postle. 1999. Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.* **31**:1809-1824.
- Lazdunski, C. 1995. Colicin import and pore formation: a system for studying protein transport across membranes? *Mol. Microbiol.* **16**:1059-1066.
- Lazdunski, C. J., E. Bouveret, A. Rigal, L. Journet, R. Lloubès y H. Bénédicti. 1998. Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **180**:4993-5002.
- Lazdunski, C., E. Bouveret, A. Rigal, L. Journet, R. Lloubès y H. Bénédicti. 2000. Colicin import into *Escherichia coli* cells requires the proximity of the inner and outer membranes and other factors. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:337-344.

- Lazzaroni, J. C. y R. C. Portalier. 1981. Genetic and biochemical characterization of periplasmic leaky mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **145**:1351-1358.
- Lazzaroni, J. C. y R. C. Portalier. 1992. The *excC* gene of *Escherichia coli* K-12 required for cell envelope integrity encodes the peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL). *Mol. Microbiol.* **6**:735-742.
- Lazzaroni, J. C., A. Vianney, J. L. Popot, H. Bénédicti, F. Samatey, C. Lazdunski, R. C. Portalier y V. Géli. 1995. Transmembrane α -helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* Tol complex. *J. Mol. Biol.* **246**:1-7.
- Lazzaroni, J. C., N. Fognini-Lefebvre y R. C. Portalier. 1986. Effects of *lkyB* mutations on the expression *ompF*, *ompC* and *lamB* porin structural genes in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **33**:235-239.
- Lazzaroni, J. C., N. Fognini-Lefebvre y R. Portalier. 1989. Cloning of the *excC* and *excD* genes involved in the release of periplasmic proteins by *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **218**:460-464.
- Lazzaroni, J. C., P. Germon, M. -C. Ray y A. Vianney. 1999. The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**:191-197.
- Leduc, M., K. Ishidate, N. Shakibai y L. I. Rothfield. 1992. Interactions of *Escherichia coli* membrane lipoproteins with the murein sacculus. *J. Bacteriol.* **174**:7982-7988.
- Levengood, S. K. y R. E. Webster. 1989. Nucleotide sequences of the *tolA* and *tolB* genes and localization of their products, components of a multistep translocation system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:6600-6609.
- Levengood, S. K., W. F. Beyer, Jr. y R. E. Webster. 1991. TolA: A membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5939-5943.
- Levengood-Freyermuth, S. K., E. M. Click y R. E. Webster. 1993. Role of the carboxyl-terminal domain of TolA in protein import and integrity of the outer membrane. *J. Bacteriol.* **175**:222-228.
- Lim, A., Jr., D. De Vos, M. Brauns, D. Mossialos, A. Gaballa, D. Qing y P. Cornelis. 1997. Molecular and immunological characterization of OprL, the 18 kDa outer-membrane peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **143**:1709-1716.
- Llobès, R., E. Cascales, A. Walburger, E. Bouveret, C. Lazdunski, A. Bernadac y L. Journet. 2001. The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity? *Res. Microbiol.* **152**:523-529.
- Locher, K. P., B. Rees, R. Koebnik, A. Mitschler, L. Moulinier, J. P. Rosenbusch y D. Moras. 1998. Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**:771-778.
- Lubkowski, J., F. Hennecke, A. Plückthun y A. Wlodawer. 1999. Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its receptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure* **7**:711-722.
- Lugtenberg, B. y L. van Alphen. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **737**:51-115.
- Mahaffee, W. F. y J. W. Kloepper. 1997. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth-promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. *Can. J. Microbiol.* **43**:344-353.
- Manoil, C. y J. Beckwith. 1985. *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8129-8133.

- Marck, C. 1988. "DNA Strider": a "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res.* **16**:1829-1836.
- Marqués, S., A. Holtel, K. N. Timmis y J. L. Ramos. 1994. Transcriptional induction kinetics from the promoters of the catabolic pathways of TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* for metabolism of aromatics. *J. Bacteriol.* **176**:2517-2524.
- Marqués, S., M. T. Gallegos, M. Manzanera, A. Holtel, K. N. Timmis y J. L. Ramos. 1998. Activation and repression of transcription at the double tandem divergent promoters for the *xylR* and *xylS* genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **180**:2889-94.
- Marsh, J.L., M. Erfle y E. J. Wykes. 1984. The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**:481-485.
- Martin, N. L., E. G. Rawling, R. S. Y. Wong, M. Rosok y R. E. W. Hancock. 1993. Conservation of surface epitopes in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein OprF. *FEMS Microbiol. Lett.* **113**:261-266.
- Marvin, H. J. P., M. B. A. Ter Beest y B. Witholt. 1989. Release of outer membrane fragments from wild-type *Escherichia coli* and from several *E. coli* lipopolysaccharide mutants by EDTA and heat shock treatments. *J. Bacteriol.* **171**:5262-5267.
- Matsuyama, S. -I., N. Yokota y H. Tokuda. 1997. A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **16**:6947-6955.
- Matsuyama, S., T. Tajima y H. Tokuda. 1995. A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J.* **14**:3365-3372.
- Meury, J. y G. Devilliers. 1999. Impairment of cell division in *tolA* mutants of *Escherichia coli* at low and high medium osmolarities. *Biology of the Cell* **91**:67-75.
- Midgley, M. y E. A. Dawes. 1973. The regulation of transport of glucose and methyl α -glucoside in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **132**:141-154.
- Miller, J. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Mills, B. J. y B. W. Holloway. 1976. Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* that show specific hypersensitivity to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**:411-416.
- Missiakas, D. y S. Raina. 1997. Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* **179**:2465-2471.
- Missiakas, D., J. -M. Betton y S. Raina. 1996. New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli*: SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol. Microbiol.* **21**:871-884.
- Moran, A. P. 1996. Bacterial surface structures - an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**:61-62.
- Morona, R., M. Mavris, A. Fallarino y P. A. Manning. 1994. Characterization of the *rfc* region of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **176**:733-747.
- Mühlradt, P. F. y J. Menzel. 1973. Outer membrane of *Salmonella*. Sites of export of newly synthesised lipopolysaccharide on the bacterial surface. *Eur. J. Biochem.* **35**:471-481.
- Muller, M. M., A. Vianney, J. C. Lazzaroni, R. E. Webster y R. C. Portalier. 1993. Membrane topology of the *Escherichia coli* TolR protein required for cell envelope integrity. *J. Bacteriol.* **175**:6059-6061.

- Muller, M. M. y R. E. Webster. 1997. Characterization of the *tol-pal* and *cyd* region of *Escherichia coli* K-12: transcript analysis and identification of two new proteins encoded by the *cyd* operon. *J. Bacteriol.* **179**:2077-2080.
- Nakae, T., A. Nakajima, T. Ono, K. Saito y H. Yoneyama. 1999. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1301-1303.
- Nakamura, K. y M. Inoue. 1979. DNA sequence of the gene for the outer membrane lipoprotein of *E. coli*: an extremely AT-rich promoter. *Cell* **18**:1109-1117.
- Nelson, M. B., M. A. Apicella, T. F. Murphy, H. Vankeulen, L. D. Spotila y D. Rekosh. 1988. Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. *Infect. Immun.* **56**:128-134.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak y G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**:1-6.
- Nikaido, H. 1992. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* **6**:435-442.
- Nikaido, H. 1994a. Diffusion of inhibitors across the cell wall, p. 547-558. En J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam.
- Nikaido, H. 1994b. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**:382-388.
- Nikaido, H. 1996a. Outer membrane, p. 29-47. En F. C. Neidhardt, R. Curtis, III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D. C.
- Nikaido, H. 1996b. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:5853-5859.
- Nikaido, H. 1999. Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J. Bacteriol.* **181**:4-8.
- Nikaido, H. y D. G. Thanassi. 1993. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1393-1399.
- Nikaido, H. y E. Y. Rosenberg. 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J. Bacteriol.* **153**:241-252.
- Nikaido, H. y M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32.
- Nikaido, H. y R. E. W. Hancock. 1986. Outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa*, p.145-193. En J.R. Sokatch and L.N. Ornston (ed.), *The Bacteria*. Volume X: the biology of *Pseudomonas*, Academic Press, Orlando.
- Nikaido, H., K. Nikaido y S. Harayama. 1991. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **266**:770-779.
- Nishijyo, T., D. Haas y Y. Itoh. 2001. The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **40**:917-931.
- Norrander, K., T. Kempe y K. Messing. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**:101-106.

- Ochs, M. M., M. P. McCusker, M. Bains y R. E. W. Hancock. 1999. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1085-1090.
- Ochsner, U. A. y M. L. Vasil. 1996. Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:4409-4414.
- Oliver, D. B. 1996. Periplasm, p.88-103. En F.C. Neidhardt, R. Curtis, III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, ASM Press, Washington, D. C..
- O'Sullivan, D. J. y F. O'Gara. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**:662-676.
- Palleroni, N. J., R. Kunisawa, R. Contopoulou y M. Doudoroff. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. System. Bacteriol.* **23**:333-339.
- Parker, M. W., J. P. M. Pastman, F. Pattus, A. D. Tucker y D. Tsenoglou. 1992. Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **224**:639-657.
- Paustsch y Schulz. 1998. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nature Struct. Biol.* **5**:1013-1017.
- Pearson, W. R. y D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2444-2448.
- Pettersson, R. F., K. Lundstrom, J. B. Chattopadhyaya, S. Josephson, L. Philipson, L. Kaariainen y I. Palva. 1983. Chemical synthesis and molecular cloning of a STOP oligonucleotide encoding a UGA translation terminator signal in the three reading frames. *Gene* **24**:15-27.
- Phoenix, D. A. 1996. On the targeting and membrane assembly of the *Escherichia coli* outer membrane porin, PhoE. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**:77-82.
- Pickup, R. W. 1991. Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. *J. Gen. Microbiol.* **137**:1009-1019.
- Plesiat, P. y H. Nikaido. 1992. Outer membranes of gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. *Mol. Microbiol.* **6**:1323-1333.
- Possot, O. M., L. Letellier y A. P. Pugsley. 1997. Energy requirement for pullulanase secretion by the main terminal branch of the general secretory pathway. *Mol. Microbiol.* **24**:457-64.
- Pratt, L. A. y T. J. Silhavy. 1995. Porin regulon of *Escherichia coli*, p.105-127. En J.A. Hoch and T.J. Silhavy (ed.), *Two-component signal transduction*, ASM Press, Washington, D.C..
- Pratt, L. A., W. Hsing, K. E. Gibson y T. J. Silhavy. 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**:911-917.
- Prentki, P. y H. M. Krisch. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**:303-313.
- Prouty, A. M., J. C. Van Velkinburgh y J. S. Jun. 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium resistance to bile: Identification and characterization of the *tolQRA* cluster. *J. Bacteriol.* **184**:1270-1276.
- Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:50-108.

- Quinn, J. P. 1992. Intrinsic antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, p.154-160. En E. Galli, S. Silver, and B. Witholt (ed.), *Pseudomonas: molecular biology and biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Quinn, J. P., C. A. Dudek, C. A. di Vincenzo, D. A. Lucks y S. A. Lerner. 1986. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Infect. Dis.* **154**:289-294.
- Raetz, C. R. H. 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles, p.1035-1063. En F.C. Neidhardt, R. Curtis, III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, ASM Press, Washington, D. C..
- Ramos, J. L., E. Duque, M. J. Huertas y A. Haïdour. 1995. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* **177**:3911-3916.
- Ramos-González, M. I., F. Ruíz Cabello, I. Brettar, F. Garrido y J. L. Ramos. 1992. Tracking genetically engineered bacteria: monoclonal antibodies against surface determinants of the soil bacterium *Pseudomonas putida* 2440. *J. Bacteriol.* **174**:2978-2985.
- Rawling, E. G., F. S. L. Brinkman y R. E. W. Hancock. 1998. Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. *J. Bacteriol.* **180**:3556-3562.
- Rawling, E. G., N. L. Martin y R. E. W. Hancock. 1995. Epitope mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane porin protein OprF. *Infect. Immun.* **63**:38-42.
- Reeves, P. 1994. Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide, p.281-317. En J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*, Elsevier, Amsterdam.
- Riechmann, L. y P. Holliger. 1997. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell* **90**:351-360.
- Ried, G., I. Hindennach y U. Henning. 1990. Role of lipopolysaccharide in assembly of *Escherichia coli* outer membrane proteins OmpA, OmpC, and OmpF. *J. Bacteriol.* **172**:6048-6053.
- Rigal, A., E. Bouveret, R. Lloubès, C. Lazdunski y H. Bénédicti. 1997. The TolB protein interacts with the porins of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:7274-7279.
- Rivera, M. y E. J. McGroarty. 1989. Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **171**:2244-2248.
- Rodríguez-Herva, J. J. 1999. Caracterización molecular del gen *oprL* de *Pseudomonas putida*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Granada, España.
- Rodríguez-Herva, J. J. y J. L. Ramos. 1996. Characterization of an OprL null mutant of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **178**:5836-5840.
- Rodríguez-Herva, J. J., D. Reniero, E. Galli y J. L. Ramos. 1999. Cell envelope mutants of *Pseudomonas putida*: physiological characterization and analysis of their ability to survive in soil. *Environ. Microbiol.* **1**:479-488.
- Rodríguez-Herva, J. J., M. I. Ramos-González y J. L. Ramos. 1996. The *Pseudomonas putida* peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein is involved in maintenance of the integrity of the cell envelope. *J. Bacteriol.* **178**:1699-1706.
- Rouvière, P. E. y C. A. Gross. 1996. SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev.* **10**:3170-3182.

- Sage, A. E., W. D. Proctor y P. V. Phibbs, Jr. 1996. A two-component response regulator, *gltR*, is required for glucose transport activity in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **178**:6064-6066.
- Saint, N., K. L. Lou, C. Widmer, M. Luckey, T. Schirmer y J. P. Rosenbusch. 1996. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. II. Functional characterization. *J. Biol. Chem.* **271**:20676-20680.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandermann, H., Jr. y J. L. Strominger. 1972. Purification and properties of C55-isoprenoid alcohol phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **247**:5123-5131
- Sanger, F. S., S. Nicklen y A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Sano, Y. y M. Kageyama. 1993. A novel transposon-like structure carries the genes for pyocin AP41, a *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocin with a DNase domain homology to E2 group colicins. *Mol. Gen. Genet.* **237**:161-170.
- Saravolac, E. G., N. F. Taylor, R. Benz y R. E. W. Hancock. 1991. Purification of glucose-inducible outer membrane protein OprB of *Pseudomonas putida* and reconstitution of glucose-specific pores. *J. Bacteriol.* **173**:4970-4976.
- Schirmer, T. y P. S. Phale. 1999. Brownian dynamics simulation of ion flow through porin channels. *J. Mol. Biol.* **294**:1159-1167.
- Schirmer, T., T. A. Keller, Y.-F. Wang y J. P. Rosenbusch. 1995. Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**:512-514.
- Schmidhauser, T.J. y D. R. Helinski. 1985. Regions of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **164**:446-455.
- Schnaitman, C. A. y J. D. Klena. 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:655-682.
- Schulz, G. E. 1993. Bacterial porins: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:701-707.
- Schweizer, H. P. y C. Po. 1996. Regulation of glycerol metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the *glpR* repressor gene. *J. Bacteriol.* **178**:5215-5221.
- Schweizer, H. P., R. Jump y C. Po. 1997. Structure and gene-polypeptide relationships of the region encoding glycerol diffusion facilitator (*glpF*) and glycerol kinase (*glpK*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **143**:1287-1297.
- Segura, A., E. Duque, G. Mosqueda, J. L. Ramos y F. Junker. 1999. Multiple responses of gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ. Microbiol.* **1**:191-198.
- Sen, K. y H. Nikaido. 1991. Lipopolysaccharide structure required for *in vitro* trimerization of *Escherichia coli* OmpF porin. *J. Bacteriol.* **173**:926-928.
- Sen, K., D. J. Sikkema y T. F. Murphy. 1996. Isolation and characterization of the *Haemophilus influenzae* *tolQ*, *tolR*, *tolA* and *tolB* genes. *Gene* **178**:75-81.
- Siegel, L. S. y P. V. Phibbs. 1979. Glycerol and L- α -glycerol-3-phosphate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* **2**:251-256.
- Silhavy, T. J. y J. R. Beckwith. 1985. Uses of *lac* fusions for the study of biological problems. *Microbiol. Rev.* **49**:398-418.

- Sly, L. M., E. A. Worobec, R. E. Perkins y P. V. Phibbs, Jr. 1993. Reconstitution of glucose uptake and chemotaxis in *Pseudomonas aeruginosa* glucose transport defective mutants. *Can. J. Microbiol.* **39**:1079-1083.
- Smit, J. y H. Nikaido. 1978. Outer membrane of gram-negative bacteria. XVIII. Electron microscopic studies on porin insertion sites and growth of cell surface of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **135**:687-702.
- Sokol, P. A. y D. E. Woods. 1986. Monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* ferripyochelin-binding protein. *Infect. Immun.* **53**:621-627.
- Sonntag, I., H. Schwarz, Y. Hirota y U. Henning. 1978. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **136**:280-285.
- Spain, J. C. 1990. Metabolic pathways for biodegradation of chlorobenzenes, p.197-206. En S. Silver, A.M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas*: biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Spaink, H. P., R. J. H. Okker, C. A. Wijffelman, E. Pees y B. J. J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* **9**:27-39.
- Stein, D. C. 1992. Plasmids with easily excisable *xylE* cassettes. *Gene* **117**:157-158.
- Stinson, M. W., M. A. Cohen y J. M. Merrick. 1976. Isolation of dicarboxylic acid- and glucose-binding proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **128**:573-579.
- Struyvé, M., M. Moons y J. Tommassen. 1991. Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J. Mol. Biol.* **218**:141-148.
- Sturgis, J. N. 2001. Organisation and evolution of the *tol-pal* gene cluster. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:113-22.
- Sugawara, E. y H. Nikaido. 1992. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**:2507-2511.
- Sugawara, E. y H. Nikaido. 1994. OmpA protein of *Escherichia coli* outer membrane occurs in open-channel and closed-channel forms. *J. Biol. Chem.* **269**:17981-17987.
- Sugawara, E., M. Steiert, S. Rouhani y H. Nikaido. 1996. Secondary structure of the outer membrane proteins OmpA of *Escherichia coli* and OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **178**:6067-6069.
- Sukupolvi, S. y C. D. O'Connor. 1990. TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between Gram-negative bacteria and their environment. *Microbiol. Rev.* **54**:331-341.
- Sun, T. -P. y R. E. Webster. 1986. *fii*, a bacterial locus required for filamentous phage infection and its relation to colicin-tolerant *tolA* and *tolB*. *J. Bacteriol.* **165**:107-115.
- Sun, T. -P. y R. E. Webster. 1987. Nucleotide sequence of a gene cluster involved in entry of E colicins and single-stranded DNA of infecting filamentous bacteriophages into *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:2667-2674.
- Suzuki, T., C. Ueguchi y T. Mizuno. 1996. H-NS regulates OmpF expression through *micF* antisense RNA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:3650-3653.
- Tajima, T., N. Yokota, S. -I. Matsuyama y H. Tokuda. 1998. Genetic analyses of the in vivo function of LolA, a periplasmic chaperone involved in the outer membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. *FEBS Lett.* **439**:51-54.

- Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-80.
- Todt, J. C., W. J. Rocque y E. J. McGroarty. 1992. Effects of pH on bacterial porin function. *Biochemistry* **31**:10471-10478.
- Trias, J. y H. Nikaido. 1990. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J. Biol. Chem.* **265**:15680-15684.
- Trias, J., E. Y. Rosenberg y H. Nikaido. 1988. Specificity of the glucose channel formed by protein D1 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **938**:493-496.
- Trias, J., E. Y. Rosenberg y H. Nikaido. 1988. Specificity of the glucose channel formed by protein D1 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **938**:493-496.
- Tsay, S. S., K. K. Brown y E. T. Gaudy. 1971. Transport of glycerol by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **108**:82-88.
- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* **56**:395-411.
- Vaara, M. y M. Nurminen. 1999. Outer membrane permeability barrier in *Escherichia coli* mutants that are defective in the late acyltransferases of lipid A biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1459-1462.
- Van Gelder, P., N. Saint, P. Phale, E. F. Eppens, A. Prilipov, R. van Boxtel, J. P. Rosenbusch y J. Tommassen. 1997. Voltage sensing in the PhoE and OmpF outer membrane porins of *Escherichia coli*: role of charged residues. *J. Mol. Biol.* **269**:468-472.
- Venturi, V., C. Ottevanger, J. Leong y P. J. Weisbeek. 1993. Identification and characterization of a siderophore regulatory gene (*pfrA*) of *Pseudomonas putida* WCS358: homology to the alginate regulatory gene *algQ* of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **10**:63-73.
- Vianney, A., M. M. Muller, T. Clavel, J. C. Lazzaroni, R. C. Portalier y R. E. Webster. 1996. Characterization of the *tol-pal* region of *Escherichia coli* K-12: translational control of *tolR* expression by TolQ and identification of a new open reading frame downstream of *pal* encoding a periplasmic protein. *J. Bacteriol.* **178**:4031-4038.
- Vianney, A., T. M. Lewin, W. F. Beyer, Jr., J. C. Lazzaroni, R. C. Portalier y R. E. Webster. 1994. Membrane topology and mutational analysis of the TolQ protein of *Escherichia coli* required for the uptake of macromolecules and cell envelope integrity. *J. Bacteriol.* **176**:822-829.
- Wandersman, C. y P. Delepelaire. 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4776-4780.
- Webster, R. E. 1991. The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:1005-1011.
- Weiss, M. S. y G. E. Schulz. 1992. Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227**:493-509.
- Weissenborn, D. L., N. Wittekindt y T. J. Larson. 1992. Structure and regulation of the *glpFK* operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **267**:6122-6131.

- Wengender, P. A. y K. J. Miller. 1995. Identification of a PutP proline permease gene homolog from *Staphylococcus aureus* by expression cloning of the high-affinity proline transport system in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:252-259.
- Whitfield, C., P. A. Amor y R. Köplin. 1997. Modulation of the surface architecture of Gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol. Microbiol.* **23**:629-638.
- Wiener, M., D. Freymann, P. Ghosh y R. M. Stroud. 1997. Crystal structure of colicin Ia. *Nature* **385**:461-464.
- Williams S. G., J. A. Greenwood y C. W. Jones. 1994. The effect of nutrient limitation on glycerol uptake and metabolism in continuous cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **140**:2961-2969.
- Wilson, M. y S. E. Lindow. 1993. Release of recombinant microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:913-944.
- Wong, R. S. Y., H. Jost y R. E. W. Hancock. 1993. Linker-insertion mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF. *Mol. Microbiol.* **10**:283-292.
- Woodruff, W. A. y R. E. W. Hancock. 1988. Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protein F-deficient mutants after in vitro and in vivo insertion mutagenesis of the cloned gene. *J. Bacteriol.* **170**:2592-2598.
- Woodruff, W. A. y R. E. W. Hancock. 1989. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F: structural role and relationship to the *Escherichia coli* OmpA protein. *J. Bacteriol.* **171**:3304-3309.
- Woodruff, W. A., T. R. Parr, Jr., R. E. W. Hancock, L. F. Hanne, T. I. Nicas y B. H. Igrewski. 1986. Expression in *Escherichia coli* and function of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F. *J. Bacteriol.* **167**:473-479.
- Wray, W, T. Boulikas, V. P. Wray y R. Hancock. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **118**:197-203.
- Wu, H. C. 1996. Biosynthesis of lipoproteins, p.1005-1014. En F.C. Neidhardt, R. Curtis, III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, ASM Press, Washington, D. C..
- Wylie, J. L. y E. A. Worobec. 1993. Substrate specificity of the high-affinity glucose transport system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **39**:722-725.
- Wylie, J. L. y E. A. Worobec. 1994. Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* glucose-selective OprB porin gene and distribution of OprB within the family *Pseudomonadaceae*. *Eur. J. Biochem.* **220**:505-512.
- Wylie, J. L. y E. A. Worobec. 1995. The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**:3021-3026.
- Wylie, J. L., C. Bernegger-Egli, J. D. O'Neil y E. A. Worobec. 1993. Biophysical characterization of OprB, a glucose-inducible porin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**:547-556.
- Yakushi, T., T. Tajima, S. -I. Matsuyama y H. Tokuda. 1997. Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:2857-2862.
- Yamaguchi, K., F. Yu y M. Inouye. 1988. A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* **53**:423-432.

Yamano, Y., T. Nishikawa y Y. Komatsu. 1993. Cloning and nucleotide sequence of anaerobically induced porin protein E1 (OprE) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* **8**:993-1004.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira y J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.

Yoneyama, H. y T. Nakae. 1993. Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2385-2390.

Yoneyama, H. y T. Nakae. 1996. Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein. *Microbiology* **142**:2137-2144.

Zuker, M., D. H. Mathews y D. H. Turner. 1999. Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide. En *RNA Biochemistry and Biotechnology*, 11-43, J. Barciszewski y B. F. C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers.



Biblioteca Universitaria de Granada



01053395